

**ПРОБЛЕМИ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ЕКОНОМІКИ НЕФРОЛОГІЧНОЇ ДОПОМОГИ/  
PROBLEMS OF ORGANIZATION AND ECONOMICS OF NEPHROLOGICAL CARE**

- КОНТРАСТ-АСОЦІЙОВАНЕ ГОСТРЕ ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК. КЛІНІЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
УКРАЇНСЬКОЇ АСОЦІАЦІЇ НЕФРОЛОГІВ І ФАХІВЦІВ З ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НИРКИ**  
Колесник М., Костилев М., Степанова Н., Шіфріс І., Зацаринний Р. (Україна) ..... 3

**ВИПАДКИ З КЛІНІЧНОЇ ПРАКТИКИ /CLINICAL CASE REPORTS**

- RENAL CARCINOMA ASSOCIATED WITH END-STAGE KIDNEY DISEASE:  
A CASE SERIES FROM A TERTIARY PORTUGUESE HOSPITAL**  
João Ferreira Guerra, João Magalhães Pina, Vanessa Andrade,  
Miguel Brito Lança, Luís Campos Pinheiro (Portugal) ..... 17

- HEMOGLOBINURIA AND ACUTE KIDNEY INJURY IN SEVERE MALARIA:  
CASE REPORTS FROM BORGOU/ALIBORI TEACHING HOSPITAL, BENIN**  
Seraphin Ahoui, Nonvignon Eric Ayadji, Giovanna Zossoungbo, Joseph Godonou, Aubin Melikan,  
Aime Vinasse, Sabrina Conchita Somakou, Nicanor Houeto, Evariste Eteka, Jacques Vigan (Benin) ..... 23

- ДИФЕРЕНЦІЙНА ДІАГНОСТИКА СИМПТОМУ ПОЛІУРІЇ В ПРАКТИЦІ ЛІКАРЯ-НЕФРОЛОГА:  
ОПИС КЛІНІЧНИХ ВИПАДКІВ ТА ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**  
А.К. Голованова, Т.І. Остапенко (Україна) ..... 30

**ОРИГІНАЛЬНІ НАУКОВІ РОБОТИ / ORIGINAL PAPERS**

- EFFECT OF *LACTOBACILLUS* SUPERNATANT ON SWARMING-RELATED GENE EXPRESSION  
IN *PROTEUS MIRABILIS* ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTIONS**  
Muthanna Muwafaq Abdullah, Bahaa Abdullah Laftaah AL-Rubaii (Iraq) ..... 39

- IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE EFFECT OF NEUROTROPHIC FACTORS  
ON THE BLADDER OF RATS WITH INFRAVESICAL OBSTRUCTION AFTER ADMINISTRATION  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOSITIONS**  
V. Globa, G. Bozhok, E. Legach, Y. Samburg, O. Godlevska, M. Vlasenko (Ukraine) ..... 49

- EVALUATION OF THE LEVEL OF ANTITHROMBIN IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS  
AND NEPHROTIC SYNDROME: A CROSS-SECTIONAL STUDY**  
I. Mykhaloiko, R. Yatsyshyn, I. Dudar, H. Kuryliv (Ukraine) ..... 57

- CISPLATIN AND DEXAMETHASONE SEPARATE AND COMBINED EFFECT  
ON NEPHROTOXIC PROCESSES IN FEMALE RATS**  
Zhenya Yavroyan, Anna Grigoryan, Nune Hakobyan, Agapi Hovhannisyan, Tamara Abgaryan,  
Anna Karapetyan, Emil Gevorgyan (Republic of Armenia) ..... 65

- SPECTROPHOTOMETRIC AND CLOUD POINT EXTRACTION METHODS TO DETECT  
QUERCETIN DIHYDRATE IN SUPPLEMENT FORMULATIONS AND URINE SAMPLES**  
Sadeem Subhi Abed, Mayasa Mansour Mohammed (Iraq) ..... 75

- NURSING INTERVENTION: KINESIO TAPING TO REDUCE RESTLESS LEGS SYNDROME  
SYMPTOMS IN PATIENTS UNDERGOING HEMODIALYSIS**  
Anggit Prasetya, Agus Santosa, Jebul Suroso (Indonesia) ..... 86

**РЕДАКЦІЙНА ІНФОРМАЦІЯ / EDITORIAL INFORMATION**

- РЕДАКЦІЙНА ІНФОРМАЦІЯ** ..... 92



## Національний нирковий фонд України

ISSN 2304-0238

ISSN 2616-7352

## УКРАЇНСЬКИЙ ЖУРНАЛ НЕФРОЛОГІЇ ТА ДІАЛІЗУ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ, МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

№ 4 (84) 2024

Заснований 04.2004.

ВИХОДИТЬ 4 РАЗИ НА РІК

**Головний редактор:** Колесник Микола Олексійович

**Заступник головного редактора:** Степанова Наталя Михайлівна

**Відповідальний секретар:** Козлюк Надія Іванівна

**Редакційна колегія:**

Бурлака Євгенія Анатоліївна  
Деміхова Надія Володимирівна  
Дряньська Вікторія Євгенівна  
Дудар Ірина Олексіївна  
Зуб Лілія Олексіївна  
Король Леся Вікторівна  
Сагалевиц Андрій Ігорович  
Стаховський Едуард Олександрович  
Сусла Олександр Богданович

Фоміна Світлана Петрівна  
Alper Alp  
Raymond T. Krediet  
Jolanta Malyszko  
Francesco P. Schena  
Vladimir Tesar  
Christoph Wanner  
Andrzej Więcek

*Засновник* – Національний нирковий фонд України

*Журнал зареєстровано у Державному Реєстрі суб'єктів у сфері друкованих медіа (ідентифікатор медіа R30-02569, Рішення Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення №298 від 08.02.2024 р.) та он-лайн медіа (ідентифікатор медіа R40-02656, Рішення Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення №2543 від 08.08.2024 р.).*

*Журнал внесено до категорії «А» переліку наукових фахових видань України (Наказ Міністерства освіти і науки України від 07.04.2022 №320).*

*Репозитарне зберігання та представлення журналу на порталі "Наукова періодика України" Національної бібліотеки України імені В.І. Вернадського*

**Індексація журналу:**

- Scopus
- Crossref (видавничий префікс: 10.31450),
- The Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD),
- National Repository Vernadsky National Library of Ukraine,
- Google Scholar,
- Library catalog OCLC WorldCat.

*Видається за наукової підтримки Національного ниркового фонду України.*

*Рекомендовано до друку Науковою радою Національного ниркового фонду України (протокол № 4 від 05.12.2024 р.).*

**Наклад** 500 прим.

**Адреса редакції:** вул. Дегтярівська 17 В., м. Київ, 04050;  
тел. 225 93 86; тел./факс: 225 93 87; e-mail: ukrjnd@gmail.com

**Здано в набір** 09.12.2024. **Підписано до друку** 16.12.2024  
Формат паперу 64×90 1/8. Гарнітура НьютонС. Ум. друк. арк. 11,2. Замовлення № 161224

**Друк ТОВ «Поліграф плюс»**

**Свідоцтво** про внесення до Державного реєстру суб'єктів видавничої справи  
№ 5041 (серія ДК) від 26.01.2016 р.  
03062, вул. Туполева, 8, Київ, тел./факс: (067) 466-14-42  
e-mail: office@poligraph-plus.kiev.ua

Матеріали друкуються мовою оригіналу (українською або англійською).  
За достовірність і орфографію рекламної інформації відповідальність несе рекламодавць.  
Редакція не завжди поділяє думки авторів публікацій.  
Передрук публікацій здійснювати тільки за згодою редакції.

© «Український журнал нефрології та діалізу», 2024



Журнал розповсюджується за ліцензією CC Attribution-ShareAlike 4.0

## National Kidney Foundation of Ukraine

 ISSN 2304-0238

**UKRAINIAN JOURNAL OF NEPHROLOGY AND DIALYSIS**

 ISSN 2616-7352

PRACTICAL, SCIENTIFIC, MEDICAL JOURNAL

*Nº 4 (84) 2024*

*founded in 04.2004*

**PUBLISHED 4 TIMES A YEAR**

**Editor-in-chief:** Mykola Kolesnyk

**Deputy Editor:** Natalia Stepanova

**Executive secretary:** Nadiia Kozliuk

**Editorial Board :**

Alper Alp  
Ievgeniia Burlaka  
Nadiia Demikhova  
Victoria Driyanska  
Iryna Dudar  
Svitlana Fomina  
Lesya Korol  
Raymond T. Krediet  
Jolanta Malyszko

Andriy Sahalevych  
Francesco P. Schena  
Eduard Stakhovsky  
Oleksandr Susla  
Vladimir Tesar  
Christoph Wanner  
Andrzej Więcek  
Liliia Zub

**Founder** – National Kidney foundation of Ukraine

**The journal is registered in the State Register of Subjects in the Field of Printed Media (media identifier R30-02569, Decision of the National Council of Ukraine on Television and Radio Broadcasting No. 298 dated February 8, 2024) and online media (media identifier R40-02656, Decision of the National Council of Ukraine on Television and Radio Broadcasting No. 2543 dated August 8, 2024).**

**The Journal is included in the category "A" of the list of scientific professional editions of Ukraine (Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine dated April 07, 2022, №320).**

**Journal's repository storage and presentation in the portal "Scientific Periodicals of Ukraine" by the Vernadsky National Library of Ukraine**

**Journal indexing:**

- **Scopus**
- Crossref Registration Agency (doi prefix 10.31450),
- The Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD),
- National Repository Vernadsky National Library of Ukraine,
- Google Scholar,
- Library catalog OCLC WorldCat.

**Published** by scientific support of the Kidney Foundation of Ukraine

**Recommended for publication** by the Academic Council of the National Kidney Foundation of Ukraine (Protocol № 4 dated December 05, 2024).

**Edition 500 copies**

**Address:** Degtjarivska str.17V, Kyiv, 04050; e-mail: ukrjnd@gmail.com  
tel. 225 93 86; tel/fax: 225 93 87.

**Put in a set** on December 09, 2024. **Signed to print December 16, 2024.**

Paper size 64x90 1/8. Headset NewtonC. Conventionally printed sheets 11,2. Order № 161224

**Print LLC "Polygraph plus"**

**Certificate** of entry into the State Register of publishing entities №. 5041 (DK series) dated January 26, 2016.

03062, Tupoleva str., 8, Kyiv, tel/ fax: (067) 466-14-42  
e-mail: office@poligraph-plus.kiev.ua

Materials are published in the original language  
(Ukrainian or English).

For the accuracy and spelling of the advertising information the responsibility is on the advertiser.

The editorial office does not always agree with the authors.

Reprint of the publications is possible to carry out only for the agreement of editorial office

© Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis, 2024



The Journal is licensed by CC Attribution-ShareAlike 4.0 International



## Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

**ISSN 2304-0238;****eISSN 2616-7352****Journal homepage:** <https://ukrjnd.com.ua>

### Adapted Clinical Guidelines

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.01

### Contrast-associated acute kidney injury: Adapted clinical guidelines of the Ukrainian Association of Nephrologists and Kidney Transplant Specialists

**Expert group: Chairman: M. Kolesnyk.****Members: M. Kostylev, N. Stepanova, I. Shifris,  
R. Zatsarynny**

Ukrainian Association of Nephrologists and Kidney Transplant Specialists

**Citation:**

Kolesnyk M, Kostylev M, Stepanova N, Shifris I, Zatsarynny R. Contrast-associated acute kidney injury: Adapted clinical guidelines of the Ukrainian Association of Nephrologists and Kidney Transplant Specialists. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84):3-16. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.01.

**Article history:**

Received August 19, 2024

Received in revised form  
September 29, 2024

Accepted October 01, 2024

**Abstract.** Iodinated contrast media (ICM) are among the most commonly used medicinal products in clinical practice for diagnostic or interventional purposes. Acute kidney injury (AKI) that occurs after intravascular administration of ICM is a potentially life-threatening condition and is directly associated with an increased risk of long-term mortality. In Ukraine, there is an urgent need to inform the broader medical community about significant changes in the paradigm surrounding the intravascular use of ICM in clinical practice. In this context, the Ukrainian Association of Nephrologists and Kidney Transplant Specialists working group has developed these guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of contrast-associated AKI.

**Keywords:** iodinated contrast media, contrast-associated acute kidney injury, diagnosis, treatment, prevention.

**Conflict of interest statement.** The authors declare no competing interest.

© M. Kolesnyk, M. Kostylev, N. Stepanova, I. Shifris, R. Zatsarynny, 2024.

Correspondence should be addressed to Mykola Kolesnyk: [director@inephrology.kiev.ua](mailto:director@inephrology.kiev.ua)

© Колесник М., Кости́лев М., Степанова Н., Ші́фріс І., Зацаринний Р., 2024.

УДК: 616.61-008.6-036.11-084-07-08

## Контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок. Клінічні рекомендації Української асоціації нефрологів і фахівців з трансплантації нирки

**Склад експертної групи:**

Голова: М. Колесник

Члени: М. Кости́лев, Н. Степанова, І. Ші́фріс, Р. Зацаринний

Українська асоціація нефрологів і фахівців з трансплантації нирки

**Резюме.** Йодовмісні контрастні речовини (ЙВКР) – одні з найпоширеніших лікарських засобів (ЛЗ), які застосовуються у медичній практиці з діагностичною чи інтервенційною метою. Гостре пошкодження нирок (ГПН), яке виникає після внутрішньосудинного введення ЙВКР є потенційно життєзагрозливим станом безпосередньо та асоціюється з підвищеним ризиком довгострокової смертності. В Україні існує нагальна необхідність інформування широкого лікарського загалу про суттєві зміни складових парадигми внутрішньосудинного застосування ЙВКР у клінічній практиці, у зв'язку з цим робоча група УАН і ФТН створила ці рекомендації щодо профілактики, діагностики та лікування контраст-асоційованого ГПН.

**Ключові слова:** йодовмісні контрастні речовини, контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок, діагностика, лікування, профілактика.

**Вступ.** Йодовмісні контрастні речовини (ЙВКР) – одні з найпоширеніших лікарських засобів (ЛЗ), які застосовуються у медичній практиці з діагностичною чи інтервенційною метою [1].

Гостре пошкодження нирок (ГПН), що виникає після внутрішньосудинного введення ЙВКР, потенційно життєзагрозливий стан безпосередньо та асоціюється з підвищеним ризиком довгострокової смертності [2, 3, 4]. При цьому причинно-наслідковий зв'язок між застосуванням ЙВКР та ГПН (раніше контраст-індукована нефропатія – КІН) у кожному конкретному випадку верифікувати неможливо, тому пропонується використовувати термін контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок (КА-ГПН), оскільки ГПН може бути викликане іншими причинами або їх поєднанням [5].

Очевидно, що створення клінічних рекомендацій щодо цієї теми потребує міждисциплінарної співпраці, оскільки як діагностичні, так і лікувальні процедури з контрастним підсиленням призначаються одними фахівцями, виконуються іншими, а у разі розвитку КА-ГПН виникає необхідність залучення нефрологів та/або інтенсivistів. В Україні існує нагальна необхідність інформування широкого лікарського загалу про суттєві зміни складових парадигми внутрішньосудинного застосування ЙВКР у клінічній практиці. У зв'язку з цим експертна група УАН і ФТН створила ці рекомендації щодо профілактики, діагностики та лікування КА-ГПН.

Перелік дефініцій, які використовуються у рекомендаціях, поданий в таблиці 1.

Таблиця 1

### Визначення/Термінологія

Термін	Визначення	Коментар
ГПН	Підвищення рівня креатиніну >26 мкмоль/л через 48 годин, АБО підвищення концентрації креатиніну на >50%, яке сформувалося протягом 7 попередніх днів, АБО виділення сечі <0,5 мл/кг/год протягом 6–12 годин	Стадії ГПН за ступенями тяжкості подано у Додатку 1, табл. Д1
ХХН	Наявність критеріїв ХХН KDIGO або зниження рШКФ < 60 мл/хв/1,73м <sup>2</sup>	Визначається на основі критеріїв ХХН KDIGO із розподілом за ступенем тяжкості за рівнем ШКФ СКD-EPI (додаток 1, табл. Д2, Д3)

**Mykola Kolesnyk**  
director@inephrology.kiev.ua.

Продовження таблиці 1

Термін	Визначення	Коментар
КА-ГПН	ГПН, яке виникло після внутрішньосудинного застосування ЙВКР, але може мати й інші причини, такі як гострий тубулярний некроз, гострий інтерстиціальний нефрит, атеросклероз або поєднуватися з якоюсь із інших патологій.	Термін «асоційоване» підкреслює, що виникнення ГПН не можна визнати пов'язаним тільки з внутрішньосудинним введенням ЙВКР

**Примітки:** ГПН, гостре пошкодження нирок; ЙВКР, йодовмісні контрастні речовини; КА-ГПН, контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок; ХХН, хронічна хвороба нирок; ШКФ, швидкість клубочкової фільтрації

**Скринінг.** Мета скринінгу – виявлення пацієнтів із ризиком зниження функції нирок (у тому числі формування КА-ГПН), після РКД, якому можна запобігти.

Накопичені протягом останнього часу дані дали можливість значно знизити рівень ризику виникнення КА-ГПН або прогресування ХХН, або ускладнення ХХН появою КА-ГПН, пов'язаного

з використанням ЙВКР; і в той же час продемонстрований негативний клінічний вплив відтермінування ЙВКР-візуалізації або візуалізації, виконаної без ЙВКР [6, 7].

**Хронічна хвороба нирок.** Найважливішим прогностичним фактором КА-ГПН є наявність у хворого ХХН. Ризик виникнення КА-ГПН слід стратифікувати відповідно до рШКФ-ЕРІ (табл. 2).

Таблиця 2

#### Градація та стратифікація ризику КА-ГПН залежно від рШКФ-ЕРІ

Градація ризику КА-ГПН	Стратифікація ризику
рШКФ $\geq 60$ мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	Дуже низький ризик
рШКФ 59 – 45 мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	Низький ризик
рШКФ 44 – 30 мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	Середній ризик
рШКФ $< 30$ мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	Високий ризик

Супутні захворювання, такі як діабет, застосування нефротоксичних ЛЗ, гіповолемія, застійна серцева недостатність (ЗСН), наявність однієї нирки, у тому числі трансплантованої, є фактором ризику КА-ГПН (табл. 3). Однак жоден із них не був незалежним від величини рШКФ [2, 8].

Таблиця 3

#### Фактори ризику КА-ГПН

Немодифіковані	Модифіковані
ХХН (чим більша стадія, тим вищий ризик)	Гіпотензія
Сепсис	Тип та об'єм рентгенконтрасту
Цукровий діабет без або з ураженням нирок	Гіпоальбумінемія ( $< 35$ г/л)
Фракція викиду ЛШ $< 35\%$	Анемія (Ht $< 35\%$ )
Серцева недостатність (III-IV NYHA і/або набряк легень в анамнезі)	Гіперглікемія
Передуюче РКД, застосування нефротоксичних ЛЗ (ІАПФ, діуретики, НПЛЗ, аміноглікозиди, ванкоміцин та ін.)	Гіперурикемія
Гострий інфаркт міокарда	
Кардіогенний шок	
Трансплантована нирка	
Системні хвороби сполучної тканини та васкуліти	
Вік ( $\geq 75$ років)	

**Примітки:** ІАПФ, інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту; ЛЗ, лікарські засоби; ЛШ, лівий шлуночок; НПЛЗ, нестероїдні протизапальні лікарські засоби, РКД, рентгенконтрастне дослідження; ХХН, хронічна хвороба нирок.

Загалом хворі на ХХН з рШКФ  $>30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> вважаються групами дуже низького, низького або середнього ризику (див. табл. 2). Лише пацієнти з ХХН та рШКФ  $\leq 30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>) і ті, у кого вже наявне ГПН, мають високий ризик подальшого погіршення функції нирок. Скринінг повинен встановити хворих з високим ризиком КА-ГПН для його профілактики до та після застосування ЙВКР.

**Амбулаторні пацієнти з відомою рШКФ:** якщо рШКФ відома, її слід використовувати для прийняття рішення щодо використання ЙВКР, якщо рШКФ невідома, а анамнез пацієнта вказує на захворювання нирок, її слід визначити. Для стабільного амбулаторного пацієнта рШКФ визначений протягом попередніх 3 місяців робоча група вважає прийнятним.

**Пацієнти екстреної медичної допомоги:** в умовах необхідності екстреної медичної допомоги детальний анамнез і рШКФ можуть бути недоступні. Слід спробувати визначити терміновість обстеження і прогноз для пацієнта у разі відтермінування дослідження для встановлення поточної функції нирок. Якщо у пацієнта життєзагрожуюча ситуація, не слід відмовлятися від обстеження з ЙВКР через побоювання КА-ГПН. Лікарі, які направляють пацієнта на дослідження або здійснюють його, повинні зважити переваги дослідження з контрастним підсиленням порівняно з ризиком розвитку КА-ГПН. Вважається, якщо ризик виникнення КА-ГПН від застосування ЙВКР несе більшу загрозу життю хворого, ніж відмова від нього, то слід розглянути використання інших методів візуалізації. Якщо ж інші методи візуалізації малоефективні у конкретному випадку, використання ЙВКР може бути найкращим варіантом для такого пацієнта.

Мета-аналіз літератури з невідкладної медицини та діагностики показує, що ризик розвитку КА-ГПН у таких умовах невисокий [9-11].

**Стаціонарні пацієнти:** робоча група рекомендує, щоб рішення про введення ЙВКР приймалося з урахуванням останньої рШКФ, отриманої не пізніше ніж за 7 днів до запланованого введення контрасту. Якщо рШКФ  $\leq 30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> або якщо є підозра на ГПН, лікар, який призначає дослідження пацієнту, повинен чітко вказати в направленні про його критичну необхідність для встановлення діагнозу та/або вибору методу лікування [12].

**Хворі на ГПН:** у пацієнтів з ГПН стратифікація ризику відповідно до функції нирок неможлива, оскільки визначення рШКФ є ненадійним [13, 14]. Хоча пацієнти з ГПН можуть бути більш вразливими до КА-ГПН, ніж пацієнти без ГПН, контрольовані дослідження не повідомляють про цей ризик [5]. Тим не менш, у цих пацієнтів потенційний ризик погіршення перебігу ГПН слід співвіднести з користю уникнення введення ЙВКР. Щодо використання інтраартеріального введення контраст-

ту у таких пацієнтів, хоча ризик погіршення перебігу ГПН може бути загалом вищим, застосування ЙВКР оправдане для здійснення діагностичних та/або лікувальних процедур, які потенційно можуть врятувати життя.

Таким чином, використання контрасту у пацієнтів із вже існуючим ГПН вимагає клінічної оцінки загальних ризиків, переваг та доступних альтернатив.

**Хворі на ХХН ВД:** ЙВКР використовують для обстежень хворих на ХХН ВД з анурією, оскільки ризик втрати функції нирок відсутній. Немає необхідності змінювати графік діалізу; діаліз виконується відповідно до заздалегідь визначеного графіку. Частина пацієнтів, які перебувають на ГД або ПД, мають резидуальну функцію нирок. Вважалося, що внутрішньосудинне введення ЙВКР може негативно вплинути на її рівень. Однак систематичний огляд досліджень [14] показує, що існує незначний вплив ЙВКР на залишкову функцію нирок (зважаючи на різниця в середніх значеннях  $-0,16$  мл/хв, 95% довірчий інтервал від  $-0,66$  до  $0,34$  мл/хв;  $P = 0,53$ ) [12].

Таким чином, наявність або відсутність резидуальної функції у хворих на ХХН ВД не повинно впливати на рішення про використання у них ЙВКР.

**Безпека введення повторного контрасту.** Враховуючи відсутність доказів з цього питання, експертна група вважає доцільним уникати повторного внутрішньовенного або інтраартеріального застосування ЙВКР протягом 48 годин у разі планових досліджень у пацієнтів групи високого ризику КА-ГПН (рШКФ  $\leq 30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>). Експертна група не рекомендує обмежувати повторні внутрішньовенні введення контрасту хворим у разі рШКФ  $\geq 30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> та відсутності ГПН. Експертна група не рекомендує відмовлятися від повторного введення ЙВКР для екстрених або госпіталізованих пацієнтів, якщо ситуація є загрозовою для життя, оскільки повторне введення ЙВКР може бути необхідним і виправданим для встановлення точного діагнозу та вибору лікування [5, 16-18].

**Інтраартеріальне введення контрасту.** Ризик КА-ГПН вищий за умови внутрішньоартеріального введення ЙВКР порівняно з його внутрішньовенним застосуванням ЙВКР [19]. Ризик КА-ГПН, перш за все у кардіологічних хворих, має бути оцінений з точки зору переваг запропонованого дослідження та ризиками, пов'язаними з альтернативною процедурою, яка не потребує інтраартеріального ЙВКР, якщо така існує. Для лікувальних інтервенцій, які потребують ЙВКР, альтернативи рідко доступні або клінічно прийнятні, і введення ЙВКР може бути необхідним навіть у ситуаціях високого ризику (наприклад, з рШКФ  $<30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>). Таке рішення має прийматися лікуючим лікарем після обговорення з пацієнтом, або сім'єю чи альтернативною особою, яка приймає рішення.

**Профілактичні заходи.** У пацієнтів з високим ризиком розвитку КА-ГПН важливо застосовувати профілактичні заходи, які базуються на доказах. Хоча запропоновано багато способів профілактики, єдиним доведеним втручанням для запобігання КА-ГПН є адекватне збільшення внутрішньосу-

динного об'єму. За даними досліджень, профілактика, заснована на індивідуалізованому підході до гідратації, демонструє позитивні результати. Важливо також враховувати функціональний стан нирок пацієнта, що дозволить оптимізувати гідратаційні втручання (табл. 4, 5).

Таблиця 4

## Ефективні стратегії превенції КА-ГПН

Стратегія	Коментар
1. Парентеральна гідратація	Забезпечення адекватної внутрішньовенної гідратації перед і після введення ЙВКР
2. Оптимізація об'єму ЙВКР	Застосування оптимального об'єму ЙВКР
3. Врахування осмолярності ЙВКР	Перевага надається використанню низько або ізоосмолярних ЙВКР
4. Застосування РКЛЗ, які не містять йод	Використання РКЛЗ, які не містять йод
5. Відміна нефротоксичних лікарських засобів	Рекомендується відмінити прийом НПЛЗ, аміноглікозидів, амфотерицину В, високих доз петльових діуретиків, противірусних засобів; їх використання слід припинити принаймні за 2 доби до введення ЙВКР у пацієнтів з середнім або високим ризиком розвитку КА-ГПН.

**Примітки:** КА-ГПН, контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок; НПЛЗ, нестероїдні протизапальні лікарські засоби; РКЛЗ, рентгеноконтрастні лікарські засоби.

Таблиця 5

## Стратифікація та превенція ризику КА-ГПН

Стратифікація ризику	Профілактика КА-ГПН
Дуже низький	Превентивні заходи без гідратації незалежно від шляху введення ЙВКР (табл. 4 п. 2-5).
Низький ризик	Превентивні заходи без гідратації незалежно від шляху введення ЙВКР (табл. 4 п. 2-5).
Середній ризик	Довенне введення ЙВКР – ентеральна або довенна гідратація (табл. 6) за наявності показань. Внутрішньоартеріальне введення – тільки довенна гідратація (табл. 6) за наявності показань. Превентивні заходи (табл. 4 п. 2-5).
Високий ризик	Довенна гідратація незалежно від шляху введення ЙВКР (табл. 6). Превентивні заходи (табл. 4 п. 2-5).

**Гідратація:** Є достатньо доказів високої якості, що у пацієнтів із рШКФ >30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, яким внутрішньосудинно застосовували ЙВКР, становлена незначна користь від внутрішньовенної гідратації порівняно з відсутністю гідратації [20, 21]. Немає достатніх доказів на підтримку або спростування поточної широко поширеної практики гідратації (в/в або пероральної) у разі рШКФ ≥ 30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>. Докази, що пероральна гідратація може бути такою ж ефективною, як і внутріш-

ньовенна гідратація низької якості [22]. Бракує доказів, які б підтверджували або спростовували використання гідратації для профілактики КА-ГПН у пацієнтів із високим ризиком (рШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>). Однак, робоча група рекомендує виконувати внутрішньовенну гідратацію до та після внутрішньосудинного введення ЙВКР (особливо інтраартеріального) за рШКФ < 30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, об'єм та тривалість якої визначається індивідуально (табл. 6).

Таблиця 6

## Гідратація для профілактики КА-ГПН

Метод гідратації	Рекомендації
Гідратація 0,9% розчином NaCl	Гідратація групи високого ризику незалежно від шляху введення ЙВКР – 1 мл/кг/год протягом 6 год до та після РКД хворих
	Гідратація групи середнього ризику – 1 мл/кг/год протягом 6 годин до та після РКД, у разі в/а введення ЙВКР
	Пацієнти з ХСН незалежно від групи ризику (особливо з ФВ < 35%) – 0,5 мл/кг/год протягом 6 год до та після РКД.
	Ургентне РКД, у разі неможливості встановити групу ризику і відсутності протипоказань – болюс 500-1000 мл перед та 1 мл/кг/год протягом 6 год після.

**Примітки:** РКД, рентгенконтрастне дослідження; ФВ, фракція викиду; ХСН, хронічна серцева недостатність.

Лікарі повинні бути обізнані з принципами рекомендацій для максимальної безпеки пацієнтів профілактики КА-ГПН та діяти відповідно до (табл. 7, 8).

Таблиця 7

## Рекомендації лікарю, який направляє на РКД

№	Рекомендації
1	Визначити функціональний стан нирок.
2	Встановити наявні фактори ризику розвитку КА-ГПН та групу ризику, і вказати їх у направленні на РКД.
3	За наявності середнього чи високого ступеня ризику розвитку КА-ГПН, залежно від шляху введення, забезпечити адекватну гідратацію до та після виконання РКД.
4	Забезпечити погодинний контроль діурезу протягом 48 годин після РКД.
5	Визначити функціональний стан нирок через 48 годин після виконання РКД та залежно від його результату забезпечити необхідне обстеження та/або лікування хворого.

**Примітки:** КА-ГПН, контраст-асоційоване гостре пошкодження нирок; РКД, рентгенконтрастне дослідження.

Таблиця 8

## Рекомендації лікарю-рентгенологу

№	Рекомендації
1	Визначити доцільність та можливість проведення РКД у конкретного хворого.
2	Отримати інформовану згоду пацієнта на виконання РКД.
3	Визначити необхідний тип контрасту та його об'єм.
4	Забезпечити контроль за станом хворого під час проведення РКД, своєчасно припинити його виконання у разі появи негативної симптоматики, а за необхідності надати екстренну медичну допомогу.

**Примітки:** РКД, рентгенконтрастне дослідження

**N-Ацетилцистеїн:** N-ацетилцистеїн (НАС) є муколітиком і може діяти як антиоксидант, регенеруючи глутатіон. Оскільки спочатку вважалося, що активні форми кисню беруть участь у патогенезі КІ-ГПН, було певне обґрунтування для застосування у цій ситуації. Початкове невелике рандомізоване клінічне дослідження (РКД) було обнадійливим і повідомляло про значну користь у зниженні частоти ГПН, і враховуючи те, що цей ЛЗ легко застосовувати, його використання стало широко поширеним [23]. За останнє десятиліття 2 великих РКД, які разом залучили понад 7000 пацієнтів, вирішили цю проблему, - використання НАС не захищає від

розвитку КА-ГПН [24, 25]. Таким чином, існують переконливі докази проти використання НАС для профілактики КА-ГПН [26, 27].

**Об'єм та характеристики контрасту:** Великі об'єми та повторне введення контрасту асоціювалися з вищим ризиком КА-ГПН [28, 29]. Однак, робоча група не рекомендує зниження об'єму внутрішньовенного введення контрасту з метою профілактики КА-ГПН, оскільки це зменшить якість контрастування. Робоча група рекомендує використовувати індивідуально визначений об'єм контрасту для отримання якісної візуалізації [30].

Фізико-хімічні характеристики ЙВКР визначають ступінь їх нефротоксичності. Ще кілька десятиліть тому використовувалися іонні високоосмолярні контрастні речовини з осмолярністю по-

над 1200 мОсм/л. З того часу були створені неіонні низькоосмолярні (осмолярність зазвичай ~600 мОсм/л), а також ізоосмолярні ЙВКР, які зараз широко застосовуються (табл. 9).

Таблиця 9

## Характеристики ЙВКР

Продукт	Генерична назва (концентрація в мг/мл)	Осмолярність (мосм/кг H <sub>2</sub> O)	Іонність	В'язкість за 25°C (мПа·с)	В'язкість за 37°C (мПа·с)	Іодид (мг/мл)
Omnipaque™ 140 (GE Healthcare)	Iohexol 302	322	Неіонний	2.3	1.5	140
Conray™ 30 (Covidien)	Iothalamate (300)	600	Іонний	2.0	1.5	141
Ultravist™ 150 (Bayer Healthcare)	Iohexol	328	Неіонний	2.3	1.5	150
Omnipaque™ 180 (GE Healthcare)	Iohexol 338	408	Неіонний	3.1	2.0	200
Isovue™ 300 (Bracco)	Iopamidol (400)	413	Неіонний	3.1	2.0	200
Conray™ 43 (Covidien)	Iothalamate (300)	1000	Іонний	3.0	2.0	202
Optiray™ 240 (Guerbet)	Ioversol (509)	520	Неіонний	4.8	3.0	240
Ultravist™ 240 (Bayer Healthcare)	Iohexol 518	524	Неіонний	5.1	3.0	250
Isovue™ 250 (Bracco)	Iopamidol (510)	483	Неіонний	4.8	2.8	250
Visipaque™ 270 (GE Healthcare)	Iodixanol (600)	290	Іонний	12.7	6.3	270
Conray™ (Covidien)	Iothalamate (600)	1400	Іонний	6.0	4.0	282
Isovue™ 300 (Bracco)	Iopamidol (612)	616	Неіонний	8.8	4.7	300
Omnipaque™ 300 (GE Healthcare)	Iohexol 640	672	Неіонний	11.3	6.2	300
Optiray™ 300 (Guerbet)	Ioversol (640)	651	Неіонний	8.2	5.5	300
Oxilan® 300 (Guerbet)	Iotrolan (623)	610	Неіонний	9.4	5.1	300
Ultravist™ 300 (Bayer Healthcare)	Iohexol 300	607	Неіонний	9.2	4.9	300
Hexabrix™ (Guerbet)	Iopamidol (589)	600	Іонний	15.7	7.5	320
Optiray™ 320 (Guerbet)	Ioversol (680)	702	Неіонний	9.9	5.8	320
Visipaque™ 320 (GE Healthcare)	Iodixanol (652)	290	Іонний	26.6	11.8	320
Optiray™ 350 (Guerbet)	Ioversol (740)	792	Неіонний	14.3	9.0	350
Omnipaque™ 350 (GE Healthcare)	Iohexol 350	844	Неіонний	20.4	10.4	350
Oxilan® 350 (Guerbet)	Iotrolan (727)	721	Неіонний	16.3	8.1	350
Isovue™ 370 (Bracco)	Iopamidol (760)	796	Неіонний	20.9	9.4	370
MD-76™ (Guerbet)	Dairizoate/ meglumine sodium (760)	1551	Іонний	16.4	10.0	370
Ultravist™ 370 (Bayer Healthcare)	Iohexol 370	774	Неіонний	22.0	10.0	370

Існують переконливі докази мета-аналізу з даними 31 РКД про те, що низькоосмолярний контраст менш нефротоксичний (менший ризик КА-ГПН ВР 0,61, 95% 0,48 – 0,77) порівняно з високоосмолярним контрастом [31]. Що стосується ізоосмолярних контрастів, дані літератури є неоднозначними [32].

Таким чином, вибір контрастної речовини між низько- та ізоосмолярними слід робити на основі інших міркувань (наприклад, вартості, доступності і т.п.).

Діалізна ниркова замісна терапія (ДНЗТ): ДЗНТ (гемодіаліз або гемофільтрація) вивчали як можливий профілактичний підхід, що є дещо парадоксальним, оскільки причиною запобігання КА-ГПН є саме уникнення діалізу та пов'язаної з ним захворюваності. Фізіологічно внутрішньовенно введений ЙВКР досягає нирки протягом кількох серцевих циклів, і подальше екстракорпоральне видалення циркулюючого контрасту навряд чи матиме будь-який позитивний ефект. ДНЗТ також знижує рівень креатиніну в сироватці крові, таким чином, призводячи до хибної зареєстрованої користі в результаті зниження креатиніну [33]. У систематичному огляді 2006 р. [34] та ще одному більшому наступному дослідженні [8] повідомлялося про відсутність користі від ДЗНТ.

На думку робочої групи, будь який метод ДЗНТ недоцільно застосовувати для профілактики КА-ГПН.

**Статини:** Статини були випробувані для запобігання КА-ГПН, в основному, в умовах коронарної ангіографії та черезшкірних коронарних втручань. Механізми, через які статини можуть забезпечувати ренопротекцію, окрім їхніх плейотропних ефектів невідомі [35, 36]. У зв'язку з цим, робоча група не рекомендує використовувати статини з метою профілактики КА-ГПН.

**Інші лікарські засоби (ЛЗ):** Декілька інших ЛЗ було випробувано для профілактики КА-ГПН, включаючи теофілін [37], простагландин Е1 [38], нікорандил [39], аскорбінову кислоту [40], алопуринол [41], альфа-токоферол [42], фенолдопам, натрійуретичні пептиди [35] і триметазидин [43]. Хоча деякі з цих досліджень повідомляють про ефективність, вони обмежені невеликою вибіркою або неясною користю щодо клінічних результатів. Отже, використання цих ЛЗ для профілактики КА-ГПН недоцільно.

### **Взаємодії з ЙВКР: метформін, інгібітори РААС, діуретики, ІНЗКТГ-2.**

**Метформін** не є фактором ризику розвитку КА-ГПН і внутрішньосудинне введення ЙВКР не протипоказане пацієнтам, які його отримують. Однак метформін-асоційований лактоацидоз (МАЛА) може виникнути у хворих, які приймають метформін та у яких згодом розвивається КА-ГПН.

Інструкція застосування метформіну (Merck Sante Corporation, Ліон, Франція) [44] рекомендує

припинити прийом метформіну перед будь-яким запланованим введенням контрасту, і лише через 48 годин відновити його після того, як буде підтверджено, що функція нирок стабільна. Загалом ці вказівки поступово були замінені менш обмежувальними рекомендаціями, оскільки накопичилися докази того, що, незалежно від функції нирок, загальний ризик МАЛА, спричинений накопиченням метформіну внаслідок КА-ГПН, є надзвичайно низьким за відсутності інших супутніх гострих захворювань, наприклад сепсису та/або ГПН.

У цьому контексті Посібник АСР щодо контрастних засобів [5] рекомендує, щоб у пацієнтів із рШКФ >30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> і без ознак ГПН прийом метформіну не припинявся до введення ЙВКР і немає необхідності проводити тестування для оцінки функції нирок після цього. Подібним чином Європейське товариство урогенітальної радіології, яке також раніше схвалювало більш консервативний підхід [45], тепер рекомендує продовжувати прийом метформіну перед введенням контрасту пацієнтам із вихідною рШКФ > 30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> (окрім пацієнтів з ГПН або тих, хто отримує контраст інтраартеріально) [46]. На нашу думку, такий менш обмежувальний підхід щодо метформіну є виправданим, оскільки ризик для хворих є низьким [47].

Ми вважаємо, що тільки у разі ГПН або рШКФ ≤ 30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> необхідно припинити прийом метформіну, оскільки застосування метформіну у цій ситуації несе високий ризик МАЛА незалежно від введення ЙВКР. Рекомендації щодо застосування метформіну залежно від рШКФ пацієнтів, які потребують РКД подано на рис. 1.

Інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (ІАПФ) і блокатори рецепторів ангіотензину (БРА) можуть спровокувати або погіршити перебіг ГПН. У нещодавньому систематичному огляді та мета-аналізі проаналізований вплив відміни інгібіторів АПФ/БРА перед коронарографією [48]. У цьому мета-аналізі зазначено, що припинення прийому інгібіторів АПФ/БРА не зменшує ризик ГПН (ОР 1,48, 95% ДІ 0,84, 2,60) [49].

На думку експертної групи, вирішення цього питання має базуватись на загальних принципах застосування ІАПФ або БРА.

Використання діуретиків є фактором ризику розвитку КА-ГПН [49], оскільки гіповолемія сприяє вищій ймовірності та більш тяжкому перебігу КА-ГПН; існують також ризики прийому діуретиків у пацієнтів, яким вони потрібні для підтримки еуволемії. Припинення прийому діуретиків у такому разі може призвести до перевантаження рідиною, що, окрім ризику набряку легень та інших негативних наслідків, може бути шкідливим для функції нирок [50, 51].

Отже, у який спосіб підтримувати у хворого стан еуволемії слід вирішувати індивідуально.

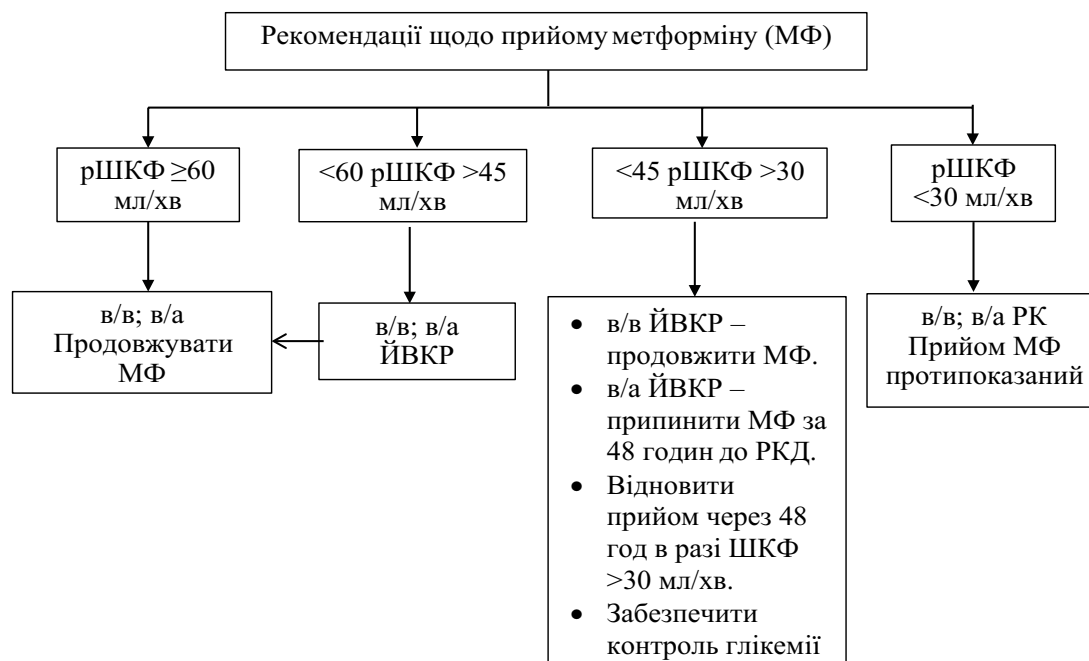


Рис. 1. Застосування метформіну перед РКД залежно від рШКФ пацієнта.

**Примітки:** *МФ, метформін; ЙВКР, йодовмісні контрастні речовини; рШКФ, розрахункова швидкість клубочкової фільтрації; РКД, рентгенконтрастне дослідження*

**Діагностика КА-ГПН.** КА-ГПН діагностується на основі визначення концентрації креатиніну сироватки через 48 годин після введення ЙВКР. Як правило, КА-ГПН визначається як підвищення креатиніну вище 26 мкмоль та/або зменшення діурезу <0,5мл/кг/год протягом 6-12 годин. На думку експертної групи визначення концентрації креатиніну сироватки крові рекомендується проводити лише через 48 годин та контролювати погодинний діурез після внутрішньосудинного введення ЙВКР (особливо інтраартеріального) у хворих із рШКФ  $\leq 30$  мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>. Для решти пацієнтів ризик КА-ГПН вважається достатньо низьким, тому вище згадане тестування невиправдане. Проте іншим пацієнтам із групи ризику слід повідомити про необхідність звернутися за медичною допомогою, якщо у них розвинеться задишка або периферичний набряк і/або вони помітять помітне зниження виділення сечі в наступні дні після процедури. Для встановлення діагнозу КА-ГПН слід використовувати критеріальність ГПН, запропоновану KDIGO [13]:

- Підвищення рівня креатиніну на 26,5 мкмоль/л протягом 48 годин після внутрішньосудинного введення контрасту, за умови відсутності інших причин.
- Підвищення рівня креатиніну в 1,5 рази відносно вихідного рівня, визначеного протягом останніх 7 діб.
- Зниження продукції сечі до <0,5 мл/кг/год протягом 6-12 годин після введення РК.

**Лікування КА-ГПН.** Оскільки КА-ГПН може бути викликана не тільки застосуванням ЙВКР, а в

тому числі будь-якою з відомих причин ГПН або їх поєднанням, то на думку експертної групи, об'єм лікування, моніторингу та його частоти, місце його проведення вирішує міждисциплінарна команда (лікуючий лікар, лікар-нефролог, лікар-інтенсивіст).

Ці рекомендації мають мету збалансувати ризики виникнення КА-ГПН, з своєчасною якісною діагностичною візуалізацією та вартістю РКД.

## РЕЗЮМЕ.

### 1. Стратифікація ризику КА-ГПН

- 1а. Визначення групи ризику за рШКФ-EPI з урахуванням факторів ризику перед введенням ЙВКР є обов'язковим.
- 1б. Переважна більшість пацієнтів, яким ЙВКР вводили внутрішньосудинно, не мали значного погіршення функції нирок чи необхідності застосування діалізу.
- 1в. Рішення про застосування ЙВКР має ґрунтуватись на оцінці співвідношення користі та шкоди від цього дослідження, – рШКФ чи концентрація креатиніну не можуть бути протипоказанням для застосування контрасту, їх величина є лише критерієм групи ризику.
- 1г. Основним фактором ризику КА-ГПН є рШКФ < 30 мл/хв/1.73 м<sup>2</sup>.

2. Для стаціонарних хворих або для пацієнтів, які потребують невідкладної допомоги рекомендується враховувати рШКФ протягом останніх 7 днів, у разі відсутності це не повинно затримувати екстрене візуалізаційне обстеження, якщо воно необхідне.

- 2а. За наявності невідкладної симптоматики (підозра на інсульт, тромбоемболію легеневої артерії, гострий аортальний синдром, ішемію або перфорація кишечника та інші стани), слід негайно розпочати дослідження з контрастуванням, не чекаючи результатів рШКФ.
- 2б. Застосування внутрішньовенного або інтраартеріального введення контрасту при вже існуючому ГПН має базуватись на співвідношенні ризику погіршення перебігу ГПН та переваги покращення діагностики та вибору адекватного лікування.
3. Якщо рШКФ >30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> і немає ознак і симптомів ГПН, слід виконати призначене контрастне дослідження. Якщо рШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> або є підозра на ГПН, рекомендується приймати індивідуальне рішення за участю команди, яка оцінює ризики КА-ГПН та ризики відстроченої або неоптимальної візуалізації.
4. Візуалізацію за допомогою ЙВКР можна проводити хворим на ХХНГД або ВПД незалежно від наявності чи відсутності резидуальної функції нирок без зміни графіку діалізу.
- Вибір контрасту**
5. Рекомендується використовувати низько або ізоосмолярний ЙВКР.
6. Не рекомендується зменшувати об'єм введення контрасту залежно від рШКФ, оскільки це знижує якість візуалізації і т.ч. погіршує діагностику і вибір адекватного лікування.
7. Не рекомендується обмежувати повторне внутрішньовенне введення ЙВКР пацієнтам із рШКФ >30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup> без ГПН або госпіталізованим хворим із загрозами для життя. Рекомендується уникати повторного контрастування протягом 48 годин для планових процедур, якщо пацієнти мають високий ризик КА-ГПН (рШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, інтраартеріальне введення ЙВКР). Однак у разі захворювання, яке загрожує життю, повторне введення ЙВКР може бути виправданим для встановлення діагнозу та визначення зберігаючого життя лікування.
- Профілактика КА-ГПН.**
8. Необхідність оральної або внутрішньовенної гідратації пацієнтів середнього ризику КА-ГПН, її об'єм і тривалість визначається індивідуально.
9. Хворим з рШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, яким планується внутрішньовенне введення ЙВКР, необхідність гідратації 0,9% розчином NaCl,
10. Для хворих із ШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, яким планується інтраартеріальне або довенне введення ЙВКР необхідна внутрішньовенна гідратація.
11. Приймати рішення щодо застосування низькоосмолярного або ізоосмолярного введення ЙВКР рекомендується виходячи з їх вартості та доступності.
12. Не рекомендується застосовувати будь-яку методику ДЗНТ для зниження ризику КА-ГПН перед або після застосування ЙВКР.
13. Не рекомендується використовувати ацетилцистеїн для профілактики КА-ГПН.
14. Не рекомендується застосовувати статини для профілактики КА-ГПН.
15. Не рекомендується використовувати теофілін, простагландин E1, нікорандил, аскорбінову кислоту, алопуринол, альфа-токоферол, фенолдопам, натрійуретичні пептиди та триметазидин для профілактики КА-ГПН.
16. У разі ШКФ <45>30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>:
- в/в РК – продовжити МФ
  - в/а РК – припинити МФ за 48 годин до РКД
  - Відновити прийом через 48 год в разі ШКФ >30 мл/хв.
  - Забезпечити контроль глікемії
17. Якщо ШКФ <30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>, – прийом МФ протипоказаний.
18. Рекомендації щодо припинення прийому ІАПФ та БРА до або після введення ЙВКР, мають базуватись на загальних принципах їх застосування.
19. Рекомендації щодо використання діуретиків до або після введення ЙВКР повинні базуватись на загальних принципах їх застосування.
20. Рекомендується визначення креатиніну сироватки крові та погодинного діурезу через 48годин після введення ЙВКР у всіх пацієнтів із ШКФ ≤30 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>. Проте будь-якого пацієнта з групи ризику слід проінструктувати про необхідність звернутися за медичною допомогою, якщо у нього посилиться задихка, з'являться набряки гомілок або зменшиться виділення сечі у наступні дні після візуалізаційного дослідження.
21. Діагностика КА-ГПН має базуватись на критеріях ГПН KDIGO:
- 21а Підвищення рівня креатиніну на 26,5 мкмоль/л протягом 48 годин після внутрішньосудинного введення контрасту, за умови відсутності інших причин.
- 21б Підвищення рівня креатиніну в 1,5 рази відносно вихідного рівня, визначеного протягом останніх 7 діб.
- 21в Зниження продукції сечі до <0,5 мл/кг/год протягом 6-12 годин після введення РК.
22. У разі появи ознак КА-ГПН, об'єм лікування, моніторингу, місце його здійснення вирішує мультидисциплінарна команда (лікуючий лікар, лікар-нефролог, лікар-інтенсivist). Оскільки КА-ГПН може бути викликана не тільки застосуванням ЙВКР, а в тому числі будь-якою з відомих причин ГПН або їх поєднанням, то на думку робочої групи, об'єм лікування, моніторингу та його частоти, місце його проведення вирішує міждисциплінарна команда (лікуючий лікар, лікар-нефролог, лікар-інтенсivist).

## Додаток 1

Таблиця Д1

## Стадії ГПН (вік більше 18-ти років)

Стадія	Креатинін крові	Діурез
I	Збільшення КС в 1,5–1,9 разів від попереднього або $\geq 26,5$ мкмоль/л	$< 0,5$ мл/кг/год тривалістю 6–12 год
II	Збільшення в 2,0–2,9 разів від попереднього	$< 0,5$ мл/кг/год тривалістю $> 12$ –24 год
III	Збільшення КС в 3 рази від попереднього або $\geq 353,6$ мкмоль/л, або початок діалізної ниркової замісної терапії (ДНЗТ)	$< 0,3$ мл/кг/год тривалістю $> 24$ год, або анурія $\geq 12$ год

Таблиця Д2

## Маркери ХХН (KDIGO 2012), адаптовано

№	Маркер	Примітки
1	Протеїнурія/Альбумінурія*	ДЕБ $> 300$ мг/доб, ДЕА $> 30$ мг/доб, ВАК $\geq 30$ мг/г; $\geq 3$ мг/ммоль
2	Зміни осаду сечі	Еритроцитурія/еритроцитарні циліндри, лейкоцитурія/лейкоцитарні циліндри
3	Лабораторні прояви тубулярних дисфункцій або синдромів	Патологічні зміни концентрації електролітів сироватки та/або сечі, порушення кислотно-лужної рівноваги.
4	Патогістологічні зміни	Ознаки ізольованих пошкоджень клубочків, каналців, інтерстицію або їх поєднання
5	Структурні зміни, встановлені методами візуалізації нирок та сечових шляхів	Камені, гідронефроз, кісти, збільшені або зменшені розміри нирок, асиметрія розмірів нирок, ретроперитонеальний фіброз і т.д.
6	Підвищення креатинемії більше верхньої межі норми або зниження рШКФ $< 60$ мл/хв./ $1,73$ м <sup>2</sup>	Поєднане з маркерами патологічних змін сечової системи або без них

Таблиця Д3

## Характеристика стадій ХХН за рівнем рШКФ

Стадія	Опис стадії	рШКФ (мл/хв./ $1,73$ м <sup>2</sup> )
ХХН-I	Ураження нирок з нормальною або збільшеною швидкістю клубочкової фільтрації	$\geq 90$
ХХН-II	Ураження нирок з незначним зниженням рШКФ	60–89
ХХН-IIIa	рШКФ незначно або помірно знижена	45–59
ХХН-IIIб	рШКФ помірно або виражено знижена	30–44
ХХН-IV	Виражено знижена рШКФ	15–29
ХХН-V	Ниркова недостатність	$< 15$

**Література:**

1. ACR Manual on Contrast Media 2024 ACR Committee on Drugs and Contrast Media. Copyright 2024 American College of Radiology. [Internet]. 2024;117. Available from: [https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast\\_Media.pdf](https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast_Media.pdf).
2. McDonald JS, McDonald RJ, Carter RE, Katzberg RW, Kallmes DF, Williamson EE. Risk of intravenous contrast material-mediated acute kidney injury: a propensity score-matched study stratified by baseline-estimated glomerular filtration rate. *Radiology*. 2014;271:65-73. doi: 10.1148/radiol.13130775.
3. Davenport MS, Perazella MA, Yee J, Dillman JR, Fine D, McDonald RJ, et al. Use of Intravenous Iodinated Contrast Media in Patients with Kidney Disease: Consensus Statements from the American College of Radiology and the National Kidney Foundation. *Radiology*. 2020;294:660-668. doi: 10.1148/radiol.2019192094.
4. Rudnick MR, Leonberg-Yoo AK, Litt HI, Cohen RM, Hilton S, Reese PP. The Controversy of Contrast-Induced Nephropathy With Intravenous Contrast: What Is the Risk? *Am J Kidney Dis*. 2020;75:105-113. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.05.022.
5. ACR Committee on Drugs Contrast Media. ACR Manual on Contrast Media. 10.3. American College of Radiology. [Internet]. 2021. Available from: <https://www.radiologyofindiana.com/wp-content/uploads/2021/07/ACR-Manual-on-Contrast-Media-2021.pdf>.
6. Owen RJ, Hiremath S, Myers A, Fraser-Hill M, Barrett BJ. Canadian Association of Radiologists consensus guidelines for the prevention of contrast-induced nephropathy: update 2012. *Can Assoc Radiol J*. 2014;65:96-105. doi: 10.1016/j.carj.2012.11.002.
7. Chertow GM, Normand S-LT, McNeil BJ. "Renalism": Inappropriately Low Rates of Coronary Angiography in Elderly Individuals with Renal Insufficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2462-2468. doi: 10.1097/01.ASN.0000135969.33773.0B.
8. Reinecke H, Fobker M, Wellmann J, Becke B, Fleiter J, Heitmeyer C, et al. A randomized controlled trial comparing hydration therapy to additional hemodialysis or N-acetylcysteine for the prevention of contrast medium-induced nephropathy. *Clin Res Cardiol*. 2007;96:130-139. doi: 10.1007/s00392-007-0473-4.
9. Wilhelm-Leen E, Montez-Rath ME, Chertow G. Estimating the Risk of Radiocontrast-Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:653-659. doi: 10.1681/ASN.2016010021.
10. Brinjikji W, Demchuk AM, Murad MH, Rabinstein AA, McDonald RJ, McDonald JS, et al. Neurons Over Nephrons. *Stroke*. 2017;48:1862-1868. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.016771.
11. Caspi O, Habib M, Cohen Y, Kerner A, Roguin A, Abergel E, et al. Acute Kidney Injury After Primary Angioplasty: Is Contrast-Induced Nephropathy the Culprit? *J Am Heart Assoc*. 2017;6 (6):e005715. doi: 10.1161/JAHA.117.005715.
12. Neilipovitz J, Rosenberg H, Hiremath S, Savage DW, Ohle R, Alaref A, et al. CJEM Debate Series: contrast-enhanced imaging should not be withheld for emergency department patients as contrast-induced acute kidney injury is very uncommon. *Can J Emerg Med*. 2021;23:432-436. doi: 10.1007/s43678-021-00126-7.
13. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep*. 2012; 2:1-138. doi:10.1038/kisup.2012.6
14. Kolesnyk M, Stepanova N, Krasnyuk E, Liksunova L, Semenyuk R, Kostinenko T. Prevention, diagnosis and management of acute kidney injury: Adapted clinical guidelines of the Ukrainian Association of Nephrologists and Kidney Transplant Specialists. *Ukr J Nephrol Dial*. 2021;1(69):6-15. doi: 10.31450/ukrjnd.1(69).2021.02.
15. Newhouse JH, Kho D, Rao QA, Starren J. Frequency of serum creatinine changes in the absence of iodinated contrast material: implications for studies of contrast nephrotoxicity. *Am J Roentgenol*. 2008;191:376-382. doi: 10.2214/AJR.07.3280.
16. Trivedi H, Foley WD. Contrast-induced nephropathy after a second contrast exposure. *Ren Fail*. 2010;32:796-801. doi: 10.3109/0886022X.2010.495441.
17. Abujudeh HH, Gee MS, Kaewlai R. In Emergency Situations, Should Serum Creatinine Be Checked in All Patients Before Performing Second Contrast CT Examinations Within 24 Hours? *J Am Coll Radiol*. 2009;6:268-273. doi: 10.1016/j.jacr.2008.09.014.
18. Thomsen HS, Morcos SK, Barrett BJ. Contrast-induced nephropathy: the wheel has turned 360 degrees. *Acta radiologica*. 2008;49:646-657. doi: 10.1080/02841850801995413.
19. Schönenberger E, Martus P, Bossert M, Zimmermann E, Tauber R, Laule M, et al. Kidney Injury after Intravenous versus Intra-arterial Contrast Agent in Patients Suspected of Having Coronary Artery Disease: A Randomized Trial. *Radiology*. 2019;292:664-672. doi: 10.1148/radiol.2019182220.

20. *Nijssen EC, Rennenberg RJ, Nelemans PJ, Essers BA, Janssen MM, Vermeeren MA, et al.* Prophylactic hydration to protect renal function from intravascular iodinated contrast material in patients at high risk of contrast-induced nephropathy (AMACING): a prospective, randomised, phase 3, controlled, open-label, non-inferiority trial. *Lancet.* 2017;389:1312-1322. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30057-0.
21. *Timal RJ, Kooiman J, Sijpkens YWJ, de Vries JPM, Verberk-Jonkers IJAM, Brulez HFH, et al.* Effect of no prehydration vs sodium bicarbonate prehydration prior to contrast-enhanced computed tomography in the prevention of postcontrast acute kidney injury in adults with chronic kidney disease. *JAMA Intern Med.* 2020;180 (4):533-541. doi: 10.1001/jamainternmed.2019.7428.
22. *Hiremath S, Akbari A, Shabana W, Fergusson DA, Knoll GA.* Prevention of contrast-induced acute kidney injury: is simple oral hydration similar to intravenous? A systematic review of the evidence. *PLoS One.* 2013;8:e60009. doi: 10.1371/journal.pone.0060009.
23. *Weisbord SD, Gallagher M, Jneid H, Garcia S, Cass A, Thwin SS, et al.* Outcomes after Angiography with Sodium Bicarbonate and Acetylcysteine. *N Engl J Med.* 2018;378:603-614. doi: 10.1056/NEJMoa1710933.
24. *Huang JW, Lahey B, Clarkin OJ, Kong J, Clark E, Kanji S, et al.* A systematic review of the effect of N-Acetylcysteine on serum creatinine and cystatin C measurements. *Kidney International Reports.* 2021;6(2):396-403. doi: 10.1016/j.ekir.2020.11.018.
25. *Merten GJ, Burgess WP, Gray LV, Holleman JH, Roush TS, Kowalchuk GJ, et al.* Prevention of Contrast-Induced Nephropathy With Sodium Bicarbonate. *JAMA.* 2004;291:2328-2334. doi: 10.1001/jama.291.19.2328.
26. *Brar SS, Aharonian V, Mansukhani P, Moore N, Shen AY, Jorgensen M, et al.* Haemodynamic-guided fluid administration for the prevention of contrast-induced acute kidney injury: the POSEIDON randomised controlled trial. *Lancet.* 2014;383:1814-1823. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60689-9.
27. *McCudden C, Clark EG, Akbari A, Kong J, Kanji S, Hiremath S.* N-Acetylcysteine Interference With Creatinine Measurement: An In Vitro Analysis. *Kidney International Reports.* 2021;6:1973-1976. doi: 10.1016/j.ekir.2021.04.006.
28. *Nyman U, Almén T, Aspelin P, Hellström M, Kristiansson M, Sterner G.* Contrast-medium-Induced nephropathy correlated to the ratio between dose in gram iodine and estimated GFR in ml/min. *Acta radiologica.* 2005;46:830-842. doi: 10.1080/02841850500335051.
29. *Aoun J, Nicolas D, Brown JR, Jaber BL.* Maximum allowable contrast dose and prevention of acute kidney injury following cardiovascular procedures. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27:121-129. doi: 10.1097/MNH.0000000000000389.
30. *Kidoh M, Nakaura T, Nakamura S, Awai K, Utsunomiya D, Namimoto T, et al.* Novel contrast-injection protocol for coronary computed tomographic angiography: contrast-injection protocol customized according to the patient's time-attenuation response. *Heart Ves.* 2014;29:149-155. doi: 10.1007/s00380-013-0338-x.
31. *Barrett BJ, Carlisle EJ.* Metaanalysis of the relative nephrotoxicity of high- and low-osmolality iodinated contrast media. *Radiology.* 1993;188:171-178. doi: 10.1148/radiology.188.1.8511292.
32. *Aspelin P, Aubry P, Fransson S-G, Strasser R, Willenbrock R, Berg KJ.* Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N Engl J Med.* 2003;348:491-499. doi: 10.1056/NEJMoa021833.
33. *Marenzi G, Marana I, Lauri G, Assanelli E, Grazi M, Campodonico J, et al.* The prevention of radiocontrast-agent-induced nephropathy by hemofiltration. *N Engl J Med.* 2003;349:1333-1340. doi: 10.1056/NEJMoa023204.
34. *Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, Corradi V, de Cal M, Kuang D, et al.* Extracorporeal blood purification therapies for prevention of radiocontrast-induced nephropathy: a systematic review. *Am J Kidney Dis.* 2006;48:361-371. doi: 10.1053/j.ajkd.2006.05.023.
35. *Su X, Xie X, Liu L, Lv J, Song F, Perkovic V, et al.* Comparative Effectiveness of 12 Treatment Strategies for Preventing Contrast-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2017;69:69-77. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.07.033.
36. *Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, et al.* Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3:514-525. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00040-6.
37. *Bagshaw SM, Ghali WA.* Theophylline for prevention of contrast-induced nephropathy. *Arch Intern Med.* 2005;165 (10):1087-1093. doi: 10.1001/archinte.165.10.1087.
38. *Geng N, Zou D, Chen Y, Ren L, Xu L, Pang W, et al.* Prostaglandin E1 administration for prevention of contrast-induced acute kidney injury. *Medicine.* 2018;97(29):e11416. doi: 10.1097/MD.00000000000011416.

39. *Ma X, Li X, Jiao Z, Zhang Y.* Nicorandil for the prevention of contrast-induced nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cardiovasc Ther.* 2018;36(2):e12316. doi: 10.1111/1755-5922.12316.
40. *Sadat U, Usman A, Gillard JH, Boyle JR.* Does ascorbic acid protect against contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62 (23):2167-75. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.065.
41. *Bellos I, Iliopoulos DC, Perrea DN.* Allopurinol administration for the prevention of contrast-induced nephropathy: A Network Meta-analysis With Trial Sequential Analysis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019;73 (5):307-315. doi: 10.1097/FJC.0000000000000663.
42. *Monami M, Cignarelli A, Pinto S, D'Onofrio L, Milluzzo A, Miccoli R, et al.* Alpha-tocopherol and contrast-induced nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Vitam Nutr Res.* 2021;91 (1-2):188-196. doi: 10.1024/0300-9831/a000573.
43. *Ye Z, Lu H, Su Q, Guo W, Dai W, Li H, et al.* Clinical effect of trimetazidine on prevention of contrast-induced nephropathy in patients with renal insufficiency. *Medicine.* 2017;96 (9):e6059. doi: 10.1097/MD.00000000000006059.
44. Pharmacists Association Canadian. *Glucophage.* In: *Compendium of Pharmaceuticals and Specialities: The Canadian Drug Reference for Health Professionals.* Ottawa, ON: Canadian Pharmacists Association; 2020.
45. *Morcos SK, Thomsen HS, Webb JAW.* Contrast-media-induced nephrotoxicity: a consensus report. *Eur Radiol.* 1999;9 (8):1602-13. doi: 10.1007/s003300050894.
46. *Stacul F, van der Molen AJ, Reimer P, Webb JA, Thomsen HS, Morcos SK, et al.* Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. *Eur Radiol.* 2011;21(12):2527-41. doi: 10.1007/s00330-011-2225-0.
47. *Thomsen HS, Morcos SK.* Contrast media and metformin: Guidelines to diminish the risk of lactic acidosis in non-insulin-dependent diabetics after administration of contrast media. *Eur Radiol.* 1999;9(4):738-40. doi: 10.1007/s003300050746.
48. *Whiting P, Morden A, Tomlinson LA, Caskey F, Blakeman T, Tomson C, et al.* What are the risks and benefits of temporarily discontinuing medications to prevent acute kidney injury? A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2017;7(4):e012674. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012674.
49. *Davenport MS, Khalatbari S, Cohan RH, Dillman JR, Myles JD, Ellis JH.* Contrast Material-induced Nephrotoxicity and Intravenous Low-Osmolality Iodinated Contrast Material: Risk Stratification by Using Estimated Glomerular Filtration Rate. *Radiology.* 2013;268 (3):719-28. doi: 10.1148/radiol.13122276.
50. *Perner A, Prowle J, Joannidis M, Young P, Hjortrup PB, Pettilä V.* Fluid management in acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):807-815. doi: 10.1007/s00134-017-4817-x.
51. *James M, Bouchard J, Ho J, et al.* Canadian society of nephrology commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(5):673-85. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.02.350.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

## Founder:

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

## Case Report

**João Ferreira Guerra, João Magalhães Pina, Vanessa Andrade, Miguel Brito Lança, Luís Campos Pinheiro**

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.02

## Renal carcinoma associated with end-stage kidney disease: A case series from a tertiary Portuguese hospital

Hospital de São José, Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, Lisbon, Portugal

## Citation:

Guerra JF, Magalhães Pina J, Andrade V, Lança MB, Campos Pinheiro L. Renal carcinoma associated with end-stage kidney disease: A case series from a tertiary Portuguese hospital. *Ukr J Nephrol Dialys.* 2024;4(84):17-22. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.02.

**Abstract.** *End-stage kidney disease (ESKD) is associated with a higher incidence of renal cell carcinoma (RCC). Here we report a case series of 56 patients with ESKD who underwent radical nephrectomy for suspected renal masses at a tertiary hospital in Portugal from January 2017 to January 2024. Patient records were reviewed retrospectively to collect clinical, surgical, and pathological data. Among these patients, 12 had benign tumors, while 44 were diagnosed with malignant tumors, accounting for approximately 78.5% of the cohort. The histological analysis revealed the following distribution: clear cell RCC (20 cases, 45%), papillary RCC (11 cases, 25%), ACKD-associated RCC (6 cases, 14%), clear cell papillary RCC (4 cases, 9%), and chromophobe RCC (3 cases, 7%). Notably, the majority of patients (95.5%) had stage I malignant tumors, yet the prognosis for patients with ESKD was poorer compared to non-ESKD patients, with 7 patients succumbing during the follow-up period.*

*This study underscores the complex relationship between ESKD and RCC, highlighting the challenges in diagnosis and management. Despite regular monitoring leading to early detection of tumors, the overall prognosis remains adversely affected by the compromised immune status and comorbid conditions prevalent in this population. The findings call for enhanced surveillance and personalized management strategies for RCC in patients with ESKD.*

**Keywords:** *end-stage kidney disease, renal cell carcinoma, acquired cystic kidney disease, hemodialysis, pathology.*

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© J. F. Guerra, J. Magalhães Pina, V. Andrade, M. B. Lança, L. Campos Pinheiro, 2024.

Correspondence should be addressed to João Ferreira Guerra: [joaoguerra93@gmail.com](mailto:joaoguerra93@gmail.com)

## Article history:

Received September 05, 2024

Received in revised form

October 03, 2024

Accepted October 05, 2024



© Герра Ж. Ф., Магальяйнш Піна Ж., Андраде В., Ланча М. Б., Кампос Пінъейру Л., 2024.

УДК: 616.61-006.6:616.61-036.12(469)

Жоао Феррейра Герра, Жоао Магальяйнш Піна, Ванесса Андраде,  
Мігель Бріто Ланча, Луїс Кампос Пінъейру

## Карцинома нирки, асоційована з термінальною стадією хронічної хвороби нирок: серія клінічних випадків із високоспеціалізованої лікарні Португалії

Клініка Сан-Хосе, Центральна Лісабонська лікарня та університетський центр, Лісабон, Португалія

**Резюме.** Термінальна стадія хронічної хвороби нирок (ХХН ВД) асоційована з високою частотою нирково-клітинної карциноми (НКК). У цій роботі ми повідомляємо про серію випадків із 56 пацієнтів з ХХН ВД, які перенесли радикальну нефректомію з приводу підозри на новоутворення в нирках у високоспеціалізованій лікарні Португалії з січня 2017 по січень 2024. Записи пацієнтів були ретроспективно переглянуті для збору клінічних, хірургічних і патологічних даних. Серед включених пацієнтів 12 мали доброякісні пухлини, тоді як у 44 були діагностовані злоякісні пухлини, що становило 78,5% когорти. Гістологічний аналіз виявив таку структуру випадків: світлоклітинна карцинома нирки (20 випадків, 45%), папілярна карцинома нирки (11 випадків, 25%), карцинома нирки, асоційована з набутим кістозним захворюванням нирок (6 випадків, 14%), світлоклітинна папілярна карцинома нирки (4 випадки, 9%) та хромофобна карцинома нирки (3 випадки, 7%). Примітно, що більшість пацієнтів (95,5%) мали злоякісні пухлини I стадії, але прогноз був гіршим порівняно з пацієнтами без ХХН ВД: 7 пацієнтів померли протягом періоду спостереження.

Наше дослідження підкреслює складний зв'язок між ХХН ВД та НКК, висвітлюючи проблеми в діагностиці та лікуванні. Незважаючи на регулярний моніторинг, результатом якого є ріння діагностика новоутворення, загальний прогноз залишається несприятливим через імунodefіцит і супутні захворювання, поширені в цій популяції. Отримані результати вимагають посиленого спостереження та персоналізованих стратегій лікування НКК у пацієнтів із ХХН ВД.

**Ключові слова:** термінальна стадія хронічної хвороби нирок, нирково-клітинний рак, набута кістозна хвороба нирок, гемодіаліз, патологія.

**Introduction.** Chronic kidney disease (CKD) is a progressive condition marked by a gradual decline in kidney function over time. It involves various pathophysiological processes that lead to impaired kidney function and a reduced glomerular filtration rate. In advanced stages, CKD can progress to end-stage kidney disease (ESKD), where kidneys fail to perform essential functions, resulting in the accumulation of toxins, fluids, and electrolytes in the body. This uremic syndrome requires renal replacement therapy, typically through dialysis or kidney transplantation, to sustain life [1, 2].

ESKD is a growing public health concern, affecting millions globally. The prevalence of ESKD has risen due to increased incidences of diabetes and hypertension, both primary risk factors for CKD. ESKD patients encounter numerous complications, including elevated risks of cardiovascular disease, infections, and various malignancies, such as renal cell carcinoma (RCC) [3].

RCC is the most common kidney cancer, accounting for approximately 85% of kidney malignancies. ESKD patients, particularly those with acquired cystic

kidney disease (ACKD), are at a significantly higher risk of RCC. The likelihood of RCC in patients with ACKD, a condition marked by multiple kidney cysts from long-term dialysis, is estimated to be 3–24 times higher than in the general population [4–6].

The development of RCC in ESKD patients is multifaceted, with chronic inflammation, oxidative stress, and genetic mutations playing critical roles. Long-term dialysis contributes to toxin and free radical buildup, leading to chronic inflammation and oxidative stress, which can damage cellular DNA and promote oncogenesis. Genetic mutations, such as changes in the von Hippel-Lindau (VHL) gene, may also be exacerbated by chronic oxidative stress and inflammation in ESKD patients [6–8].

Advances in RCC classification have highlighted distinct subtypes of RCC in ESKD patients. The 2016 World Health Organization (WHO) classification introduced new RCC subtypes, including acquired cystic disease-associated RCC (ACD-associated RCC) and clear cell papillary RCC (CCP-RCC), which have unique histological and clinical profiles and are particularly relevant to ESKD patients [9].

This case series study describes the clinical and histopathological characteristics of renal tumors in native kidneys of ESKD patients treated at a tertiary Portuguese hospital.

**Case series.** A total of 56 ESKD patients who underwent radical nephrectomy for suspected renal masses

João Ferreira Guerra  
joaoguerra93@gmail.com

at a tertiary Portuguese hospital between January 2017 and January 2024 were included in this report. Patient records were reviewed retrospectively to gather clinical, surgical, and pathological data, focusing on RCC types and their association with long-term dialysis. The hospital's Institutional Review Board approved the study, waiving informed consent due to its retrospective nature. Patient confidentiality was maintained, with all data anonymized per the Declaration of Helsinki and local ethical guidelines.

Of these patients, 12 had benign tumors, including multilocular cystic renal neoplasm, acquired cystic kidney disease (ACKD), and oncocytomas. Malignant tumors were found in 44 patients, accounting for approximately 78.5% of those who underwent surgery. The histological types included clear cell RCC (20 cases, 45%), papillary RCC (11 cases, 25%), ACKD-associated RCC (6 cases, 14%), clear cell papillary RCC (4 cases, 9%), and chromophobe RCC (3 cases, 7%) (Fig. 1).

The majority of malignant tumors were classified as stage I (42 cases), with one case each of stages II and III. The median follow-up period was 40.4 months, during which 7 deaths were recorded. The median age of ESKD patients with malignant tumors was 60 years

(IQR 47–73), with a male-to-female ratio of 1.59. Detailed patient and pathological characteristics are shown in Table 1.

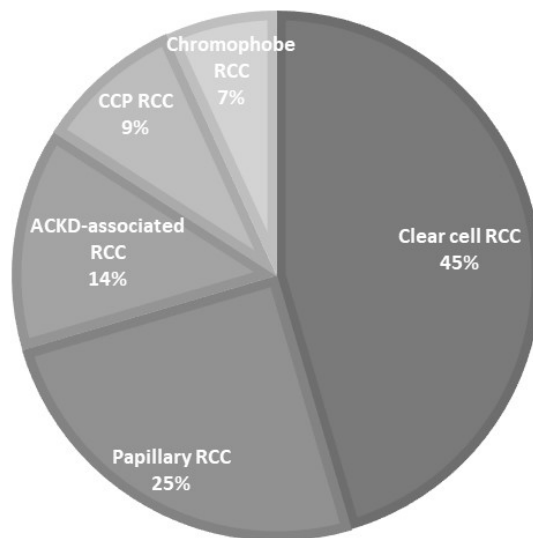


Fig. 1. Distribution of histological subtypes of RCCs in patients with ESKD from our study.

Table 1

**Clinical and pathological features of patients with ESKD and renal tumors**

No. of patients		44
Age, years (range)		60 [IQR 47-73] (45-94)
Sex (%)	Male	27 (61)
	Female	17 (39)
ECOG Performance Status (%)	0	26 (59)
	1	16 (36)
	≥2	2 (5)
Etiology of ESKD (%)	Diabetes Mellitus	6 (14)
	Hypertension	12 (27)
	Nephrotic Conditions	3 (7)
	Focal Segmental Glomerulosclerosis	2
	Membranous Nephropathy	1
	Nephritic Conditions	13 (29)
	Chronic Glomerulonephritis	3
	Lupus Nephritis	3
	IgA Nephropathy	1
	Membranoproliferative glomerulonephritis	1
	Wegener's Granulomatosis	1
	Hemolytic Uremic Syndrome	4
	Polycystic Kidney Disease	4 (9)
Unknown/Unclear Causes	6 (14)	
Median duration from the onset of renal replacement therapy to tumor diagnosis, years		14 [IQR 11]
Duration of dialysis, years (%)	<10	18 (41)
	≥10	26 (59)
Median tumor size, cm (range)		3,5 (0,5-16)

Continuation of Table 1

Pathological stage (%)	stage I	42 (96)
	stage II	1 (2)
	stage III	1 (2)
pT (%)	p1a	31 (71)
	p1b	11 (25)
	p2a	0 (0)
	p2b	1 (2)
	p3a	1 (2)
	p3b	0 (0)
Histology (%)	Clear cell RCC	20 (45)
	Papillary RCC	11 (25)
	ACKD-associated RCC	6 (14)
	CCP RCC	4 (9)
	Chromophobe RCC	3 (7)
Median follow-up, months		40.4 [IQR 18]

The median duration from the onset of renal replacement therapy to tumor diagnosis was 14 years (IQR 11). Figure 2 shows the RCC subtype distribu-

tion relative to dialysis duration. Immunosuppressive therapy did not appear to significantly influence RCC development in post-transplant patients.

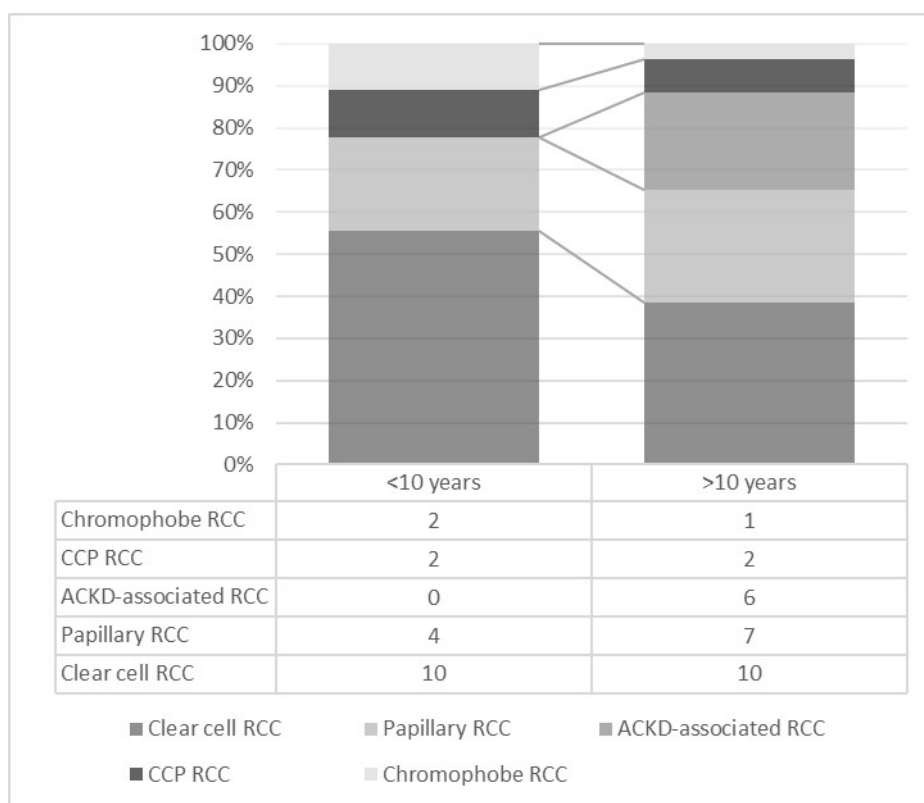


Fig. 2. Distribution of histological subtypes of RCCs in patients with ESKD according to dialysis duration

**Discussion.** The relationship between ESKD and RCC is multifaceted, involving both the underlying pathophysiological changes associated with chronic kidney disease and the effects of long-term renal replacement therapy. The incidence of RCC in patients with ESKD is significantly higher than in the general population, and this increased risk is particularly pro-

nounced in patients with ACKD. ACKD is characterized by the development of multiple cysts in the kidneys, which can undergo malignant transformation over time. The pathogenesis of RCC in ESKD patients is thought to be driven by several factors, including chronic inflammation, oxidative stress, and genetic mutations [6, 10, 11].

Chronic inflammation in ESKD patients is a well-documented phenomenon, resulting from the accumulation of uremic toxins and the presence of dialysis-related factors. This chronic inflammatory state can lead to cellular damage and promote oncogenesis. Oxidative stress, which is elevated in ESKD patients due to impaired renal function and dialysis, further contributes to DNA damage and the development of RCC. Additionally, genetic mutations commonly observed in RCC, such as alterations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene, can be exacerbated by the chronic oxidative stress and inflammation present in ESKD [4, 7].

Recent classifications by the World Health Organization (WHO) have identified new subtypes of RCC that are particularly relevant to ESKD patients, including ACKD-associated RCC and clear cell papillary RCC (CCP-RCC). ACKD-associated RCC is almost exclusively found in patients who have undergone long-term hemodialysis, as we also observed in our data. Histologically, these tumors exhibit a cribriform or sieve-like architecture, with abundant eosinophilic cytoplasm and large nuclei with prominent nucleoli. The presence of calcium oxalate crystals is a distinctive feature of ACKD-associated RCC, aiding in its diagnosis. CCP-RCC, on the other hand, is characterized by its clear cells and papillary architecture, and it is typically associated with a less aggressive clinical course [12-14].

Patients with ESKD who develop RCC often present with smaller, less aggressive tumors compared to the general population. This can be attributed to the frequent monitoring and imaging that ESKD patients undergo as part of their routine care. However, despite the typically indolent nature of these tumors, the overall prognosis for ESKD patients with RCC is poorer compared to non-ESKD patients. This is due to several factors, including the compromised immune status of ESKD patients, which can hinder the body's ability to mount an effective anti-tumor response, and the presence of other comorbidities that complicate treatment [15, 16]. This was evident in our study, where the vast majority (95.5%) of patients had stage I malignant tumors due to regular monitoring, yet 7 patients died during the follow-up period.

The management of RCC in ESKD patients requires careful consideration of their overall health status and the risks associated with surgery. Nephrectomy remains the primary treatment for localized RCC. However, the decision to proceed with surgery must balance the potential benefits of tumor removal with the risks posed by the patient's compromised renal function and overall health. The risk of RCC recurrence in ESKD patients is influenced by several factors, including tumor stage, histological subtype, and the patient's overall health. Studies have shown that while the stage-specific recurrence-free survival for ESKD-RCC patients is similar to that of non-ESKD patients, cancer-specific and overall survival rates are significantly lower. This underscores the need for vigilant follow-up and monitoring in this high-risk population. Regular imaging and

clinical evaluations are essential to detect recurrences early and to manage them promptly [6].

The immune system of ESKD patients is often compromised due to both the disease itself and the immunosuppressive therapy used in patients with kidney transplants. This immunosuppression can facilitate the development and progression of RCC by allowing tumor cells to evade immune surveillance. Furthermore, metabolic disturbances common in ESKD, such as hyperparathyroidism and altered calcium-phosphate metabolism, can contribute to the pathogenesis of RCC [5, 11].

Further research is needed to better understand the unique characteristics of RCC in ESKD patients and to develop targeted therapies that address the specific needs of this population. Advances in molecular and genetic profiling of tumors may lead to more personalized treatment approaches, improving outcomes for ESKD patients with RCC. Additionally, the potential role of novel immunotherapies and targeted therapies in the treatment of ESKD-RCC warrants exploration, given the unique immunological environment in these patients.

**Conclusions.** RCC in ESKD patients presents unique challenges and requires a multidisciplinary approach for optimal management. The increasing incidence of RCC in this population highlights the importance of regular screening and early detection, as well as the need for tailored treatment strategies that consider the patient's overall health. By improving our understanding of the underlying mechanisms and risk factors associated with RCC in ESKD, we can develop more effective interventions and improve the prognosis for these patients.

**Conflicts of interest statement.** The authors have no conflict of interest to declare.

**Funding sources.** All authors have declared that no financial support was received from any organization for the submitted work.

**Data availability statement.** The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### **The authors' contributions.**

**João Guerra:** conceptualization and study design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafting of the manuscript, and critical review;

**Vanessa Andrade:** conceptualization and study design, drafting of the manuscript, and critical review;

**Miguel Brito Lança:** data acquisition, analysis, and interpretation;

**João Pina:** drafting of the manuscript, supervision;

**Luís Campos Pinheiro:** critical review and supervision.

All the authors reviewed the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

**References:**

1. *Elendu C, Elendu RC, Enyong JM, Ibhiedu JO, Ishola IV, Egbunu EO, et al.* Comprehensive review of current management guidelines of chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(23):e33984. doi: 10.1097/MD.00000000000033984.
2. *Mallamaci F, Tripepi G.* Risk Factors of Chronic Kidney Disease Progression: Between Old and New Concepts. *J Clin Med*. 2024;13(3):678. doi: 10.3390/jcm13030678.
3. *Kompotiatis P, Thongprayoon C, Manohar S, Cheungpasitporn W, Gonzalez Suarez ML, Craici IM, et al.* Association between urologic malignancies and end-stage renal disease: A meta-analysis. *Nephrology (Carlton)*. 2019 ;24(1):65-73. doi: 10.1111/nep.13209.
4. *Hora M, Hes O, Reischig T, Urge T, Klecka J, Ferda J, et al.* Tumours in end-stage kidney. *Transplant Proc*. 2008;40(10):3354-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.08.135.
5. *Song C, Hong SH, Chung JS, Byun SS, Kwak C, Jeong CW, et al.* Renal cell carcinoma in end-stage renal disease: Multi-institutional comparative analysis of survival. *Int J Urol*. 2016;23(6):465-71. doi: 10.1111/iju.13084.
6. *Tsuzuki T, Iwata H, Murase Y, Takahara T, Ohashi A.* Renal tumors in end-stage renal disease: A comprehensive review. *Int J Urol*. 2018;25(9):780-786. doi: 10.1111/iju.13759.
7. *Yoshida M, Yao M, Ishikawa I, Kishida T, Nagashima Y, Kondo K, et al.* Somatic von Hippel–Lindau disease gene mutation in clear-cell renal carcinomas associated with end-stage renal disease/acquired cystic disease of the kidney. *Genes Chromosom. Cancer* 2002; 35: 359–64. doi: 10.1002/gcc.10123.
8. *Kuntz E, Yusenko MV, Nagy A, Kovacs G.* Oligoarray comparative genomic hybridization of renal cell tumors that developed in patients with acquired cystic renal disease. *Hum. Pathol*. 2010; 41 (9): 1345–9. doi: 10.1016/j.humpath.2009.09.022.
9. *Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM.* The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93-105. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029.
10. *Kondo T, Sassa N, Yamada H, Takagi T, Iizuka J, Kobayashi H, et al.* Comparable survival outcome between acquired cystic disease associated renal cell carcinoma and clear cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: a multi-institutional central pathology study. *Pathology*. 2021;53(6):720-727. doi: 10.1016/j.pathol.2021.01.014.
11. *Toyokuni S.* The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. *Pathol Int*. 2016;66(5):245-59. doi: 10.1111/pin.12396.
12. *Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, Worcester HD, Salama ME, Young AN, et al.* Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):141-53. doi: 10.1097/01.pas.0000185382.80844.b1.
13. *Nouh MA, Kuroda N, Yamashita M, Hayashida Y, Yano T, Minakuchi J, et al.* Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis. *BJU Int*. 2010;105(5):620-7. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08817.x.
14. *Sassa N, Hattori R, Tsuzuki T, Watarai Y, Fukatsu A, Katsuno S, et al.* Renal cell carcinomas in haemodialysis patients: does haemodialysis duration influence pathological cell types and prognosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1677-82. doi: 10.1093/ndt/gfq529.
15. *Klatte T, Seitz C, Waldert M, de Martino M, Kikic Z, Böhmig GA, et al.* Features and outcomes of renal cell carcinoma of native kidneys in renal transplant recipients. *BJU Int*. 2010;105(9):1260-5. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08941.x.
16. *Neuzillet Y, Tillou X, Mathieu R, Long JA, Gigante M, Paparel P, et al.* Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favourable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population. *Eur Urol*. 2011 ;60(2):366-73. doi: 10.1016/j.eururo.2011.02.035.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

**ISSN 2304-0238;****eISSN 2616-7352****Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>**

## Case Report

Seraphin Ahoui<sup>1</sup>, Nonvignon Eric Ayadji<sup>2</sup>, Giovanna Zossoungbo<sup>2</sup>, Joseph Godonou<sup>1</sup>, Aubin Melikan<sup>1</sup>, Aime Vinasse<sup>1</sup>, Sabrina Conchita Somakou<sup>2</sup>, Nicanor Houeto<sup>1</sup>, Evariste Eteka<sup>1</sup>, Jacques Vigan<sup>3</sup>

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.03

### Hemoglobinuria and acute kidney injury in severe malaria: Case reports from Borgou/Alibori Teaching Hospital, Benin

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Faculty of Medicine, University of Parakou, Benin

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Faculty of Health Sciences, University of Abomey-Calavi, Benin

<sup>3</sup>National Institute of Health, Medicine, University of Abomey-Calavi, Benin

**Citation:**

Ahoui S, Ayadji NE, Zossoungbo G, Godonou J, Melikan A, Vinasse A, et al. Hemoglobinuria and acute kidney injury in severe malaria: Case reports from Borgou/Alibori Teaching Hospital, Benin. Ukr J Nephrol Dial. 2024;4(84):23-29. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.03.

**Article history:**

Received July 21, 2024

Received in revised form

September 23, 2024

Accepted October 16, 2024

**Abstract.** *The hemoglobinuric form of severe malaria can precipitate acute kidney injury (AKI) and potential multiorgan failure. This report discusses two cases of fatal AKI due to severe malaria, treated in 2024 at the Borgou-Alibori Departmental Teaching Hospital in Benin. It examines the pathophysiology, clinical symptoms, and treatments used, providing detailed insights into the progression of the disease and the therapeutic interventions attempted. Key takeaways highlight the importance of early, multidisciplinary care in improving outcomes, with hemodialysis playing a critical role in managing AKI caused by hemoglobinuria.*

**Keywords:** acute kidney injury, hemoglobinuria, severe malaria, Benin.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© S. Ahoui, N. E. Ayadji, G. Zossoungbo, J. Godonou, A. Melikan, A. Vinasse, S. C. Somakou, N. Houeto, E. Eteka, J. Vigan, 2024.

Correspondence should be addressed to Ahoui Seraphin: [drserahoui@gmail.com](mailto:drserahoui@gmail.com)



© С. Ауї, Н. Е. Аяджі, Г. Зосунбо, Дж. Годону, А. Мелікан, А. Вінасс, С. С. Сомаку, Н. Уето, Е. Етека, Дж. Віган, 2024

УДК: 616.936:616.633.963.42]:616.61-008.6-036.11(668.2)

Серафін Ауї<sup>1</sup>, Нонвіньон Ерік Аяджі<sup>2</sup>, Джованна Зосунбо<sup>2</sup>, Джозеф Годону<sup>1</sup>, Обен Мелікан<sup>1</sup>, Еме Вінасс<sup>1</sup>, Сабріна Кончіта Сомаку<sup>2</sup>, Ніканор Уето<sup>1</sup>, Еваріст Етека<sup>1</sup>, Жак Віган<sup>3</sup>

## Гемоглобінурія та гостре пошкодження нирок у пацієнтів з тяжкою малярією: клінічні випадки з університетської лікарні Боргу/Аліборі, Бенін

<sup>1</sup>Кафедра нефрології, медичний факультет, Університет Параку, Бенін

<sup>2</sup>Кафедра нефрології, факультет медичних наук, Університет Абомей-Калаві, Бенін

<sup>3</sup>Національний інститут здоров'я, медицини, Університет Абомей-Калаві, Бенін

**Резюме.** Гемоглобінурічна форма важкої малярії може спровокувати гостре пошкодження нирок (ГПН) з можливою поліорганною недостатністю. У цій статті повідомляються два випадки летального ГПН, обумовлені важкою формою малярії у пацієнтів, які лікувались в університетській лікарні Боргу-Аліборі в Беніні у 2024 році. Стаття розглядає патофізіологію, клінічні симптоми та застосовані методи лікування, надаючи детальну інформацію про прогресування захворювання та спроби терапевтичного втручання. Ключові висновки підкреслюють важливість ранньої мультидисциплінарної допомоги для покращення результатів лікування та підкреслює вирішальну роль гемодіалізу в лікуванні ГПН, спричиненого гемоглобінурією.

**Ключові слова:** гостре пошкодження нирок, гемоглобінурія, малярія, Бенін.

**Introduction.** The World Health Organization (WHO) has identified acute kidney injury (AKI) as a major criterion for assessing the severity of Plasmodium falciparum malaria [1]. The incidence of AKI in malaria cases varies: Esezobor [2] reported 11.4% in general pediatrics; Kunuanunua [3] found 42.8% in emergency departments; and Kaul [4] documented 2.5% in community settings.

AKI associated with severe malaria is primarily caused by acute tubular necrosis due to hemoglobinuria [2]. AKI refers to a sudden decline in kidney function, resulting in the accumulation of nitrogenous waste products [3]. Hemoglobinuria is most commonly seen in individuals who have experienced numerous infections with various Falciparum strains and several uncomplicated malaria episodes [4]. It results from massive intravascular hemolysis, overwhelming the haptoglobin and hemopexin systems that normally capture free hemoglobin [5]. Unfortunately, hemoglobinuria is often overlooked as a warning sign of severe malaria and potential renal damage, despite its strong association with AKI risk.

A WHO study on severe malaria in pediatric settings across ten African countries reported a 3.3% incidence of hemoglobinuria secondary to severe malaria [9]. Other studies have found similar rates: Verma et al. [10] in India reported 19.6%, Ajetunmobi et al. [11]

in Ibadan, Nigeria, 19.1%, and Gbadoé et al. [12] in Togo, 17.2%.

The clinical presentation of AKI secondary to hemoglobinuria is often atypical, which can delay timely management. Its progression may be insidious or fulminant, requiring specialized treatment. The prognosis for kidney function and patient survival often depends on rapid clinical control, a challenge in countries with limited economic resources.

This report presents two relevant clinical cases from our hospital in 2024, illustrating the clinical features, management, and outcomes of this potentially fatal complication, and offering insights for improved management. The macroscopic hemoglobinuria was identified by the characteristic dark "Coca-Cola" color of the urine, in the absence of any factors suggesting myoglobinuria or hematuria, aside from severe malaria.

**Case reports. Observation 1.** A 32-year-old male patient was referred for impaired kidney function, with a serum creatinine level of 142 mg/L, in the context of severe malaria. Symptoms began one week before admission, during which he experienced altered consciousness, convulsive seizures, and jaundice.

Upon admission, the clinical examination revealed the following: altered consciousness with a Glasgow Coma Scale score of 12, icteric bulbar mucous membranes, mucocutaneous pallor, and hyperthermia (40.1°C). The patient's oxygen saturation was 97% in ambient air, blood pressure was 130/78 mmHg, and he exhibited anuria, with a urine output of less than 100 mL in 24 hours (<0.3 mL/kg/24 h). Additionally, he presented with grade 1 hepatosplenomegaly. Urinalysis indicated hemoglobinuria (+++), a pH of 5, and a urine specific gravity of 1.025.

Ahoui Seraphin  
drserahoui@gmail.com

Further laboratory investigations showed:

- Biochemical results: Uremia at 2.56 g/L, creatinine at 227 mg/L, serum sodium at 134 mmol/L, potassium at 5.2 mmol/L, and chloride at 110 mmol/L.
- Complete blood count: Leukocyte count at 6.7 Giga/L, hemoglobin at 5.7 g/dL, mean corpuscular volume (MCV) at 83.4 fL, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) at 32.2 g/dL, and platelet count at 105 G/L.
- Liver function tests: Aspartate aminotransferase (AST) at 220 IU/L, alanine aminotransferase (ALT) at 160 IU/L, total bilirubin at 112 mg/L, direct bilirubin at 76 mg/L, and indirect bilirubin at 36 mg/L.
- Thick blood smear: Positive for Plasmodium falciparum, with a parasitic density of 9,550 parasitized red blood cells.
- Renal ultrasound: Revealed normal-sized kidneys with preserved cortico-medullary differentiation.

The diagnosis was established as severe malaria, presenting with neurological and hemoglobinuric manifestations, complicated by acute kidney injury.

The patient was admitted to the nephrology intensive care unit, where he received appropriate hydration and intravenous administration of an artemisinin derivative. Electrolyte intake was adjusted to 100 mL/kg/day. Due to the persistence of anuria and hyperkalemia (7.9 mmol/L), the patient underwent hemodialysis, receiving four sessions in total. He also received anticonvulsant treatment with diazepam and phenobarbital, along with two units of erythrocyte concentrates.

The patient's condition improved, marked by the onset of polyuria and resolution of clinical and biological abnormalities. He was discharged after a 12-day hospital stay.

**Observation 2.** A 26-year-old male patient was admitted following a referral from a peripheral health facility for acute kidney injury related to severe malaria and multiorgan failure, with a serum creatinine level of 346 mg/L. Symptoms had begun two weeks prior, characterized by intermittent diffuse myalgia and headaches, leading to self-medication without clinical improvement.

Upon admission, the clinical examination revealed an altered state of consciousness with a Glasgow Coma Scale score of 9, hyperthermia (38.7°C), mucocutaneous pallor, and icteric bulbar mucous membranes. His oxygen saturation was 92% in ambient air, and he presented with hypotension (blood pressure of 90/56 mmHg), mild lower limb edema, and anuria, with a

urine output of approximately 80 mL in 24 hours (<0.3 mL/kg/24 h). Pulmonary examination showed dullness at both lung bases, crackling rales in both lung fields, and grade 2 hepatosplenomegaly. Urinalysis indicated hemoglobinuria (+++), a pH of 5, and a urine specific gravity of 1.030.

Laboratory findings included:

- Biochemistry: Uremia at 3.14 g/L, creatinine at 346 mg/L, serum sodium at 124 mmol/L, potassium at 6.5 mmol/L, and chloride at 112 mmol/L.
- Complete blood count: Hemoglobin level at 4.4 g/dL, mean corpuscular volume (MCV) at 78.2 fL, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) at 33.4 g/dL, leukocytes at 17.7 Giga/L, and platelets at 85 G/L.
- Liver function tests: Aspartate aminotransferase (AST) at 460 IU/L, alanine aminotransferase (ALT) at 380 IU/L, total bilirubin at 234 mg/L, direct bilirubin at 178 mg/L, and indirect bilirubin at 56 mg/L.
- Thick blood smear: Positive for Plasmodium falciparum, with a parasitic density of 20,550 parasitized red blood cells.
- Urinary sediment analysis: Revealed tubular cells, numerous bile pigment casts, and granular casts.
- Renal ultrasound: Showed normal-sized kidneys with good cortico-medullary differentiation and no dilation of the pyelocaliceal cavities.

The diagnosis was established as severe malaria in the hemoglobinuria form, complicated by visceral involvement affecting the renal, cerebral, cardiopulmonary, and hydro-electrolyte systems.

Therapeutically, the patient was admitted to the nephrology intensive care unit, where he received oxygen therapy at 5 L/min, intravenous administration of an artemisinin derivative, and antibiotic therapy with ceftriaxone and azithromycin. Additionally, injectable furosemide and calcium gluconate were administered, along with appropriate hydration two units of erythrocyte concentrates and one unit of platelet concentrates.

After 24 hours, with no clinical improvement in renal function and persistent hydro-electrolyte imbalances, the patient underwent hemodialysis, receiving three sessions. Unfortunately, the patient's condition deteriorated, and he passed away on the fourth day of hospitalization.

The clinical, paraclinical, therapeutic, and evolutionary characteristics are summarized in Tables 1, 2, and 3.

Table 1

**Clinical characteristics of the patients with acute kidney injury secondary to severe malaria with hemoglobinuria**

	Patient 1	Patient 2
Clinical data at admission		
Age (years)	32	26
Altered state of consciousness	Yes	Yes

Continuation of Table 1

	Patient 1	Patient 2
Glasgow score	12	09
Body temperature ( °C)	40.1	38.7
Bulbar mucous membranes	Icteric	Icteric
Mucocutaneous pallor	Yes	Yes
Oxygen saturation in ambient air (%)	97	92
Blood pressure ( mmHg )	130/78	90/56
Diuresis < 0.3ml/kg/24 h	Yes	Yes
Lower limb edema	Absent	Present
Pulmonary condensation syndrome	Absent	Here
Signs of heart failure	Absent	Present
Hepatosplenomegaly	Degree 1	Degree 2
Dipstick		
pH	5	5
Urinary density.	1.025	1,030
Hemoglobinuria	+++	+++

Table 2

**Paraclinical characteristics of the patients with acute kidney injury secondary to severe malaria with hemoglobinuria**

	Patient 1	Patient 2
<b>Paraclinical data on admission</b>		
<b>Blood</b>		
Uremia (g/l)	2.56	3.14
Serum creatinine (mg/L)	227	227
Complete blood count		
Hemoglobin level (g/dl)	5.7	4.4
VGM ( fl )	83	78.2
CCMH (g/dl )	32.2	33.4
Leukocytes (Giga /L)	6.7	17.7
Platelets (g/l)	105	85
Tick drop	positive	positive
<i>Plasmodium</i> smear <i>falciparum</i>	Yes	Yes
Parasite density (parasitized red blood cells)		20550
Serum electrolytes		
Natremia (mmol /L)	134	124
Serum potassium (mmol /l)	5.2	6.5
Chloremia (mmol /l)	110	112
Transaminases (IU/L)		
ASAT	220	460
ALAT	160	380
Bilirubin (mg/L)		
Total	112	234
Direct	76	178
Indirect	36	56

Continuation of Table 2

		Patient 1	Patient 2
Urine	(Bullet)	Unrealized	
	Tubular cells	Not available	+++
	Cylinders	Not available	
	Granular	Not available	+++
	Bile pigments	Not available	+++
Renal ultrasound			
	Change in kidney size	No	No
	Conservation of kidney structure	Yes	Yes

Table 3

**Therapeutic and evolutionary characteristics of the patients with acute kidney injury secondary to severe malaria with hemoglobinuria**

		Patient 1	Patient 2
Therapeutic and evolutionary data			
Antimalarial			
	Artemisinin derivative	Yes	Yes
Anticonvulsant			
	Diazepam	Yes	No
	Phenobarbital	Yes	No
Antibiotics			
	Ceftriaxone	No	Yes
	Azithromycin	No	Yes
Diuretic			
	Furosemide	No	Yes
Hypokalemic			
	Calcium gluconate,	Yes	Yes
	Insulin	Yes	Yes
Blood transfusion			
	RBC pellet	Yes	Yes
	Platelet concentrate	No	Yes
Extrarenal purification			
	Hemodialysis	Yes	Yes
Therapeutic outcome			
	Length of stay (days)	12	04
	Healing / Death	Healing	Death

**Discussion.** This study highlights the significant kidney damage associated with hemoglobinuria in severe malaria, a condition often overlooked or mismanaged in clinical practice. Hemoglobinuria can lead to acute tubular necrosis (ATN), which is primarily caused by the obstruction of capillaries and post-capillary venules by parasitized red blood cells. This vascular obstruction occurs through two main mechanisms: cytoadherence and rosetting, both of which are particularly associated with Plasmodium falciparum infections [6, 7].

Hemoglobin itself is toxic to the renal tubules, contributing to ATN through mechanisms that, while not entirely understood, involve direct tubular toxicity and micro obstruction [8]. The clinical presentation of acute kidney injury (AKI) in this context can be variable and multifaceted, complicating diagnosis and treatment. In our cases, AKI manifested as oliguria and anuria a few days following the onset of febrile episodes [9-11].

Fluid and electrolyte imbalances are common in AKI associated with severe malaria, as observed in both of our patients who presented with hyponatremia and hyperkalemia. Such imbalances have been documented in the literature as frequent complications of severe malaria [10, 12]. The diagnosis of hemoglobinuria bilious fever was established based on the combination of fever, port-colored urine, jaundice, anemia, and oliguric AKI. This condition may arise from the dual sensitization of red blood cells to both *Plasmodium falciparum* and the aminoalcohols that induce hemolysis [13].

Delays in appropriate treatment often result from self-medication practices, wherein patients resort to anti-malarial drugs such as quinine, halofantrine, mefloquine, and artemether-lumefantrine without professional guidance. This can exacerbate the development of hemoglobinuria bilious fever and complicate malaria management [10, 14, 15]. As noted by Savadogo et al. [16], the emergence of chloroquine resistance has made quinine the drug of choice for severe malaria, leading to an increased incidence of hemoglobinuria.

In some instances, hemolytic uremic syndrome or thrombotic microangiopathy may occur, characterized by renal impairment, hemolytic anemia, and thrombocytopenia [13]. Additionally, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a recognized contributor to massive intravascular hemolysis and often overlaps geographically with malaria prevalence [17].

Multisystem failure can also be associated with sepsis. In severe sepsis cases, hemolysis may be triggered by the activation of endogenous phospholipase C and sphingomyelinase, resulting in the uncontrolled production of various mediators that damage platelets, erythrocytes, leukocytes, endothelial cells, and muscle cell membranes [18]. Hemolysis significantly elevates levels of transaminases, creatine phosphokinase, and lactate dehydrogenase due to the release of erythrocyte components into the plasma, thereby promoting acute tubular necrosis.

Timely and adequate treatment is crucial for improving outcomes in these patients. In our study, the majority received antimalarial therapy based on injectable artesunate or artemether, in line with current guidelines that prioritize injectable artesunate as the treatment of choice for severe malaria [19]. Early initiation of renal replacement therapy is also vital for improving prognosis [13].

Several factors contribute to poor patient outcomes, including late referrals at advanced disease stages and a lack of public awareness regarding the severity of symptoms associated with malaria [10]. To enhance patient care, more comprehensive investigations and resources are necessary, particularly for those from

disadvantaged backgrounds who may face delays in accessing treatment.

**Limitations.** Our study's limitations include the unavailability of additional diagnostic tests in our hospitals, which could facilitate a more straightforward etiological diagnosis and help rule out other causes of hemoglobinuria in patients with severe malaria.

**Conclusions.** Hemoglobinuria should not be regarded as a benign indicator, particularly within the context of malaria. Its implication in the occurrence of necessitates heightened awareness and prompt intervention from both diagnostic and therapeutic perspectives.

**Conflicts of interest statement.** The authors have no conflict of interest to declare.

**Funding sources.** This study was not supported by any sponsor or funder.

**Data availability statement.** The authors declare that the data pertaining to the writing of this article are available and can be accessed in the archives of the Haemodialysis Nephrology Department at the Departmental Teaching Hospital of Borgou, Benin.

**Ethical and deontological considerations.** This work was carried out in compliance with current ethical standards. The rules of anonymity and confidentiality were respected.

#### The authors' contributions.

**Seraphin Ahoui:** involved in patient management, wrote the first draft of the article, and conducted data analysis.

**Nonvignon Eric Ayadji:** involved in patient management and supervised the analysis of patient files.

**Joseph Godonou:** involved in patient management and conducted data analysis.

**Sabrina Conchita Somakou:** involved in patient management and analyzed patient files.

**Aime Vinasse and Melikan Aubin:** analyzed patient files and conducted data analysis.

**Evariste Eteka and Nicanor Houeto:** analyzed patient files.

**Giovanna Zossoungbo:** involved in patient management and supervised the analysis of patient files.

**Jacques Vigan:** involved in patient management and supervised the analysis of patient files, as well as conducting data analysis.

All co-authors contributed to the finalization of the article.

**Acknowledgment.** The authors would like to thank all the participants and the staff of the Haemodialysis Nephrology Department of the Departmental Teaching Hospital of Borgou Alibori (Benin) for their efforts in patient management.

#### References:

1. World Health Organization. Guidelines for treatment of malaria - 2nd edition - [Internet].2010. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK254223/>.
2. Esezobor CI, Ladapo TA, Osinaike B, Lesi FE. Paediatric acute kidney injury in a tertiary hospital in Nigeria: prevalence, causes and mortality rate. *PloS One*. 2012;7(12):e51229. doi: 10.1371/journal.pone.0051229.

3. *Kunuanunua TS, Nsibu CN, Gini-Ehungu JL, Bodi JM, Ekulu PM, Situakibanza H, et al.* Acute kidney failure and severe malaria in Congolese children living in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Nephrol Ther.*2013;9:160-65. doi: 10.1016/j.nephro.2013.01.001.
4. *Kaul A, Sharma RK, Tripathi R, Suresh KJ, Bhatt S, Prasad N.* Spectrum of community-acquired acute kidney injury in India : a retrospective study. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* [Internet].2012;23:619-28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22569459/>.
5. *Kissou SA, Cessouma R, Barro M, Traor H, Nacro B.* Acute renal failure and Plasmodium falciparum malaria: a case report. *Arch Pediatr.* 2012;19(1):34-7. doi: 10.1016/j.arcped.2011.10.007.
6. *Ponte B, Saudan P.* Acute renal failure in 2008. *Rev Med Switzerland.* [Internet].2008;4(147):568-75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18402014/>.
7. *Lebas C, Vilaine E, Lessore De Sainte Foy C, Lemaitre L, Verine J, Buob D, et al.* Renal damage revealing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: report of three cases. *Nephrology Therapeutic.* 2015;11(5):372.
8. *Bruneel F, Gachot B, Wolff M, Bedos JP, Regnier B, Danis M, et al.* Blackwater fever. *Press Med.* [Internet].2002;31(28):1329-34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12355996/>.
9. *Ajetunmobi WA, Orimadegun AE, Brown BJ, Afolabi NK, Olabiyi FA, Anetor JI, et al.* Haemoglobinuria among children with severe malaria attending tertiary care in Ibadan, Nigeria. *Malaria Journal.*2012;11:336. doi: 10.1186/1475-2875-11-336.
10. *Gbado AD, Kini-Caussi M, Koffi S, Traor H, Atakouma DY, Tatagan-Agbi K, et al.* Evolution of severe pediatric malaria in Togo between 2000 and 2002. *Med Mal Infect.* 2006;36(1):52-4. doi: 10.1016/j.medmal.2005.10.006.
11. World Health Organization. A multicentre study in the African Region. WHO Regional Office for Africa; 2002. Clinical, behavioural and socioeconomic factors related to severe malaria.
12. *Verma P, Shukla US, Kalraiya A.* Retrospective study on clinical profile of severe malaria in children admitted in a tertiary care centre of Central India. *People's Journal of Scientific Research.* [Internet].2014;7(1):22–6. Available from: <https://pjsr.org/WebPages/ArchivesPages/Vo17-1-2014Abs/5.pdf>.
13. *Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, FernandezReyes D, Fagan T.* Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol.*1999;29 (6):927-37. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00049-1.
14. *Kaushik RL, Kaushik RM, Kakkar R, Shamar A, Chandra H.* Plasmodium vivax malaria complicated by acute kidney injury : experience at a referral hospital in Uttarakhand, India. *Tran R Soc Med Hyg.*2013;107:188-94. doi: 10.1093/trstmh/trs092.
15. *Lalya F, Sagbo G, Bagnan- Tossa L, Alihonou F, Tohodjede Y, Almeida M, et al.* Renal insufficiency associated with malaria in children at the CNHU Hubert K. Maga (CNHU-HK) in Cotonou, Benin. *Rev Afr Anesth Med Urg.* [Internet].2014; 19 (1): 39-43. Available from: <https://bec.uac.bj/uploads/publication/33ffe4a584d0d9aa11b65c041e1c6ba4.pdf>.
16. *Kochar DK, Tanwar GS, Khatri PC, Kochar SK, Sengar GS, Gupta A, et al.* Clinical characteristics of children hospitalized with malaria: a study from bikaner North-West India. *J Trop Med Hyg.*2010;83(5):981-9. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0633.
17. *Tondi ZMM, Nayama M, Kane Y, Garba M, Lemrabott AT, Moussa HD, et al.* Acute Obstetric Renal Failure: Experience of the Issaka GAZOBY Maternity Hospital in Niamey (Niger). *Eur Sci J.* 2016;12(33):281. doi: 10.19044/esj.2016.v12n33p281.
18. *Mabiala-Babela JR, Kaly-Ibala R, Ganga- Zandzou PS, Mouko A, Senga P.* Severe malaria associated with acute renal failure: about an observation. *Bull Soc Pathol Exote.* [Internet].2002; 95 (2): 74-75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12145961/>.
19. *Essola L, Mowangue PS, Minko J, Ngomas JF, Soami V, Sima Zu A.* Management of Acute Renal Failure in Severe Malaria in Children at the Libreville University Hospital Center. A Study of 12 Cases *Health Sci Dis.* 2019; 20 (4): 57-61.



## Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

### Case Report

A. Holovanova, T. Ostapenko

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.04

### Differential diagnosis of polyuria: Clinical cases and literature review

Medical Center LLC “Nephrocenter”, Zaporizhzhia, Ukraine

Citation:

Holovanova A, Ostapenko T. Differential diagnosis of polyuria: Clinical cases and literature review. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84):30-38. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.04.

**Abstract:** Polyuria can be a symptom of various conditions, such as diabetes mellitus, diabetes insipidus, chronic tubulointerstitial nephritis, or primary polydipsia. Effective management of polyuria requires a thorough differential diagnosis, incorporating clinical, laboratory, and instrumental evaluations to identify its underlying cause.

The paper presents two clinical cases focused on the differential diagnosis of polyuria along with a literature review on the topic. The cases involve patients with atypical causes of polyuria: chronic tubulointerstitial nephritis and primary psychogenic polydipsia. A detailed diagnostic process is outlined, and different treatment approaches are discussed. The literature review includes an algorithm for polyuria diagnosis and a discussion of the pathophysiology of diabetes insipidus (both central and nephrogenic) and primary polydipsia, which are common causes of polyuria and should be ruled out as a priority.

The limited body of scientific literature on the differential diagnosis of polyuria underscores the need for clear diagnostic algorithms. The clinical cases and literature review presented here aim to deepen the understanding of the complexity involved in the diagnostic process and emphasize the importance of an individualized approach for each patient with polyuria.

**Article history:**

Received September 25, 2024

Received in revised form

October 23, 2024

Accepted October 25, 2024

**Key words:** polyuria, diabetes insipidus, clinical signs, primary polydipsia, chronic tubulointerstitial nephritis, osmolarity.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© A. Holovanova, T. Ostapenko, 2024.

Correspondence should be addressed to Alina Holovanova: [golovanovaalina464@gmail.com](mailto:golovanovaalina464@gmail.com)



© Голованова А. К., Остапенко Т. І., 2024.

УДК: 616.631.11:[616.33-008.51:616.631.11:616.61-002]-071

А.К. Голованова, Т.І. Остапенко

## Диференційна діагностика поліурії: клінічні випадки та огляд літератури

Медичний центр ТОВ «Нефроцентр», м. Запоріжжя, Україна

**Резюме:** Симптом поліурії може бути проявом широкого спектра захворювань, таких як цукровий діабет, нецукровий діабет, хронічний тубулоінтерстиційний нефрит, первинна полідипсія. Лікування пацієнта з поліурією вимагає, в першу чергу, проведення ретельної диференційної діагностики (клінічної, лабораторної, інструментальної) із встановленням її генезу.

Робота демонструє два клінічні випадки диференційної діагностики поліурії та огляд літератури з цього питання. Описано пацієнтів з нетиповими причинами поліурії – хронічним тубулоінтерстиційним нефритом та первинною психогенною полідипсією. В огляді літератури наведено алгоритм діагностики поліурії. Особливо обговорюється патофізіологія нецукрового діабету, як центрального, так і нефрогенного, а також первинної полідипсії, які є поширеними причинами поліурії і мають бути виключені в першу чергу. Обмежена кількість наукової літератури з питань диференційної діагностики поліурії підкреслює необхідність розробки та впровадження чітких діагностичних алгоритмів. Представлені клінічні випадки та огляд літератури сприятимуть поглибленню розуміння складності діагностичного процесу та важливості індивідуального підходу до кожного пацієнта з поліурією.

**Ключові слова:** поліурія, нецукровий діабет, клінічні ознаки, первинна полідипсія, хронічний тубулоінтерстиційний нефрит, осмолярність.

**Вступ.** Поліурія є поширеним симптомом, що характеризується надмірним виділенням сечі – понад 3000 мл або 50 мл/кг протягом доби [1-4]. Цей стан може бути проявом різноманітних патологічних процесів, включаючи ендокринні, ниркові та метаболічні порушення [1-4]. З одного боку, поліурія є важливим діагностичним маркером у клінічній практиці, а з іншого – часто є непростим завданням для диференційної діагностики, вимагаючи ретельного та комплексного підходу [1-3].

Диференційна діагностика поліурії є складним завданням для клініцистів, оскільки вимагає ретельного аналізу анамнезу, фізикального обстеження та лабораторних досліджень [1-4]. Важливо відзначити, що поліурія може бути як ізольованим симптомом, так і частиною комплексу порушень сечовипускання, таких як полакіурія, ніктурія або нетримання сечі [1-5]. Серед основних причин поліурії виділяють цукровий та нецукровий діабет, хронічну хворобу нирок, гіперкальціємію, гіпокальціємію та психогенну полідипсію [6-11]. Кожен із цих станів потребує специфічного підходу до діагностики і терапії, що підкреслює важливість комплексного аналізу клінічних та лабораторних даних.

Осмолярність сечі відіграє ключову роль у диференційній діагностиці поліурії, оскільки дозволяє оцінити концентраційну здатність нирок і

допомагає відрізнити різні механізми порушення водного балансу, зокрема гіпостенурію та осмотичний діурез [3, 5, 6, 10]. Гіпостенурія є станом, за якого осмолярність сечі знижується (менше 300 мосмоль/л), що часто свідчить про зниження дії антидіуретичного гормону (АДГ) або резистентності нирок до його впливу [6, 10-14]. Цей стан зазвичай асоціюється з водним діурезом і є типовим проявом нецукрового діабету [5, 9, 10]. Осмотичний діурез, навпаки, виникає у разі перевищення осмотичного навантаження, зокрема у пацієнтів з цукровим діабетом або внаслідок високого рівня фільтрації низькомолекулярних речовин (сечовини, натрію) у ниркових каналцях [3, 5, 10]. У таких випадках осмолярність сечі сягає 300 мосмоль/л і більше та свідчить про порушення, пов'язані не з водним, а з осмотичним діурезом [3, 5]. Розрізнення цих механізмів є важливою складовою правильного вибору терапевтичної тактики та корекції водного й електролітного балансу у пацієнтів з поліурією.

У даній роботі представлено два клінічних випадки, які ілюструють різноманітні причини поліурії та труднощі їх діагностики. Крім того, подано огляд сучасної літератури, в якому особлива увага приділена алгоритмам діагностичного пошуку, інтерпретації лабораторних та інструментальних досліджень.

**Клінічний випадок 1.** Пацієнтка С., 60 років звернулася за консультацією 21.05.2024 року зі скаргами на виражену загальну слабкість, зниження толерантності до фізичних навантажень, судом рук та ніг, схуднення, закрепи, періодичну нудоту, часте сечовипускання, ніктурію; добовий діурез періодично збільшувався до 5-8-10 л/добу.

Аліна Голованова  
golovanovaalina464@gmail.com

З анамнезу: вважає себе хворою з січня 2024 р, коли перебувала на стаціонарному лікуванні у відділенні кардіології з приводу гіпертонічного кризу (протягом останніх 2 років діагностовано Гіпертонічну хворобу II стадії, гіпертензивне серце, ступінь артеріальної гіпертензії 3, високого кардіоваскулярного ризику). Після застосування Тивортину 42 мг/мл-100 мл-№5, вперше з'явилися скарги на сухість в роті, нудоту, болі в животі, м'язову слабкість. Після використання Реосорбілакту 200.0 тричі відчула покращення загального стану. В березні-початок квітня 2024 р – відновлення скарг на нудоту, ниючий біль в поперековій ділянці, що супроводжувався поліурією до 10 л/добу. Через страх дегідратації пацієнтка збільшувала вживання рідини до 8-10 л/добу без істинних ознак полідипсії. Стаціонарне лікування в обласній лікарні 04.04.24 – 15.04.2024. За даними загального аналізу крові не виявлено відхилень від референтних значень. Біохімічне дослідження крові: глюкоза 5.18 ммоль/л, загальний білок 73.5 г/л, альбумін 46.7 г/л, креатинін 84.8 мкмоль/л, сечовина 3.88 ммоль/л, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) 65 мл/хв/1.73 м<sup>2</sup>, натрій 141 ммоль/л, калій 4.57 ммоль/л, загальний холестерин 8.77 ммоль/л. Загальний аналіз сечі: питома вага-1007, білок – негативний, еритроцити 0-1 у

п/з, лейкоцити 25 у п/з. Проба Реберга: креатинін крові 84.8 мкмоль/л, креатинін сечі 8780 мкмоль/л, хвилиний діурез 6.94 мл/хв (N 0.7-1.4 мл/хв), клубочкова фільтрація 71.9 мл/хв/1.73 м<sup>2</sup>, канальцева реабсорбція 90.3% (N 97-99 %), добовий діурез під час проведення проби 10 л. УЗД нирок: права нирка 113\*45мм, паренхіма 17 мм, в структурі синуса нечисленні точкові гіперехогенні включення з акустичною тінню; ліва нирка 113\*48 мм, паренхіма 17 мм, в синусі нечисленні гіперехогенні включення з акустичною тінню. МРТ головного мозку (22.04.24): ознаки незначної гіперінтенсивності білої речовини головного мозку, ознаки церебральної мікроангіопатії, незначне розширення конвекситальних підпаутинних просторів (виключено ураження гіпоталамо-гіпофізарної ділянки головного мозку). Консультація ендокринолога 08.04.24: Даних за цукровий діабет на момент огляду немає, рекомендовано дообстеження: аналіз сечі за Зимницьким (табл.1), вазопресин, альдостерон. Консультація психіатра 09.04.24: На момент огляду без гострих психічних розладів.

Осмолярність сечі (06.05.2024)-499.5 мосмоль/л (N 300-600 мосмоль/л), питома вага сечі-1015; розрахункова осмолярність крові – 298 мосмоль/л (N 275-300 мосмоль/л).

Таблиця 1

Аналіз сечі за Зимницьким (клінічний випадок № 1)

Аналіз сечі за Зимницьким (13.04.2024)			Аналіз сечі за Зимницьким (13.05.2024)		
Час	Об'єм (л)	Питома вага	Час	Об'єм (л)	Питома вага
1-а порція (9:00-12:00)	-	-	1-а порція (9:00-12:00)	0.225	1009
2-а порція (12:00-15:00)	0.180	1013	2-а порція (12:00-15:00)	0.640	1004
3-а порція (15:00-18:00)	0.380	1002	3-а порція (15:00-18:00)	1.20	1003
4-а порція (18:00-21:00)	0.320	1005	4-а порція (18:00-21:00)	1.0	1004
5-а порція (21:00-24:00)	0.460	1002	5-а порція (21:00-24:00)	0.550	1004
6-а порція (00:00-03:00)	0.350	1010	6-а порція (00:00-03:00)	0.660	1010
7-а порція (3:00-6:00)	0.730	1004	7-а порція (3:00-6:00)	-	-
8-а порція (6:00-9:00)	0.145	1014	8-а порція (6:00-9:00)	0.350	1014
Добовий діурез (9:00-6:00)- 2.565 л; Денний діурез (9:00-21:00)-1.025 л; Нічний діурез (21:00-6:00)-1.540 л; Денний: Нічний= 1:1.5			Добовий діурез (9:00-6:00)- 4.625; Денний діурез (9:00-21:00)-3.065 л; Нічний діурез (21:00-6:00)-1.560 л; Денний: Нічний= 1:1.9		
Коментар: Виявлена епізодична гіпостенурія, але немає стійкої гіпоізостенурії; Ніктурія. У разі НЦД: питома вага сечі повинна бути < 1005 в усіх зразках!					

Пацієнтці було встановлено діагноз: Хронічний неускладнений пієлонефрит, загострення, активність I ступеня, спорадичний перебіг.

Призначено Урофурагін 100 мг 3 рази на добу – 10 днів, Розувастатин 20 мг/добу. До того в літку 2023 р., двічі отримувала курс антибактеріальної терапії тривалістю 7 днів з приводу гострого середнього отиту (Амоксиклав 1000 мг/добу). Добовий діурез на момент виписки сягав 2-2.5 л/добу. Призначено Мінірін мелт 30 мкг двічі на добу з метою контролю ніктурії та зменшення поліурії. Після виписки відновилися судоми рук та ніг, у зв'язку з чим за місцем проживання проводилися інфузії розчинів Рінгеру, Реосорбілакту та 0,9 % NaCl. Зі слів пацієнтки, протягом квітня 2024 року прове-

дено 3 курси інфузії 0.9 % NaCl об'ємом 200-400 мл та тривалістю 10, 7 та 5 днів, відповідно, через гіпонатріємію (127-130 ммоль/л). Надалі пацієнтка перебувала на стаціонарному лікуванні в одному із ендокринологічних відділень (06.05.24-16.05.24). За даними біохімічного аналізу крові було виявлено: гіпокальціємію (іонізований кальцій 1.01 (N 1.09-1.35), гіпонатріємію – 134 ммоль/л (N 136-145), НвА1С 5.2%, креатинін 62.7 мкмоль/л, сечовина 3.7 ммоль/л. Враховуючи появу схильності до артеріальної гіпотензії, незалежної від кількості діурезу, відсутність периферичних набряків та гіпонатріємію, пацієнтці проведено ретельне комплексне обстеження з метою підтвердження/спростування надниркової недостатності (табл. 2).

Таблиця 2

### Діагностика надниркової недостатності

	Активний ренін	Альдостерон	А-Р співвідношення	Метанефрин	Норметанефрин	Mg	Вазопресин
Травень	10.66 пг/мл № (2.5-53)	128.95 пг/мл N (14.21-156.4)	12,1 N (0.5-37.8)	11.04 пг/мл N (до 100)	39.90 пг/мл N (до 216)	1.04 N (0.66-1.07)	8.32 пг/мл N (0.8-28.2)

Після відповідного обстеження надниркову недостатність було виключено та встановлено діагноз: Нецукровий діабет? Рекомендовано подальший прийом Мінірін 30 мкг вранці, 30 мкг в обід, 60 мкг на ніч. Призначені рекомендації пацієнтка виконувала епізодично, оскільки після щоденного прийому протягом тижня не відмічала позитивних змін у зменшенні ніктурії, зберігались судоми в нижніх кінцівках та виражена слабкість; зміни в об'ємі добового діурезу не корелювали з прийомом Мінірину, поліурія > 3 л/добу також мала епізодичний характер та не супроводжувалася полідипсією.

21.05.2024 пацієнтка звернулася за консультацією до медичного центру «Нефроцентр» у м. Запоріжжя, де враховуючи анамнез захворювання, лабораторні та інструментальні дані, діагноз нецукрового діабету було виключено та запропоновано проведення тесту на депривацію води з подальшим визначенням осмолярності сечі. Від запропонованого тесту пацієнтка відмовилась. Спираючись на дані анамнезу, погіршення стану у вигляді появи поліурії, ніктурії, гіпонатріємії та гіпокальціємії після чергового застосування курсу антибактеріальних лікарських засобів, пацієнтці встановлено клінічний діагноз: Хронічний медикаментозно-індукований тубулоінтерстиційний нефрит. Призначено Метилпреднізолон 16 мг/добу зі зменшенням дози на 4 мг 1 раз/2 тижні (сумарна тривалість лікування 8 тижнів з 03.06.24 по 28.07.24 р). Після завершення курсу лікування досягнуто повної клініко-лабораторної ремісії: креатинін крові 83.1 мкмоль/л, сечовина 4.26 ммоль/л, ШКФ 66 мл/хв/1.73 м<sup>2</sup>, натрій 143 ммоль/л, калій 4.3 ммоль/л; питома вага сечі 1010-1015.

**Клінічний випадок 2.** Пацієнтка Д., 25 років звернулася за консультацією до нашого центру 19.06.2024 року зі скаргами на нападopodobний епізодичний астенічний синдром (пресинкопе), який супроводжувався судомами в м'язах нижніх кінцівок; добовий діурез > 8 л/добу; постійна спрага; поява набряків обличчя протягом останніх 6 місяців.

З анамнезу: в дитинстві двічі хворіла на пієлонефрит, з приводу чого перебувала на стаціонарному лікуванні. З того часу матір пацієнтки змушувала вживати значну кількість рідини, з так званою дезінтоксикаційною метою. З дитинства сформувалася почуття постійної спраги та необхідності вживання рідини до 5-6 літрів на добу.

З січня 2024 р з'явилося відчуття збільшення загальної слабкості, частіших судом в нижніх кінцівках, поява набряків обличчя переважно у ранковий час. За даними загального аналізу крові не виявлено відхилень від референсних значень. Біохімічне дослідження крові: глюкоза 4.2 ммоль/л, загальний білок 72.8 г/л, альбумін 44.3 г/л, креатинін 63.2 мкмоль/л, сечовина 4.5 ммоль/л, ШКФ 119 мл/хв/1.73 м<sup>2</sup>, натрій 140 ммоль/л, калій 5.0 ммоль/л. Загальний аналіз сечі: питома вага 1025, білок – негативний, еритроцити 0-1 в п/з, лейкоцити-1-3 у п/з; осмолярність сечі 420 мосмоль/л. На наступному етапі діагностичного пошуку причин поліурії-полідипсії пацієнтці запропоновано визначення рівня осмолярності плазми крові та рівня копептину (табл. 3), аналіз сечі за Зимницьким (табл. 4).

Таблиця 3

## Осмоляльність плазми крові та копептин (клінічний випадок № 2)

Показник	Результат	Одиниці виміру	Референтний інтервал
Копептин (C-terminal pro-arginine-vasopressin)	3.9	пмоль/л	Значення в залежності від осмоляльності: 270-280 мосмоль/кг: <11.6 281-285 мосмоль/кг: 1.0-13.6 286-290 мосмоль/кг: 1.5-15.3 291-295 мосмоль/кг: 2.3-24.5
Осмоляльність сироватки	287	мОсм/кг	Дорослі від 18 років: 280-296

Таблиця 4

## Аналіз сечі за Зимницьким (клінічний випадок № 2)

Аналіз сечі за Зимницьким (21.06.2024)		
Час	Об'єм (л)	Питома вага
1-а порція (9:00-12:00)	0.630	-
2-а порція (12:00-15:00)	0.760	1013
3-а порція (15:00-18:00)	0.620	1020
4-а порція (18:00-21:00)	0.530	1015
5-а порція (21:00-24:00)	0.890	1017
6-а порція (00:00-03:00)	0.870	1019
7-а порція (3:00-6:00)	0.920	1013
8-а порція (6:00-9:00)	0.630	1014
Добовий діурез (9:00-6:00)- 5.85 л; Денний діурез (9:00-21:00)-2.54 л; Нічний діурез (21:00-6:00)-3.31 л; Денний: Нічний= 1:1.3 Коментар: Питома вага сечі в межах референсних значень		

УЗД екстракраніальних артерій (10.04.24): діаметр та швидкісні характеристики екстракраніальних гілок БЦА достатні; ознаки непрямолінійного ходу правої та лівої ХА в кістковому каналі на рівні С4-С5. УЗД нирок (02.05.2024): права нирка 115x51 мм, паренхіма 18 мм; ліва нирка 116x54 мм, паренхіма 19 мм; порушення ехоструктури нирок не виявлено.

Проаналізувавши отримані дані, виключено гіпернатріємію, гіперосмоляльність плазми крові, гіпостенурію, гіпоосмоляльність сечі, у пацієнтки виключено діагноз нецукрового діабету. На наступному етапі диференційної діагностики проведено тест з депривацією води тривалістю 8 годин, в результаті якого отримано осмоляльність сечі 675 мОсм/кг, що становило 60% приросту від вихідного рівня. Отже, у пацієнтки діагностовано

первинну психогенну полідипсію та скеровано на консультацію до психоневролога.

Консультація невролога 24.06.24: синдром вегетативної дисфункції, пароксизмальний перебіг; часті важкі вегетативні напади, диссомнія, виражений астеничний синдром. Призначено: Есцитам (інгібітор зворотнього захоплення серотоніну): 2.5 мг зранку 5 днів, 5 мг зранку 5 днів, 7.5 мг зранку 5 днів, 10 мг зранку 1 місяць; Метіда (Віт В6 30 мг + Mg 300 мг) 1 саше 1 р/добу-2 місяці; Опіпрам (інгібітор зворотнього захоплення моноамінів) 50 мг 3р/добу 1 місяць. На тлі призначеного лікування досягнуто часткової клінічної ремісії: зменшення кратності судом нижніх кінцівок, відсутність пресинкопальних станів, зменшення кількості випитої рідини до 4.5-5 л/добу, добовий діурез до 5 л/добу, відсутність ніктурії.

**Обговорення.** У даній роботі представлено два клінічні випадки поліурії, які мають подібні клінічні прояви, але ілюструють різні патогенетичні механізми цього симптому та демонструють як ретельний аналіз анамнезу, клінічних та лабораторних даних може допомогти у виборі правильної тактики лікування. Описані випадки підкреслюють важливість комплексного та індивідуального підходу до діагностики поліурії. Такий комплексний підхід вимагає, в першу чергу, виключення найбільш поширених причин поліурії, які наведені нижче.

Цукровий діабет є однією з найпоширеніших причин поліурії. У хворих на цукровий діабет поліурія виникає внаслідок осмотичного діурезу, спричиненого підвищеним рівнем глюкози в крові. Коли концентрація глюкози в крові перевищує нирковий поріг (зазвичай близько 180 мг/дл або 10 ммоль/л), надлишок глюкози виводиться з сечею, збільшуючи її осмолярність та об'єм [1, 3]. Тому у пацієнтів із встановленим цукровим діабетом та наявністю симптому поліурії, в першу чергу, необхідно визначити об'єм добового діурезу та виключити водний діурез [1, 3, 14].

Нецукровий діабет (НЦД) – це ендокринна патологія, яка обумовлена дефектом синтезу, транспорту або осморегульованої секреції вазопресину (АДГ) або зниженою чутливістю епітелію ниркових каналців до фізіологічної дії вазопресину, що призводить до нездатності нирок концентрувати сечу й проявляється вираженою спрагою та екскрецією великої кількості гіпотонічної сечі [5, 8-10]. Статистичних даних щодо захворюваності на нецукровий діабет в Україні немає. Поширеність НЦД в популяції становить 0,004-0,01% -1:25000 населення (US Census Bureau, Population Estimates, 2004) [10]. Відзначається світова тенденція до росту поширеності центрального НЦД, що пов'язують із збільшенням числа хірургічних втручань на головному мозку й гіпофізі, а також кількості черепно-мозкових травм, у разі яких випадки розвитку НЦД складають до 30% [5, 8].

Нефрогенний НЦД є результатом неадекватної реакції нирок на фізіологічну дію вазопресину, яка виникає через побічні ефекти різних препаратів або через електролітні порушення-лікування літієм, гіперкальціємію, гіпокаліємію) або спадкові причини (через мутації в генах, що кодують аргінін-вазопресинові рецептори 2 типу, канали аквапорину-2) [7].

Клінічні прояви НЦД: поліурія, полідипсія, загальна дегідратація (зниження тургору шкірних покривів, сухість у роті, схильність до артеріальної гіпотензії), розлади зі сторони шлунково-кишкового тракту, прогресивне схуднення, порушення сну (через переважання ніктурії), роздратованість [5, 7-10].

Центральний або нефрогенний НЦД необхідно диференціювати від первинної полідипсії, яка

включає надмірне споживання великої кількості води, незважаючи на нормальну секрецію та дію вазопресину [11, 12]. Первинна полідипсія виникає у пацієнтів з психічними розладами (психогенна полідипсія) стає все більш поширеною в загальній популяції через компульсивне вживання води [11,12]. Надмірне споживання води може призводити до зменшення осмолярності крові, зниження чутливості осморцепторів гіпоталамусу і пригнічення фізіологічної секреції вазопресину [11,12]. Діагностика психогенної полідипсії вимагає виключення інших причин поліурії, особливо нецукрового діабету. Ключовим діагностичним тестом є проба з депривацією води, яка дозволяє оцінити здатність нирок концентрувати сечу [6, 7, 11, 12].

У представленому другому клінічному випадку діагноз психогенної полідипсії був підтверджений після проведення тесту з депривацією води, який показав 60% приріст осмолярності сечі від вихідного рівня. Лікування психогенної полідипсії часто вимагає мультидисциплінарного підходу, включаючи психотерапію та, за необхідності, медикаментозне лікування супутніх психічних розладів [6, 7, 11, 12].

Тубулоінтерстиціальний нефрит (ТІН) – це гетерогенна група неспецифічних уражень каналців і інтерстиціальної тканини нирки з наступним поширенням запального процесу на всі структури ниркової тканини інфекційного, алергічного або токсичного генезу [13, 15-18]. Аналіз основних причин хронічної інтерстиційної патології встановив, що у 63,4% випадках ТІН виникає внаслідок хронічного впливу медикаментів (НПЗЗ, антибіотики, анальгетики, фуросемід та ін.), у 14,6% – внаслідок бактеріального впливу (пієлонефрит), у 10,8% – обструктивного впливу, в тому числі сечокам'яної хвороби, пієлоренального рефлюксу, стриктури сечовода, тоді як у 8% пацієнтів генез захворювання залишається нез'ясованим [15-18]. Діагностика ТІН є складним завданням. Суттєві відмінності в поширеності ТІН визначаються недосконалістю діагностики, неузгодженістю діагностичних критеріїв та неспецифічністю клінічних проявів ТІН [17, 18].

ТІН є важливою, але часто недооціненою причиною поліурії. У хворих на ТІН відбувається ураження каналцевого апарату нирок, що призводить до порушення їх концентраційної функції та зниження чутливості рецепторів каналців до антидіуретичного гормону (АДГ) [13, 15]. Порушення реабсорбції води та електролітів у каналцях може спричинити значне збільшення об'єму сечі [18].

Поліурія у пацієнтів з ТІН часто супроводжується зниженням осмолярності сечі та може асоціюватися з електролітними порушеннями, зокрема гіпонатріємією та гіпокальціємією [13, 14, 16]. Діагностичними ознаками ТІН як причини поліурії є зниження каналцевої реабсорбції (нижче 97-99%), можливе збільшення хвилинного діурезу (вище 1.4

мл/хв) та нормальна або знижена осмолярність сечі за підвищеного добового діурезу [13-16]. Важливо відзначити, що ТІН може бути спричинений різними факторами, включаючи медикаментозну терапію, що підкреслює необхідність ретельного збору анамнезу у пацієнтів з поліурією [18]. Проведення проби з депривацією води може допомогти диференціювати ТІН від НЦД [6, 7]. Лікування поліурії, спричиненої ТІН, спрямоване на усунення причини захворювання та корекцію електролітних порушень [18]. У деяких випадках ефективним може бути призначення кортикостероїдів, зокрема метилпреднізолону, що може призвести до повної клініко-лабораторної ремісії, як у нашому випадку.

Для точного встановлення діагнозу та подальшого успішного лікування необхідно звертати особливу увагу на алгоритм діагностичного пошуку, інтерпретацію лабораторних та інструментальних досліджень. У клінічній практиці слід розрізняти поліурію від полакіурії – частого сечовипускання за збереженого добового діурезу [1-3, 5, 10]. Цей стан діагностується шляхом кількісного вимірювання добового діурезу та визначення типу діурезу – водного або осмотичного, зокрема у пацієнтів з цукровим діабетом, де відбувається перевищення осмотичного навантаження в ниркових канальцях [3, 5, 10].

Осмотичний діурез можна підтвердити шляхом вимірювання осмолярності добової сечі і обчисленням загального добового осмолярного вики-

ду за формулою: осмолярність сечі x 24-годинний об'єм сечі [10]. Пацієнтам з осмолярністю сечі від 300 до 600 мосмоль/л необхідно визначати загальний добовий осмолярний викид, що в сучасному алгоритмі діагностичного пошуку причин поліурії не є рутинним обстеженням [10].

В представлених клінічних випадках встановлена осмолярність сечі була 499.5 мосмоль/л та 420 мосмоль/л, відповідно, без подальшого визначення загального добового осмолярного викиду через відмову пацієнтів від подальшого дообстеження.

Основними детермінантами підтримки водного гомеостазу є гормон аргінін- вазопресин (АВП) [14]. Ключова роль вазопресину полягає у регуляції рівня води та електролітного складу крові через ефект зниження екскреції води в дистальних канальцях та збірних трубочках нирок [14].

Успішна діагностика причин поліурії в даних клінічних випадках заснована на застосуванні мінімального спектру обстежень та базового алгоритму проведення диференційної діагностики (табл. 5) [7, 10, 11, 14].

Важливу роль у цьому підході відіграють специфічні лабораторні та інструментальні дослідження, що дозволяють оцінити патогенетичні механізми поліурії. Далі розглянемо основні підходи до діагностики та менеджменту цього стану, спираючись на наукові публікації та рекомендації.

Таблиця 5

## Спектр обстеження пацієнта з симптомом поліурії

<b>I. Лабораторна діагностика:</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Загальний аналіз сечі; аналіз сечі за Зимницьким; осмолярність сечі;</li> <li>2. Біохімічне дослідження крові: калій, натрій, іонізований кальцій, сечовина, креатинін;</li> <li>3. Визначення осмолярності плазми крові;</li> <li>4. Визначення рівня вазопресину АБО копептину крові;</li> </ol>
<b>II. Інструментальні методи обстеження:</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оглядова бічна рентгенографія черепа;</li> <li>2. МРТ або КТ головного мозку (гіпоталамо-гіпофізарної ділянки);</li> </ol>
<b>III. Додаткові обстеження:</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Дегідратаційний тест при осмолярності плазми крові 270-300 мОсм/кг;</li> </ol>

Тест на депривацію води в поєднанні з введенням десмопресину є «золотим стандартом» діагностики причин поліурії [6, 7, 14] (рис. 1).

В першу чергу, у пацієнта з поліурією необхідно оцінити концентрацію натрію сироватки крові та осмолярність плазми та/або обмежити вживання будь-якої рідини протягом 8 годин, або введенням гіпертонічного сольового розчину (3% розчин NaCl) з метою досягнення концентрації натрію в

сироватці (>145 ммоль/л, але <150 ммоль/л) та стимулювати вазопресин достатнього для утворення максимально концентрованої сечі [6, 7, 10]. Якщо в результаті проведення тесту на обмеження вживання рідини – рівень осмолярності сечі зростає на 60% від вихідного значення або >750 мОсм/кг, у пацієнта діагностується первинна полідипсія, що і було продемонстровано в клінічному випадку №2 [10-12].



**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів. Автори брали участь в супроводі пацієнтів в якості консультантів.

**Джерела фінансування.** Автори заявляють про відсутність фінансової підтримки від жодної організації для поданої роботи.

### Інформація про внесок кожного учасника.

**А.К. Голованова:** концептуалізація, пошук та опрацювання фахової літератури за темою, аналіз даних, обстеження та лікування пацієнтів, підготовка рукопису;

**Т.І. Остапенко:** обстеження та лікування пацієнтів, аналіз даних і рецензування рукопису.

### Література:

- Ramirez-Guerrero G, Müller-Ortiz H, Pedreros-Rosales C. Polyuria in adults. A diagnostic approach based on pathophysiology. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2022;222(5):301-308. doi: 10.1016/j.rceng.2021.03.003.
- Weiss JP, Everaert K. Management of Nocturia and Nocturnal Polyuria. *Urology*. 2019;133S:24-33. doi: 10.1016/j.urology.2019.09.022.
- Nigro N, Grossmann M, Chiang C, Inder WJ. Polyuria-polydipsia syndrome: a diagnostic challenge. *Intern Med J*. 2018;48(3):244-253. doi: 10.1111/imj.13627.
- Weiss JP, Blaivas JG. Nocturia. *Curr Urol Rep*. 2003;4(5):362-6. doi: 10.1007/s11934-003-0007.
- Christ-Crain M, Winzeler B, Refardt J. Diagnosis and management of diabetes insipidus for the internist: an update. *J Intern Med*. 2021;290(1):73-87. doi: 10.1111/joim.13261.
- Trimpou P, Olsson DS, Ehn O, Ragnarsson O. Diagnostic value of the water deprivation test in the polyuria-polydipsia syndrome. *Hormones (Athens)*. 2017;16(4):414-422. doi: 10.14310/horm.2002.1762.
- Vaz de Castro PAS, Bitencourt L, de Oliveira Campos JL, Fischer BL, Soares de Brito SBC, Soares BS, et al. Nephrogenic diabetes insipidus: a comprehensive overview. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2022;35(4):421-434. doi: 10.1515/jpem-2021-0566.
- Diabetes insipidus. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):55. doi: 10.1038/s41572-019-0114-z.
- Christ-Crain M, Bichet DG, Fenske WK, Goldman MB, Rittig S, Verbalis JG, et al. Diabetes insipidus. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(54):1-20. doi: 10.1038/s41572-019-0103-2.
- Refardt J. Diagnosis and differential diagnosis of diabetes insipidus: Update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(5):101398. doi: 10.1016/j.beem.2020.101398.
- Sailer C, Winzeler B, Christ-Crain M. Primary polydipsia in the medical and psychiatric patient: characteristics, complications and therapy. *Swiss Med Wkly*. 2017;147:w14514. doi: 10.4414/smw.2017.14514.
- Ahmadi L, Goldman MB. Primary polydipsia: Update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(5):101469. doi: 10.1016/j.beem.2020.101469.
- Meola M, Samoni S, Petrucci I. Clinical Scenarios in Chronic Kidney Disease: Chronic Tubulointerstitial Diseases. *Contrib Nephrol*. 2016;188(1):108-19. doi: 10.1159/000445473.
- Chasseloup F, Tabarin A, Chanson P. Diabetes insipidus: Vasopressin deficiency... *Ann Endocrinol (Paris)*. 2024;85(4):294-299. doi: 10.1016/j.ando.2023.11.006.
- Eddy AA. Drug-induced tubulointerstitial nephritis: hypersensitivity and necroinflammatory pathways. *Pediatr Nephrol*. 2020;35(4):547-554. doi: 10.1007/s00467-019-04207-9.
- Eknoyan G. Interstitial Nephritis: Wherefrom, Wherein, and Where to. *Exp Clin Transplant*. 2023;21(12):42-45. doi: 10.6002/ect. IAHNCongress.10.
- Gaïseniuk FZ, Driianskaia VE, Drannik GN, Rudenko MIu, Lavrenchuk OV, Stepanova NM, et al. Proinflammatory cytokines in patients with pyelonephritis. *Lik Sprava*. 2013; (6):32-37.
- Hruska KA. Treatment of chronic tubulointerstitial disease: A new concept. *Kidney Int*. 2002;61(5):1911-1922. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00331.x.
- Timper K, Fenske W, Kühn F, Frech N, Arici B, Rutishauser J, et al. Diagnostic Accuracy of Copeptin in the Differential Diagnosis of the Polyuria-polydipsia Syndrome: A Prospective Multicenter Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2268-74. doi: 10.1210/jc.2014-4507.



## Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;  
eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

### Research article

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.05

Muthanna Muwafaq Abdullah, Bahaa Abdullah Laftaah AL-Rubaii

### Effect of *Lactobacillus* supernatant on swarming-related gene expression in *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections

Department of Biology, College of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Citation:

Abdullah MM, AL-Rubaii BAL. Effect of *Lactobacillus* supernatant on swarming-related gene expression in *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections. Ukr J Nephrol Dial. 2024;4(84):39-48. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.05.

**Abstract.** *Proteus mirabilis* isolates have been intensively researched for their capacity to cause urinary tract infections (UTIs) and their swarming motility, although little is known about this phenomenon. Probiotic *Lactobacillus* species, which are beneficial bacteria, are being studied worldwide as therapeutic and preventative agents against bacterial infections. This study investigated *Lactobacillus* supernatants as a potential new treatment against *Proteus mirabilis*. In addition to testing their antimicrobial and anti-swarming activities, the research also aimed to understand the genetic mechanisms behind the observed phenotypic changes.

**Methods.** A total of 150 urine specimens were collected from UTI patients at various hospitals in Baghdad. Direct culture was performed by streaking the specimens on differential media. RNA was extracted and purified from the bacterial isolates, and then reverse transcription and quantitative PCR were used to evaluate swarming-related gene expression. Gene expression was assessed relative to a reference gene to reveal how probiotics regulate swarming behavior at the genetic level. Gene expression patterns varied, indicating complex genomic responses to *Lactobacillus* exposure.

**Results.** UTIs affected 50 males (33.33%) and 100 females (66.66%) of various ages. *Proteus mirabilis* was identified in 30 (20%) of the 150 samples. Resistance was observed in 25 (83.33%) isolates for azithromycin and amoxicillin/clavulanic acid, and in 22 (73.33%) isolates for meropenem. Real-time PCR showed significant alterations in the expression of four swarming-related genes (*rsbA*, *umoD*, *ZapA*, and *FliL*). The *rsbA* gene showed a notable increase in expression, while another sample displayed a decrease. The *umoD* gene exhibited the largest change, with expression doubling in some cases. *ZapA* showed the greatest increase, nearly tripling in expression in one sample. *FliL* expression also rose in multiple isolates. Swarming activity was positively correlated with gene expression levels for *rsbA* ( $r = 0.8$ ,  $p = 0.009$ ), *umoD* ( $r = 0.635$ ,  $p = 0.045$ ), *ZapA* ( $r = 0.942$ ,  $p = 0.001$ ), and *FliL* ( $r = 0.894$ ,  $p = 0.001$ ).

**Conclusions.** The study reveals a complex gene network regulating the swarming motility of *Proteus mirabilis*. It suggests that *Lactobacillus acidophilus* supernatants can modify gene expression and bacterial motility, potentially aiding in the treatment of UTIs.

**Keywords:** *Lactobacillus*, swarming, *Proteus mirabilis*, urinary tract infections.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© M. M. Abdullah, B. A. L. AL-Rubaii, 2024.

Correspondence should be addressed to Bahaa Abdullah Laftaah AL-Rubaii:

[bahaa.abdullah@sc.uobaghdad.edu.iq](mailto:bahaa.abdullah@sc.uobaghdad.edu.iq)

#### Article history:

Received August 23, 2024

Received in revised form  
October 02, 2024

Accepted October 06, 2024



© Абдулла М. М., Аль-Рубаї Б. Ф. Л., 2024

УДК: 616.61/63-022.76:575.113

Мутанна Мувафак Абдулла, Бахаа Абдулла Лафтаах Аль-Рубаї

## Вплив супернатанту *Lactobacillus* на експресію генів, асоційованих з роїнням *Proteus mirabilis*, ізольованого від пацієнтів з інфекціями сечової системи

Кафедра біології, факультет природничих наук, Багдадський університет, Багдад, Ірак

**Резюме.** Ізоляти *Proteus mirabilis* інтенсивно досліджуються через їхню здатність викликати інфекції сечової системи (ІСС) та властивість роїння, хоча про це явище мало що відомо. Пробиотичні види *Lactobacillus* вивчаються в усьому світі як терапевтичні та профілактичні засоби проти бактеріальних інфекцій. У цьому дослідженні було вивчено супернатанти *Lactobacillus* як потенційний новий засіб лікування ІСС, викликаних *Proteus mirabilis*. Крім тестування антимікробної та анти-роїльної активності, дослідження також мало на меті визначити генетичні механізми, які лежать в основі спостережуваних фенотипічних змін.

**Методи.** Загалом було зібрано 150 зразків сечі від пацієнтів з ІСС. Пряме культивування проводили шляхом нанесення зразків на диференціальні середовища. РНК була екстрагована та очищена з бактеріальних ізолятів, після чого за допомогою зворотної транскрипції та кількісної ПЛР було оцінено експресію генів, асоційованих із роїнням. Експресію генів оцінювали відносно референсного гена для того, щоб з'ясувати, як пробиотики регулюють роїльну поведінку на генетичному рівні.

**Результати.** ІСС діагностовано у 50 чоловіків (33,33%) і 100 жінок (66,66%) різного віку. *Proteus mirabilis* був визначений у 30 (20%) із 150 зразків. Резистентність була виявлена в 25 (83,33%) ізолятів до азитроміцину та амоксициліну/клавуланової кислоти, і в 22 (73,33%) ізолятів до меропенему. Кількісна ПЛР показала значні зміни в експресії чотирьох генів, асоційованих із роїнням (*rsbA*, *umoD*, *ZapA* та *FliL*). Ген *rsbA* продемонстрував підвищення рівня експресії, тоді як в іншій пробі спостерігалось зниження. Ген *umoD* продемонстрував найбільші зміни, при цьому в деяких випадках експресія подвоїлася. Експресія гена *ZapA* збільшилася найбільше, майже потроївшись в одній з проб. Експресія *FliL* також зросла в декількох ізолятах. Активність роєння позитивно корелювала з рівнями експресії генів *rsbA* ( $r = 0,8$ ,  $p = 0,009$ ), *umoD* ( $r = 0,635$ ,  $p = 0,045$ ), *ZapA* ( $r = 0,942$ ,  $p = 0,001$ ) та *FliL* ( $r = 0,894$ ,  $p = 0,001$ ).

**Висновки.** Представлене дослідження демонструє складну генетичну мережу, яка регулює роїльну мотильність *Proteus mirabilis* та припускає, що супернатанти *Lactobacillus acidophilus* можуть модифікувати експресію генів і бактеріальну рухливість, що потенційно може сприяти лікуванню ІСС.

**Ключові слова:** *Proteus mirabilis*, *Lactobacillus*, роїння, інфекції сечової системи.

**Introduction.** The bacterial genus *Proteus* consists of various species, including *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. mxyofaciens*, *P. penneri*, and *P. hauseri* [1]. These species can either exist as saprophytes in the gastrointestinal tracts of animals and humans or act as opportunistic pathogens in urinary tract infections (UTIs). In UTIs involving structural abnormalities or indwelling catheters, *Proteus mirabilis* is typically present [2]. The rise in drug resistance among *Proteus* species highlights the need for regular antimicrobial susceptibility monitoring to ensure effective therapeutic treatment [3]. A significant virulence factor of *Proteus* species, particularly *P. mirabilis*, is swarming motility, which is defined as “a rapid and coordinated movement of bacteria across surfaces, allowing them to spread quickly and colonize new areas.” This trait enables the bacteria to rapidly

spread across surfaces in a bull’s-eye pattern, increasing their resistance to antibiotics and predation while providing competitive advantages through the secretion of surfactants [4].

Non-motile, rod-shaped, Gram-positive *Lactobacillus* species may offer the potential to treat antibiotic resistance. Microorganisms in nutrient-rich habitats contribute to health benefits. According to Salvetti and O’Toole [5], *Lactobacillus* supernatants can impact *P. mirabilis* gene expression linked to swarming, suggesting a novel avenue for antibacterial treatment. Research shows that fermentative *Lactobacillus* species compete with harmful bacteria. These bacteria, part of the human gut microbiota, can adjust gene regulation to inhibit pathogenic quorum sensing. The antimicrobial effect of *Lactobacillus* is attributed to the production of bacteriocins, hydrogen peroxide, and organic acids. *Lactobacillus* supernatants may prevent *P. mirabilis* swarming and colonization of the urinary tract by eliminating other harmful bacteria [6–8].

Swarming genes such as *rsbA*, *umoD*, *ZapA*, and *FliL* in *P. mirabilis* control their movement. The *rsbA* gene encodes a sensor kinase in a two-component regu-

**Bahaa Abdullah Laftaah AL-Rubaii**  
bahaa.abdullah@sc.uobaghdad.edu.iq

latory system that regulates the initiation of swarming [1, 9]. Mutations in the *rsbA* gene result in early swarming, demonstrating its role in timing. *UmoD*, a key up-regulator of the *umo* operon, enhances flagellar gene expression and swarming motility during the transition from swimmer to swarmer cells. Swarming also increases the expression of the Zn-dependent metalloprotease encoded by the *ZapA* gene, which may degrade extracellular proteins and enhance movement. The *FliL* gene, a flagellar basal body gene, is essential for proper flagellar function and directly impacts swarming dynamics [10, 11]. Comparing gene expression during and after swarming can provide insights into the complex genomic networks controlling swarming in *P. mirabilis*. This will further elucidate the biology and molecular mechanisms of swarming [12].

The swarming motility of *P. mirabilis* accelerates colonization and involves cell differentiation and collective movement [13]. Swarming enhances antibiotic resistance; the increased permeability of swarmer cells and the expression of resistance genes may help these bacteria survive antimicrobial treatment. *Lactobacillus* supernatants may influence *P. mirabilis* gene expression, swarming behavior, and antibiotic sensitivity [14, 15]. While the antibacterial capabilities of *Lactobacillus* supernatants have been extensively studied, their effects on *P. mirabilis* swarming motility, a critical virulence factor in urinary tract infections, remain largely unexplored. Previous investigations into the antibacterial and probiotic activities of *Lactobacillus* have overlooked its potential to regulate gene expression related to swarming. This gap in the literature calls for further research into how sub-inhibitory concentrations of *Lactobacillus* supernatants affect critical gene expression.

**The present study aimed** to examine the antibacterial and anti-swarming properties of sub-inhibitory doses of *Lactobacillus* supernatant and to evaluate its influence on the gene expression of swarming-related genes in *P. mirabilis*.

**Materials and methods.** This study was conducted in accordance with ethical guidelines, and approval was obtained from the institutional review board of [Institution Name] (approval no. [xxx]). Written informed consent was obtained from all participants, and all procedures adhered to the principles of the Declaration of Helsinki.

**Isolation and identification of *Proteus spp.*** Specimen collection. One hundred urine specimens were obtained from UTI patients at various hospitals in Baghdad. The specimens were streaked on blood agar and MacConkey agar, then incubated aerobically at 37°C for 24 hours.

Identification of isolates. Morphological identification was performed based on Bergey's Manual [16], and biochemical tests were conducted according to references [11-13]. The identification of *P. mirabilis* and *Lactobacillus acidophilus* was confirmed using the VITEK 2 compact system. The antibiotic susceptibility test was applied on Mueller-Hinton agar medium,

and the disc diffusion method was employed [17]. The inhibition zones formed around the discs were measured in millimeters (mm) [18]. The antibiotics and their concentrations (µg/disc) used were: Gentamicin 10 (India), Azithromycin 15 (Germany), Meropenem 10 (United Kingdom), Ceftazidime 30 (Canada), Imipenem 10 (Germany), Levofloxacin 5 (U.S.), Ciprofloxacin 5 (Germany), Amoxicillin/clavulanic acid 30 (India), Trimethoprim 10 (U.S.), and Vancomycin 5 (Denmark).

**Swarming motility assay (central spot inoculation method).** Blood agar plates were inoculated with an overnight broth culture (0.01 ml), and the plates were incubated at 37°C overnight [19].

**Preparation of *Lactobacillus* cell-free culture supernatants.** Agar plates and MRS broth were used to cultivate *Lactobacillus*. The optical density of the standard cell suspension was adjusted using McFarland standard no. 0.5 turbidity. The supernatant was prepared by incubating 0.1 ml of the standard cell suspension in MRS broth at 37°C for 24 hours. *Lactobacillus* cells were removed through centrifugation and filtration. The supernatant stock solution was used to examine its inhibitory activity [20].

**Antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates.** Various concentrations of *Lactobacillus* supernatant were tested for antibacterial activity using the agar dilution method [21]. Briefly, distilled water (D.W.) was used to dilute the supernatant by 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, and 1/32, to reach a final volume of 10 ml. *Proteus mirabilis* was inoculated in nutrient broth for 24 hours. Double-concentration Muller-Hinton agar was autoclaved, then mixed with the appropriate supernatant concentrations in sterile Petri dishes. *P. mirabilis* isolates were spotted in microliters onto each plate and incubated at 37°C for 24 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of supernatant that inhibited bacterial growth. The swarming potential of the isolates was re-evaluated using sub-inhibitory concentrations of *Lactobacillus* supernatant.

**Gene expression analysis. RNA extraction and purification.** RNA extraction was performed using GeneAid reagents (South Korea), and RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop 1000 spectrophotometer. After overnight culture, bacteria were centrifuged, lysed, and mixed with ethanol. The supernatant was transferred to an RNA binding column, followed by washing with Pre-Wash Buffer and Wash Buffer. The column was dried, and RNase-free water was added to elute the pure RNA. This process ensured precise and efficient RNA extraction.

**cDNA synthesis, RT-PCR, and quantitative RT-PCR.** cDNA synthesis, reverse transcription-PCR (RT-PCR), and quantitative RT-PCR were performed on RNA samples, excluding those set aside for RNA sequencing (RNA-Seq). Dissociation curve analysis confirmed product specificity. Gene expression levels were quantified using the relative method with *rpoA* as the reference gene. The following primer sequences were used:

- rpoAF: 5'-GCGTGTTATAGCCCAGTTGA-3',  
rpoAR: 5'-AGGCTGACGAACATCACGTA-3'
- rsbAF: 5'-CTATACCTACCGCACCATGT-3',  
rsbAR: 5'-GAAGTCCCATCCGTTGATAC-3'
- FliLF: 5'-GGTGATCGCCATTATTGCAG-3',  
FliLR: 5'-AGCGTAACGTGATCCCTATG-3'
- umoDF: 5'-CAAGAGTGCCGTGTTTTCTATA-3',  
umoDR: 5'-CGATGATATCGCCCGTTTAA-3'
- ZapAF: 5'-GGCCAAGCATGGTTTAGTGA-3',  
ZapAR: 5'-GGCGACTATCTTCCGCATAA-3'

#### Results. Isolation proportions of *Proteus mirabilis*.

The study involved the collection of 150 urine samples from patients with UTIs admitted to various hospitals. The patient population consisted of 33.33% male and 66.66% female participants. These samples were cultivated on blood and MacConkey agar to identify *Proteus mirabilis*. *P. mirabilis* was isolated in 20% of the samples (30 samples), with a higher incidence in female patients

(12.66%) compared to male patients (7.33%). The remaining 80% (120 samples) were negative for bacteria, comprising 54% female and 26% male samples. This data highlights a gender-based variation in the incidence of *P. mirabilis* in the tested population.

**Patterns of antibiotic susceptibility in *Proteus mirabilis*.** The disc diffusion assay revealed the antibiotic resistance patterns of *P. mirabilis* isolates. Susceptibility is indicated by the presence of inhibition zones around antibiotic-impregnated discs, while resistance is signified by smaller or absent zones of inhibition. The isolates demonstrated resistance to Amoxicillin/clavulanic acid, Azithromycin, and Meropenem, with resistance rates of 25 (83.33%), 25 (83.33%), and 22 (73.33%), respectively. Resistance rates for Ceftazidime, Gentamicin, and Vancomycin were 21 (70%), 20 (66.66%), and 16 (53.33%), respectively. Conversely, sensitivity rates were 26 (86.66%) for Imipenem, Levofloxacin, and Ciprofloxacin, and 18 (60%) for Trimethoprim.

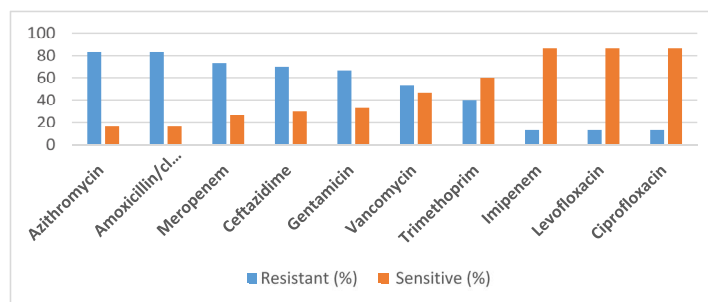


Fig. 1. Test of antibiotic sensitivity for isolates of *Proteus mirabilis*.

**Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).** Sixteen antibiotics were tested using VITEK 2 Compact and an AST card. The antibiotics showed resistance to Piperacillin ( $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ ), Clavulanic acid (tazobactam/16–64  $\mu\text{g/ml}$ ), and Ticarcillin, with MIC values of 25 (83.33%). Additionally, 66.66% of isolates demonstrated resistance to Ceftazidime with MICs of at least 64  $\mu\text{g/ml}$ . Sixteen isolates (53.33%) showed resistance to Imipenem ( $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$ ), Aztreonam ( $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ ), Meropenem (1  $\mu\text{g/ml}$ ), and Cefepime. Approximately 50% of samples showed resistance to Amikacin ( $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) and Gentamicin (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Resistance rates for Sulfamethoxazole ( $\geq 320$   $\mu\text{g/ml}$ ), Trimethoprim, and Minocycline (8  $\mu\text{g/ml}$ ) were around 40% (12 isolates). Fewer isolates (13.33%) showed resistance to Tobramycin ( $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ), Ciprofloxacin ( $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$ ), and Piperacillin/Tazobactam ( $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ).

**Swarming behavior of *Proteus mirabilis* on blood agar.** The bacterium exhibits a unique swarming growth pattern, characterized by tendril-like extensions from the central inoculation point, demonstrating its rapid colonization and spreading ability across solid surfaces. On blood agar, *Proteus mirabilis* forms these tendrils, indicating quick diffusion. Initial swarming diameters were 8.3 cm, 6.7 cm, 7.7 cm, and 6.6 cm. After treatment with *Lactobacillus* supernatant, these diameters

decreased to 3.1 cm, 2.4 cm, 3.2 cm, and 3.0 cm, indicating reduced swarming. This significant reduction suggests that chemicals in *Lactobacillus* supernatants inhibit *P. mirabilis* motility on blood agar. The observed interaction highlights the antagonistic relationship between *Lactobacillus acidophilus* and *P. mirabilis*, suggesting that *Lactobacillus* products could be used to treat infections caused by swarming pathogens.

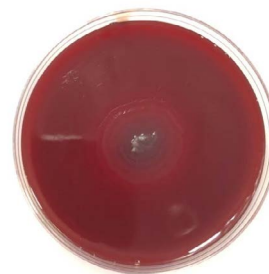


Fig. 2. Swarming activity of *Proteus mirabilis* on blood agar in the presence of *Lactobacillus acidophilus*.

Estimation of gene expression. Real-time PCR revealed changes in the expression levels of four genes—*rsbA*, *umoD*, *ZapA*, and *FliL*—in isolates treated with *Lactobacillus acidophilus* supernatants compared to a reference or control. After treatment, the expres-

sion of the *rsbA* gene in isolate 77 increased by 1.62-fold, while there was no significant change in isolate 55 (0.96). Isolates 80 and 90 exhibited reductions in expression, with 0.54 and 0.83-fold decreases, respectively. *UmoD* expression showed a significant increase of 2-fold in isolate 77. Isolate 55 was upregulated by 1.25, while isolates 80 and 90 were downregulated by 0.59 and 0.68, respectively. The *ZapA* gene was upregulated in isolate 77 with a 2.93-fold increase, while

isolate 55 showed a fold change of 1 (0.85), and isolates 80 and 90 were downregulated (0.61 and 1.11, respectively). The *FliL* gene showed a 1.25-fold upregulation in isolate 77, with isolate 55 showing a slight increase (1.05) and isolate 80 downregulated by 0.66. Isolate 90 exhibited a 1.29-fold increase. These changes suggest that *Lactobacillus acidophilus* supernatants may influence the gene expression of swarming-related genes in *P. mirabilis*.

Table 1

**Gene expression levels of *rsbA*, *umoD*, *ZapA*, and *FliL* before and after treatment with *Lactobacillus acidophilus* supernatants**

Isolate code	pre			post			ΔΔCt	Fold change
	hkg	<i>rsbA</i>	ΔCt	hkg	<i>rsbA</i>	ΔCt		
80	8.45	13.23	4.78	8.5	14.16	5.66	0.88	0.5433674
77	8.18	15.36	7.18	8.56	15.04	6.48	-0.7	1.6245048
55	13.32	14.74	1.42	10.83	12.31	1.48	0.06	0.9592641
90	8.49	12.68	4.19	10.44	14.89	4.45	0.26	0.8350879
Isolate code	pre			post			ΔΔCt	Fold change
	hkg	<i>umo</i>	ΔCt	hkg	<i>umo</i>	ΔCt		
80	8.45	10.13	1.68	8.5	10.92	2.42	0.74	0.5987394
77	8.18	11.41	3.23	8.56	10.79	2.23	-1	2
55	13.32	15.17	1.85	10.83	12.35	1.52	-0.33	1.2570134
90	8.49	9.55	1.06	10.44	12.04	1.6	0.54	0.6877709
Isolate code	pre			post			ΔΔCt	Fold change
	hkg	<i>ZapA</i>	ΔCt	hkg	<i>ZapA</i>	ΔCt		
80	8.45	10.21	1.76	8.5	10.97	2.47	0.71	0.6113201
77	8.18	12.12	3.94	8.56	10.95	2.39	-1.55	2.9281714
55	13.32	13.92	0.6	10.83	11.67	0.84	0.24	0.8467453
90	8.49	10.24	1.75	10.44	12.04	1.6	-0.15	1.1095695
Isolate code	pre			post			ΔΔCt	Fold change
	hkg	<i>fli</i>	ΔCt	hkg	<i>fli</i>	ΔCt		
80	8.45	9.98	1.53	8.5	10.62	2.12	0.59	0.6643429
77	8.18	10.52	2.34	8.56	10.57	2.01	-0.33	1.2570134
55	13.32	14.54	1.22	10.83	11.98	1.15	-0.07	1.0497167
90	8.49	9.87	1.38	10.44	11.45	1.01	-0.37	1.2923528

Gene expression and swarming correlation. Table 2 reveals a strong positive correlation between gene expression and *Proteus mirabilis* swarming. Statistically significant correlations between the expression of *rsbA*, *UmoD*, *ZapA*, and *FliL* suggest that these genes regulate swarming behavior. Although gene activity

increased after *Lactobacillus* supernatant treatment, swarming rates decreased, suggesting a complex regulatory mechanism involving multiple genes. Investigating these networks is essential for understanding microorganism motility patterns.

Table 2  
Correlation between gene expression levels and swarming activity

Gene	Pearson's r	p-value
<i>rsbA</i>	0.8	0.009
<i>UmoD</i>	0.635	0.045
<i>ZapA</i>	0.942	0.001
<i>FliL</i>	0.894	0.001

**Discussion.** In 2023, Al-Ezzy et al. reported that 63.33% of *Proteus mirabilis* cases in Iraq occurred in females, while 36.67% were in males. The 17–23 age group had a 33.33% infection rate, while the 24–30 age group had a rate of 16.67% [22]. In 2022, Al-Obaidi and Al-Hashimy found 22 *P. mirabilis* isolates among UTI patients in Baghdad hospitals, with an isolation rate of 21.34% [23]. Similarly, in 2022, Al-Jubouri and Shami studied UTIs in Iraq and identified microbial growth in 62.3% of 180 urine samples, with no growth in 37.7%. *P. mirabilis* was isolated in 2.7% of patients, though the actual number of cases was not provided [24]. These studies show that the frequency of *P. mirabilis* varies by gender and age. It is most common in individuals aged 17 to 37, but recent research suggests it is more frequent in boys under 14 [25].

Under the oil immersion lens of a compound light microscope, the bacterial isolates appeared as reddish-pink rods, a characteristic typically associated with *Proteus* bacteria. This observation aligns with previous findings [26]. In the present study, *Lactobacillus* species were identified using Gram staining, appearing as Gram-positive bacilli and cocco-bacilli, either solitary or paired. Several studies have reported similar results [27]. This investigation supports both domestic and international research findings.

Mohammad et al. found that *P. mirabilis* isolates from patients with kidney failure and UTIs in Baghdad exhibited resistance to ciprofloxacin [28]. Al-Nabhani and Shami reported *P. mirabilis* resistance to ceftazidime (86.1%) and gentamicin (76.9%) [29]. Ciprofloxacin resistance was moderate at 40%, and resistance to amoxicillin-clavulanic acid was 56.9%. Levofloxacin (33.8%), imipenem (15.3%), and meropenem (1.5%) had lower resistance rates [30]. Antibiotic susceptibility of *P. mirabilis* isolates has varied across studies. For instance, isolates from Baqubah Hospital were 80% sensitive to ciprofloxacin, 60% sensitive to gentamicin, and 82.6% sensitive to imipenem. Newer carbapenems, such as imipenem, are more effective against Gram-negative bacteria due to their lower resistance rates [31]. The increasing resistance to gentamicin in local hospitals underscores the importance of aminoglycosides in treating UTIs. The complex structure of *Proteus* spp.'s outer cytoplasmic membrane likely contributes to its resistance mechanisms. Additionally, improper antimicrobial use has been linked to antibiotic resistance in *Proteus* spp. and other microorganisms [29, 32–34].

Minocycline, a bacteriostatic tetracycline that inhibits protein synthesis by binding to the 30S ribosomal subunit, showed resistance in 71.4% of isolates in recent studies [35]. Meropenem had the lowest resistance rate at 2.85%, and gentamicin and imipenem were highly effective against *P. mirabilis*, with a 97.2% success rate [36]. However, *Proteus* spp.'s swarming motility, a virulence factor, poses challenges for microbiological studies and diagnosis due to its association with high virulence enzymes. *Lactobacillus acidophilus* has demonstrated the ability to displace harmful bacteria on mucosal surfaces and combat various infections [37]. This study found that *L. acidophilus* can inhibit *P. mirabilis*, with implications for antibiotic resistance profiles. These results underscore the urgent need for novel therapeutic approaches and precise diagnostic methods in the face of increasing antibiotic resistance. Probiotics, particularly *Lactobacillus* species, may influence the virulence of *P. mirabilis*, potentially leading to new methods for controlling harmful behaviors [38, 39].

Swarming motility, a coordinated and rapid surface movement exhibited by certain bacterial species, is closely associated with virulence, colonization, and biofilm formation [40]. In the case of *P. mirabilis*, swarming plays a crucial role in urinary tract infections, especially in catheterized patients, where it facilitates bacterial colonization [41]. The two samples with the highest swarming activity on blood agar support phenotypic observations that suggest a link between swarming and the expression of the *rsbA* and *Zap* genes [42]. The *rsbA* gene has been associated with bacterial stress responses, which are believed to play a role in host colonization [43]. Its high expression in the most active swarming samples suggests it may be involved in limiting swarming under harsh or resource-limited conditions, such as the urinary tract [44]. While the exact role of the *Zap* gene in swarming remains unclear, its increased expression in the most active samples suggests it plays a significant role in this behavior [45].

This study demonstrates that swarming in *P. mirabilis* is influenced by multiple genes, rather than a single one. Genes like *Zap* and *FliL* are involved in flagellar assembly and extracellular matrix production, which are essential for swarming. However, the moderate associations of genes like *rsbA* and *UmoD* suggest that regulatory or context-dependent factors may mediate their roles. This highlights the complex genetic regulation of bacterial swarming behavior, indicating that other factors or pathways are likely involved. Swarming regulation is known to be influenced by various stimuli and interconnected regulatory networks [46]. The moderate association of *UmoD* may reflect the complexity of its role, which could be context-specific or require interaction with other regulatory elements. Overall, multiple genes contribute to swarming behavior, which is governed by a complex genetic network [47]. Genes involved in flagellar function, such as *Zap*, show a strong correlation with swarming, corroborating previous studies indicating that these genes are highly

activated during swarming [48]. *FliL* genes, linked to extracellular components, support swarming motility, aligning with research that suggests swarming is aided by structures like lipopolysaccharides and other membrane components [49]. The moderate correlations observed for *rsbA* and *UmoD* suggest a more intricate regulatory network. Studies have shown that regulatory proteins like *RsbA* control the timing of swarming, supporting findings that gene overexpression or mutations can result in premature swarming [49, 50].

Some studies suggest that *P. mirabilis* coordinates virulence factor expression with swarming differentiation, including the regulation of toxins, adhesins, and other virulence genes [51]. The complex genetic regulation observed in this study is consistent with transcriptomic research showing widespread changes in gene expression during swarming, including both upregulation and downregulation of various gene sets [48].

When evaluating the effect of *Lactobacillus* spp. supernatant on swarming-related genes, the PCR approach is generally recommended. This molecular technique is widely applied across various fields of microbiology. It has been used to diagnose pathogenic bacteria, including *Proteus mirabilis* [35, 52], *Staphylococcus aureus* [53], and *Pseudomonas aeruginosa* [54], as well as to assess the severity of Coronavirus Disease 19 [55]. Additionally, PCR has been employed to explore the roles of bacterial neuraminidase and hyaluronidase in cancer cell interactions in vivo [56, 57], investigate mutations in gastric cancer [58], and measure gene expression levels of biomarkers in a range of diseases [59, 60]. Furthermore, the PCR technique has been used to examine small nuclear RNA host gene 3 as a potential therapeutic target in breast cancer through metabolic reprogramming [61], evaluate the significance of mitochondrial DNA quantification for blastocyst transfer potential [62], and used miRNA-126 as a Biomarker for Cancer Stem Cells [63].

Several limitations were encountered in this study. First, the sample size was relatively small, which may affect the generalizability of the results. A larger, more diverse sample size would provide a more comprehensive understanding of *P. mirabilis* swarming and gene expression. Second, this study focused on isolates from a specific geographical region (Baghdad), limiting its applicability to other regions. Future research should include isolates from different regions to provide a more global perspective. Third, while gene expression was analyzed using real-time PCR, additional molecular techniques, such as transcriptomics or proteomics, could offer more detailed insights into the regulatory pathways involved in swarming. Finally, the study did not explore the long-term effects of *Lactobacillus* supernatant on swarming behavior, and further research is needed to determine the sustainability of its inhibitory effects over time.

**Conclusions.** The study reveals that swarming motility in *Proteus mirabilis* is regulated by multiple genes, including *rsbA*, *UmoD*, *ZapA*, and *FliL*. Additionally, *Lactobacillus acidophilus* supernatants can influence gene expression and modulate bacterial motility, suggesting potential therapeutic applications for managing UTIs.

**Conflicts of interest statement.** The authors have no conflict of interest to declare.

**Funding sources.** The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

**Data availability statement.** The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**The authors' contributions.** Both authors contributed equally to the development of the research plan, the statistical analysis of the results, and the writing of the manuscript.

## References:

1. Morgenstein RM, Rather PN. Role of the Umo proteins and the Rcs phosphorelay in the swarming motility of the wild type and an O-antigen (*waaL*) mutant of *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol.* 2012;194(3):669–76. doi: 10.1128/jb.06047-11.
2. Artero-López J, Gutiérrez-Soto B, Expósito Ruiz M, Sorlozano Puerto A, Navarro Mari JM, Gutiérrez Fernández J. Etiología de las infecciones urinarias en nuestra área sanitaria y perfil de sensibilidad de los uropatógenos más frecuentes. 2021; *Arch. Esp. Urol.* [Internet]. 2021; 74 (2): 197-207. Available from: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/90512>.
3. Ridha Abbas Al-Fahham H, Raoof Kareem K. Molecular study of urease *ureR* gene of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections, Najaf Iraq. *Arch Razi Inst.* 2022;77(3):1257–60. doi: 10.22092/ARI.2022.357465.2042.
4. Yuan F, Huang Z, Yang T, Wang G, Li P, Yang B, et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections. *Urol Int.* 2021;105(5–6):354–61. doi: 10.1159/000514097.
5. Salvetti E, O'Toole PW. The genomic basis of lactobacilli as health-promoting organisms. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3):10–1128. doi: 10.1128/microbiolspec.bad-0011-2016.
6. Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM, Ashour HM. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1972–83. doi: 10.1111/jcmm.13496.
7. Colautti A, Orecchia E, Comi G, Iacumin L. Lactobacilli, a Weapon to Counteract Pathogens through the Inhibition of Their Virulence Factors. *J Bacteriol.* 2022; 204(11):e0027222. doi: 10.1128/jb.00272-22.

8. *Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo HS, Villaruz AE, et al.* Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018;562(7728):532–7. doi: 10.1038/s41586-018-0616-y.
9. *Scavone P, Iribarnegaray V, González MJ, Navarro N, Caneles-Huerta N, Jara-Wilde J, et al.* Role of *Proteus mirabilis* flagella in biofilm formation. *Role of Rev Argent Microbiol*. 2023;55(3):226–34. doi: 10.1016/j.ram.2023.01.005.
10. *Emad M, Alhammer AH, Mohammed RK, Lafta FM.* SYNERGISTIC EFFECTS OF NEEM OIL AND GENTAMICIN ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VIA PHZM GENE DOWNREGULATION: A COMPREHENSIVE REVIEW. *J Microbiol Biotechnol food Sci*. 2024;e11095–e11095. doi: 10.55251/jmbfs.11095.
11. *Schaffer JN, Pearson MM.* *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr*. 2015;3(5). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.
12. *Armbruster CE, Mobley HLT.* Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(11):743–54. doi: 10.1038/nrmicro2890.
13. *Sun Y, Wen S, Zhao L, Xia Q, Pan Y, Liu H, et al.* Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in Northeast China. *BMC Vet Res*. 2020;16:1–10. doi: 10.1186/s12917-020-02372-w.
14. *Liu L, Dong Z, Ai S, Chen S, Dong M, Li Q, et al.* Virulence-related factors and antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolated from domestic and stray dogs. *Front Microbiol*. 2023;14:1141418. doi: 10.3389/fmicb.2023.1141418.
15. *Khodadadian R, Rahdar HA, Javadi A, Safari M, Khorshidi A.* Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microb Pathog*. 2018;115:25–30. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.036.
16. *Isaev Yu. M, Semashkin NM, Kalenkov SA.* Sau fheu. Specification of particle movement in a spiral-screw element. *Sustain Dev*. 2015;8(3):234–244.
17. *Murillo JI, Encarnación-Dimayuga R, Malmstrøm J, Christophersen C, Franzblau SG.* Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fito-terapia*. 2003;74(3):226–30. doi:10.1016/S0367-326X(03)00033-9.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Approved Standard M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute W. Clinical and Laboratory Standards Institute. [Internet]. 2018;8(4). Available from: <https://www.scrip.org/reference/referencespapers?referenceid=2267872>.
19. *Aygül A, Öztürk İ, Çilli FF, Ermertcan Ş.* Quercetin inhibits swarming motility and activates biofilm production of *Proteus mirabilis* possibly by interacting with central regulators, metabolic status or active pump proteins. *Phytomedicine*. 2019;57:65–71. doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.014.
20. *Santos ACC, Malta SM, Dantas RCC, Coelho Rocha ND, Ariston de Carvalho Azevedo V, Ueira-Vieira C.* Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC Microbiol*. 2022;22(1):127. doi: 10.1186/s12866-022-02548-4.
21. *Rammelsberg M, Radler F.* Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J Appl Bacteriol*. 1990;69(2):177–84. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01507.x.
22. *Al-Ezzy AIA, Al-Azawi SA, Algburi A.* Multidrug Resistant Behavior Of *Proteus mirabilis* Isolated From patients with Urinary Tract Infections. *Diyala J Vet Sci*. [Internet]. 2023;1(1):1–15. Available from: <https://djvs.uodiyala.edu.iq/index.php/djvs/article/view/92>.
23. *AL-Jubouri SS, Shami AM.* Molecular Detection of Cephalosporin Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Baghdad Hospitals. *Iraqi J Biotechnol*. [Internet]. 2022;21(2):145–52. Available from: <https://jige.uobaghdad.edu.iq/index.php/IJB/article/view/489>.
24. *Alsamarai AM, Khorshed SA, Ali H.* Urinary tract infection in female in Kirkuk city, Iraq: Association between risk factors and bacterial type. *Our Dermatology Online*. 2017;8(3):242. doi: 10.7241/ourd.20173.72.
25. *Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci AI, Mattina R, Romano P, et al.* Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *Sci World J*. 2012;2012(1):349597. doi: 10.1100/2012/349597.
26. *Ansari A, Son D, Hur YM, Park S, You YA, Kim SM, et al.* *Lactobacillus* probiotics improve vaginal dysbiosis in asymptomatic women. *Nutrients*. 2023;15(8):1862. doi: 10.3390/nu15081862.
27. *Tabatabaei A, Ahmadi K, Shabestari AN, Khosravi N, Badamchi A.* Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in *Proteus mirabilis* strains isolated from patients attended with urinary infections to Tertiary Hospitals, in Iran. *Afr Health Sci*. 2021;21(4):1677–84. doi: 10.4314/ahs.v21i4.22.
28. *Khudhur Mohammad T, Zuhir LW, Jasim LIA.* Detection of some Bacterial Uropathogens in Male Students at the Institute of Medical Technology/ Al-Mansour. *J Al-Ma'moon Coll*. 2017;(29).
29. *Al-Nabhani NA, Shami AM.* Molecular Study of Carbapenem Resistance Genes in *Proteus mirabilis* Isolated from Clinical Samples in

- Baghdad Hospitals. Iraqi J Biotechnol. [Internet]. 2023;22(1):154-162. Available from: <https://jige.uobaghdad.edu.iq/index.php/IJB/article/view/583/449>.
30. *Najim HT, Farhan AA, Athab AM*. Bacteriological Study of the Bacteria Cause Urinary Tract Infection of Patients Admitted to Cardiac Care Unite a Baqubah General Teaching Hospital. 2018; 14(1):73-83. doi: 10.26505/DJM.14013610829.
  31. *Maharaul HH, Mehta F, Shah K, Asokan AP*. A Clinico Microbiological Profile of Diabetic Foot Patients. Medico-legal Updat. 2021;21(2):632-638. doi: 10.37506/mlu.v21i2.2753.
  32. *Al-obaidi SA, Al-Hashimy AB*. Molecular screening for luxs and pm1 virulence genes of Proteus mirabilis isolated from Iraqi urinary tract infection patients. Iraqi J Biotechnol. [Internet]. 2022;21(2):499–504. Available from: <https://jige.uobaghdad.edu.iq/index.php/IJB/article/view/524>.
  33. *Stepanova N*. How Advanced Is Our Understanding of the Role of Intestinal Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Recurrent Urinary Tract Infections. Front Pharmacol. 2022;13:780122. doi: 10.3389/fphar.2022.780122.
  34. *Martins AM, Marto JM, Johnson JL, Graber EM*. A review of systemic minocycline side effects and topical minocycline as a safer alternative for treating acne and rosacea. Antibiotics. 2021;10(7):757. doi: 10.3390/antibiotics10070757.
  35. *Mohsin MR, Al-Rubaii BAL*. Bacterial growth and antibiotic sensitivity of Proteus mirabilis treated with anti-inflammatory and painkiller drugs. Biomedicine. 2023;43(2):728–34. doi: 10.51248/v43i02.2693.
  36. *Al-Jumaily E, Zgaer SH*. Multidrug resistant Proteus mirabilis isolated from urinary tract infection from different hospitals in Baghdad City. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016;5(9):390–399. doi: 10.20546/ijemas.2016.509.041.
  37. *Shaaban M, Abd El-Rahman OA, Al-Qaidi B, Ashour HM*. Antimicrobial and antibiofilm activities of probiotic Lactobacilli on antibiotic-resistant Proteus mirabilis. Microorganisms. 2020;8(6):960. doi: 10.3390/microorganisms8060960.
  38. *Goudarzi L, Kermanshahi RK, Mousavinezhad Z, Dallal MMS*. Antimicrobial and Anti-Swarming Effects of Bacteriocins and Biosurfactants from Probiotic Bacterial Strains against Proteus spp. J Med Bacteriol. [Internet]. 2016;5(5–6):1–12. Available from: <https://jmb.tums.ac.ir/index.php/jmb/article/view/268>.
  39. *Basuino L, Jousselin A, Alexander JAN, Strynadka NCJ, Pinho MG, Chambers HF, et al*. PBP4 activity and its overexpression are necessary for PBP4-mediated high-level  $\beta$ -lactam resistance. J Antimicrob Chemother. 2018;73(5):1177–80. doi: 10.1093/jac/dkx531.
  40. *de Sousa K, van Etten J, Neby M, Solberg SØ*. Climate variability indices for ecological and crop models in R: the climatrends package. J Open Source Softw. 2023; 8(85), 4405. doi: 10.21105/joss.04405.
  41. *Manos J, Belas R*. The genera proteus, providencia, and morganella. Prokaryotes. 2006;6:245–69. doi: 10.1007/0-387-30746-x\_12.
  42. *Diao Q, Hou C*. Does nonreproductive swarming adapt to pathogens? PLoS Pathog. 2018;14(1):e1006742. doi: 10.1371/journal.ppat.1006742.
  43. *Bessaiah H, Anamalé C, Sung J, Dozois CM*. What flips the switch? Signals and stress regulating extraintestinal pathogenic Escherichia coli type 1 fimbriae (pili). Microorganisms. 2021;10(1):5. doi: 10.3390/microorganisms10010005.
  44. *Nepper JF, Lin YC, Weibel DB*. Rcs phosphorelay activation in cardiolipin-deficient Escherichia coli reduces biofilm formation. J Bacteriol. 2019; 201(9):e00804-18. doi: 10.1128/jb.00804-18.
  45. *Yang X, Sun S, Chen Q, Zhang Z, Wang J, Liu Y, et al*. A polysaccharide of ganoderma lucidum enhances antifungal activity of chemical fungicides against soil-borne diseases of wheat and maize by induced resistance. Agriculture. 2022;12(1):55. doi: 10.3390/agriculture12010055.
  46. *Schaffer JN, Pearson MM*. Proteus mirabilis and urinary tract infections. In: Urinary Tract Infections: Mol Pathog Clin Manag. 2017;383–433. doi: 10.1128/9781555817404.ch17.
  47. *Cusick K, Lee YY, Youchak B, Belas R*. Perturbation of *FliL* interferes with Proteus mirabilis swarmer cell gene expression and differentiation. J Bacteriol. 2012;194(2):437–47. doi: 10.1128/jb.05998-11.
  48. *Pearson MM, Rasko DA, Smith SN, Mobley HLT*. Transcriptome of swarming Proteus mirabilis. Infect Immun. 2010;78(6):2834–45. doi: 10.1128/iai.01222-09.
  49. *Little K, Tipping MJ, Gibbs KA*. Swarmer cell development of the bacterium Proteus mirabilis requires the conserved enterobacterial common antigen biosynthesis gene rffG. J Bacteriol. 2018;200(18):10–1128. doi: 10.1128/jb.00230-18.
  50. *Morgenstein RM, Szostek B, Rather PN*. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in Proteus mirabilis. FEMS Microbiol Rev. 2010;34(5):753–63. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00229.x
  51. *Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM*. Pathogenesis of Proteus mirabilis infection. EcoSal Plus. 2018;8(1):10–1128. doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0009-2017.
  52. *Ibrahim GJ, Laftaah BA*. The Efficiency of Certain Amino Acids in regulating chABC1 Gene Expression in Proteus mirabilis. Iraqi Journal of Science. 2024; 56(9). doi: 10.24996/ij.s.2024.65.9.15.

53. *Sabah Fakhry S, Noori Hamed Z, Abdul-elah Bakir W, Abdullah Laftaah ALRubaii B.* Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from humans and food sources by Use of *mecA 1* and *mecA 2* genes in Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (technique. *Revis Bionatura* 2022; 7 (2) 44. doi: 10.21931/RB/2022.07.02.44.
54. *Saleh TH, Hashim ST, Abdulrazaq Al-Obaidi RA, AL-Rubaii BA.* A biological study of chitinase produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of *chia* responsible gene. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. [Internet]. 2020; 11 (2):1318-1330. Available from: <https://ijrps.com/home/article/view/805>.
55. *Al-Humairi RM, Muhsin HY, Ad'hiah AH.* Severity of Coronavirus Disease 19: A Profile of Inflammatory Markers in Iraqi Patients. *Malaysian Journal of Medicine Health Sciences*. [Internet].2022; 18(1). 91-98. Available from: <https://search.bvsalud.org/gim/resource/fr/wpr-979952>.
56. *Ali SM, Laftah BA, Al-Shammari AM, Salih HS.* Study the role of bacterial neuraminidase against adenocarcinoma cells in vivo. *AIP Conf Proc*. 2021; 2372(1): 030009. doi: 10.1063/5.0067193.
57. *Salih HS, Al-Shammari AM, Laftaah BA.* Intratumoral co-administration of oncolytic Newcastle disease virus and bacterial hyaluronidase enhances virus potency in tumor models. *Journal of Global Pharma Technology*. [Internet].2018; 10(10):303-310. Available from: <http://www.jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/1510/2077>.
58. *Bresam S, Alhumairi RM, Hade IM, Al-Rubaii BA.* Genetic mutation rs972283 of the *KLF14* gene and the incidence of gastric cancer. *Biomedicine*. 2023; 43(4):1256-60. doi: 10.51248/v43i4.3112.
59. *Al-Jumaily RM, AL-Sheakli II, Muhammed HJ, Al-Rubaii BA.* Gene expression of Interleukin-10 and Foxp3 as critical biomarkers in rheumatoid arthritis patients. *Biomedicine*. 2023;43(4):1183-7. doi: 10.51248/v43i4.3107.
60. *Muhsin HY, Al-Humairi RM, Alshareef DQ, Ad'hiah AH.* Interleukin-22 is up-regulated in serum of male patients with ankylosing spondylitis. *The Egyptian Rheumatologist*. 2022;44(4):351-355. doi: 10.1016/j.ejr.2022.07.002.
61. *Sultan RS, Al Khayali BD, Abdulmajeed GM, Al-Rubaii BA.* Exploring small nucleolar RNA host gene 3 as a therapeutic target in breast cancer through metabolic reprogramming. *Oera Medica et Physiologica*. 2023;10(4):36-47. doi: 10.24412/2500-2295-2023-4-36-47.
62. *Hassoon AH.* Evaluating the role of mitochondrial DNA quantification in blastocyst transfers potential. *AIP Conference Proceedings* 2022; 2386(1): doi: 10.1063/5.0067093.
63. *Al-Maliki NS, Zedan ZK.* miRNA-126 as a Biomarker for Cancer Stem Cells: Role in Chemotherapy Resistance in Iraqi Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Al-Rafidain Journal of Medical Sciences*. 2024;6(1):195-199. doi: 10.54133/ajms.v6i1.577.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

**ISSN 2304-0238;****eISSN 2616-7352****Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>****Research paper****V. Globa<sup>1</sup>, G. Bozhok<sup>1</sup>, E. Legach<sup>1</sup>, Y. Samburg<sup>2</sup>,  
O. Godlevska<sup>2</sup>, O. Vlasenko<sup>2</sup>**

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.06

**Immunohistochemical evaluation of the effect of neurotrophic factors on the bladder of rats with infravesical obstruction after administration of biologically active compositions**<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine<sup>2</sup>Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

## Citation:

Globa V, Bozhok G, Legach E, Samburg Y, Godlevska O, Vlasenko M. Immunohistochemical evaluation of the effect of neurotrophic factors on the bladder of rats with infravesical obstruction after administration of biologically active compositions. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84):49-56. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.06.

**Abstract.** *The present study aimed to investigate the immunohistochemical characteristics of the bladder (UB) of rats with infravesical obstruction (IVO) after intraperitoneal administration of biologically active compositions (BACs) (conditioned media (CM) of native and cryopreserved cultures of mantle gliocytes (MG) obtained from the spinal ganglia (SG)). Methods. IVO was reproduced by surgical ligation. BACs were intraperitoneally injected for 10 days. The relative area of expression of S100 protein and actin, as markers of bladder nerve and smooth muscle cells, was calculated. The experimental animals were divided into groups as follows: 1 - intact control (n=15); 2 - CM from the culture of native MG (n=7); 3 - CM from the culture of cryopreserved MG (n=6); 4 - animals with IVO without treatment (n=15).*

*Results. BACs obtained from the culture of native and cryopreserved MG were involved in the remodeling of the bladder structure, which changed during IVO. Visual assessment of the UB tissue specimens subjected to immunohistochemical labelling with antibodies to S100 protein and actin revealed an increase in the relative area of positive labelling in animals of groups 2 and 3 compared to group 4 (untreated). Statistical analysis demonstrated an increase in the relative area of expression of the studied markers of nervous and muscle structures by both indicators in animals of group 2 by 91.6% and 78.9% ( $p = 0.004$ ;  $p = 0.002$ , respectively) compared to group 4 (without treatment). A somewhat different trend was observed when comparing the results of group 3. A statistically insignificant increase in the relative area of S100 protein expression in the UB tissues ( $p > 0.05$ ) and a significantly higher expression of actin by 78.8% ( $p = 0.001$ ) were found compared to the untreated group.*

*Conclusions. The positive effect of neurotrophic factors contained in the secretions of native/cryopreserved SG cell cultures on the expression of immunohistochemical markers of nerve and smooth muscle cells of the bladder in the course of IVO in rats has been found. It has been determined that cryopreservation affects the nature of the biological activity of the secretions of SG cell culture. At the same time, the administration of CM of cryopreserved culture has been proven to be effective in correcting the effects of IVO and similar to the effect of CM of native culture.*

**Key words:** immunohistochemical markers, S100, actin, protein expression, infravesical obstruction, spinal ganglion, mantle gliocytes, conditioned medium.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© V. Globa, G. Bozhok, E. Legach, Y. Samburg, O. Godlevska, M. Vlasenko, 2024.

Correspondence should be addressed to Vyacheslav Globa: [globa.1978@gmail.com](mailto:globa.1978@gmail.com)

**Article history:**

Received September 11, 2024

Received in revised form  
October 01, 2024

Accepted October 04, 2024



© Глоба В. Ю., Божок Г. А., Легач Є. І., Самбург Я. Ю., Годлевська О. М., Власенко О. М., 2024.

УДК: 616.62-001.3-092.9:615.361

В.Ю. Глоба<sup>1</sup>, Г.А. Божок<sup>1</sup>, Є.І. Легач<sup>1</sup>, Я.Ю. Самбург<sup>2</sup>, О.М. Годлевська<sup>2</sup>, О.М. Власенко<sup>2</sup>

## Імуногістохімічна оцінка впливу нейротрофічних факторів на сечовий міхур щурів з інфравезикальною обструкцією після введення біологічно активних композицій

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

**Резюме.** Мета роботи – вивчення імуногістохімічних характеристик сечового міхура (СМ) самок щурів із інфравезикальною обструкцією (ІВО) після внутрішньочеревного введення біологічно активних композицій (БАК) (кондиційованих середовищ (КС) нативної і криоконсервованої культур мантійних гліоцитів (МГ), отриманих зі спінальних гангліїв (СГ)).

**Методи.** ІВО моделювали лігатурним методом. БАК вводили тваринам внутрішньочеревно протягом 10 діб. Розраховували відносну площу відносної площі експресії білку S100 та актину, як маркерів нервових і гладеньком'язових клітин сечового міхура. Тварин поділили на групи: 1 – інтактний контроль (n=15); 2 – КС від культури нативних МГ (n=7); 3 – КС від культури криоконсервованих МГ (n=6); 4 – тварини з ІВО без лікування (n=15).

**Результати.** БАК, отримані від культури нативних і криоконсервованих МГ, брали участь у ремоделюванні структури сечового міхура, яка змінювалась під час ІВО. За візуальною оцінкою препаратів тканини СМ, які було піддано імуногістохімічному мічення антитілами до білку S100 та актину, встановлено збільшення відносної площі позитивного мічення у тварин груп 2 і 3 порівняно з групою 4 (без лікування). Шляхом статистичного аналізу було встановлено збільшення відносної площі експресії досліджуваних маркерів нервових і м'язових структур за обома показниками у тварин групи 2 на 91,6% та на 78,9% (p = 0,004; p = 0,002 відповідно), порівняно з групою 4 (без лікування). Деяко інша тенденція була при порівнянні результатів групи 3. Встановлено статистично не значуще збільшення відносної площі експресії у тканинах СМ білку S100 (p>0,05) та значно більші показники експресії актину на 78,8% (p = 0,001), порівняно з групою без лікування.

**Висновки.** Встановлено позитивний вплив нейротрофічних факторів, які містяться у секретомативній/криоконсервованій культур клітин СГ на експресію імуногістохімічних маркерів нервових і гладеньком'язових клітин сечового міхура при ІВО у щурів. Визначено, що криоконсервування впливає на характер біологічної активності секретомативної культури клітин СГ. При цьому введення КС криоконсервованої культури було ефективним для корегування наслідків ІВО і схожим на вплив КС нативної культури.

**Ключові слова:** імуногістохімічні маркери, S100, актин, експресія білків, інфравезикальна обструкція, спінальний ганглій, мантійні гліоцити, кондиційоване середовище.

**Introduction.** Urodynamic disorders due to infravesical obstruction (IVO) are an urgent problem in modern urology. More than 50% of elderly men are predisposed to IVO due to benign prostatic hyperplasia (BPH) [1]. IVO occurs in 8-10% of women as a complication of surgical treatment of urinary incontinence [2].

In conditions of prolonged chronic bladder (UB) obstruction and increased urethral resistance, blood circulation is impaired, and cell ischaemia, detrusor hypertrophy, and inflammatory processes may occur. One of the consequences of the structural and functional restructuring of cell layers is the loss of the receptor apparatus and denervation of the bladder wall, which can be more than 50% in this pathological condition [3].

IVO causes multiple physiological and structural changes in smooth muscle (SM), transitional cell epithelium, nerves, and vasculature. Ultimately, this can lead to a loss of smooth muscle function and contractility, or cause progressive severe hypertrophy and increased contractility of the UB [4, 5].

It has also been morphologically proven that outflow obstruction causes neuronal degeneration (partial denervation) in the smooth muscle of the UB [6, 7, 8]. The loss of functional synapses can reduce the release of contractile neurotransmitters and thus reduce the magnitude of the bladder contractile response [9]. Studies using experimental animals have also shown that the presence of an obstruction to urine outflow affects the nervous control of the UB activity [3, 7, 10, 11]. IVO is usually accompanied by a decrease in the innervation density of the hypertrophied bladder [12]. IVO changes neural networks in the central nervous system, which can cause organ dysfunction [6, 10, 13, 14].

At present, reinnervation of the urethra is an urgent task in urology, reconstructive surgery, and tissue engi-

Vyacheslav Globa  
globa.1978@gmail.com

neering of the urinary tract. According to current data, cultures of cells of neural origin, in particular Schwann cells and nerve cells obtained from various sources, are used to solve such problems [15, 16].

It is known that glia derivatives are able to produce a number of neurotrophic factors (NFs) that promote neuronal regeneration and stimulate the directed growth of nerve cell axons [17, 18]. This is valuable for the reinnervation of the UB and restoration of the pool of nerve endings in the bladder wall.

Currently, research is being conducted on the cultivation and cryopreservation of spinal ganglion (SG) cell culture and the generation of cell-free media containing NFs [19, 20]. However, there has been no attempt so far to use SG cell culture, secretions, and other biological products to restore the UB receptor pool and improve its contractility in IVO.

**The research aims** to investigate the effect of biologically active compositions (conditioned media of native and cryopreserved cell cultures) obtained from spinal ganglia on the expression of S100 proteins and actin in the bladder of rats with infravesical obstruction.

**Materials and Methods.** Investigations were carried out on 6-month-old white outbred rats (250–320g, n=43). Manipulations in animals were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV dated 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv), in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

**Study design.** The culture of mantle gliocytes (MG) was obtained from the SG of neonatal piglets by an enzymatic method [19]. The initial seeding concentration of cells in both cases was  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. On the 21st day of cultivation, the medium was collected from all Petri dishes, and combined; an aliquot was taken and used in further experiments. Part of the SG cell cultures after cultivation for 6 days was detached from the substrate with 0.25% trypsin-EDTA solution with Hanks salts (Biowest, France) and cryopreserved as a suspension in cryoprotective medium with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) with a cooling rate of 1 °C/min to -40 °C and further immersion in liquid nitrogen. The cells were kept at -196 °C for 1 month, after which they were thawed, washed from DMSO, and cultured for 20 days. On day 21, the culture medium was collected from all samples, combined; an aliquot was taken and used in further experiments. IVO was modeled by the ligature method

[21]. After 1.5 months, the ligature was removed and the next day the animals were started to become injected with the BACs intraperitoneally for 10 days. Conditioned medium obtained from native and cryopreserved MG cultures were injected with 0.6 mL/kg of body weight. The animals were taken out of the experiment by decapitation under anesthesia on the 56th day from the start of IVO modeling. The animals were divided into groups: 1-control (C); 2-the introduction of conditioned medium from the culture of native MG (CMCNMG); 3-introduction of conditioned medium from the culture of cryopreserved MG (CMCCMG); 4-without treatment (UT).

**Detection of S100 and Actin expressions in the urinary bladder.** A Ready-to-Use test kit with monoclonal antibodies (MAbs) against Smooth Muscle Actin 1A4 (DAKO, Denmark) was used as a marker of bladder muscle structures. As a marker of peripheral glia cells, MAbs against S-100A protein (Thermo Scientific, Germany) at 1:100 dilution was used. To visualise the immunohistochemical staining with the first antibodies, the UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo Scientific) was used. DAB (diaminobenzidine) was used as a chromogen.

Stained sections were examined using a Primo Star microscope (Carl Zeiss) with AxioCam software (ERc 5s).

The qualitative assessment of immunohistochemical staining was determined by the presence or absence of brown staining of cellular structures [22].

For quantitative evaluation, the relative area of positive labelling was calculated using AxioVision Rel 4.7 image processing software as the ratio of the total area of stained structures (in  $\mu\text{m}^2$ ) to the standard section area (in  $\mu\text{m}^2$ ) multiplied by 100% according to the method [23].

When calculating quantitative characteristics of structural components in the urinary bladder, in each case, a micro-photograph was measured 30 times [23].

**Statistical analysis.** The results were statistically processed using Excel (Microsoft, USA) and Statistica 10 (StatSoft, USA). Quantitative data were presented as median (Me) and quartiles (Q1; Q3) and were assessed using nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests with the Dunnett's test for post-hoc comparisons. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Results. Immunohistochemical studies.** Visual assessment of the SM tissue specimens subjected to immunohistochemical labelling with antibodies to protein S100 and actin revealed an increase in the relative area of positive labelling in animals of group 2 compared to group 4 (untreated) (Fig. 1).

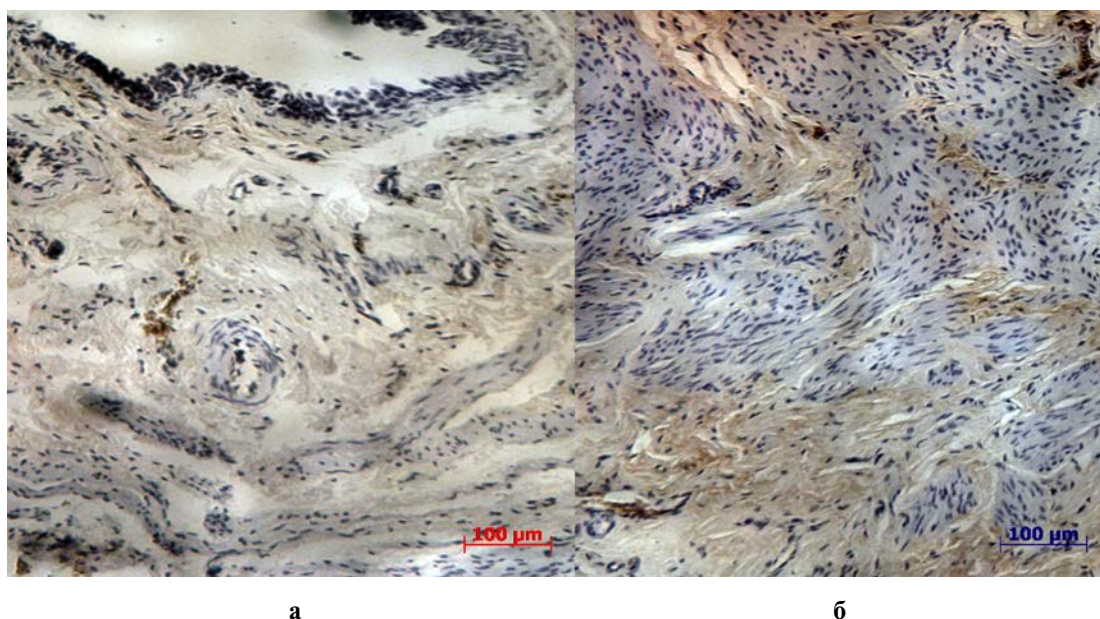


Fig. 1. UB tissue of rats of group 2 (injection of CM from native cell culture). Immunohistochemical study of S 100 (a) and actin (b) expression.

Also, visual assessment revealed an increase in the relative area of positive labelling of nervous and muscle

structures with antibodies to proteins S100 and actin in group 3 compared to group 4 (untreated) (Fig. 2).

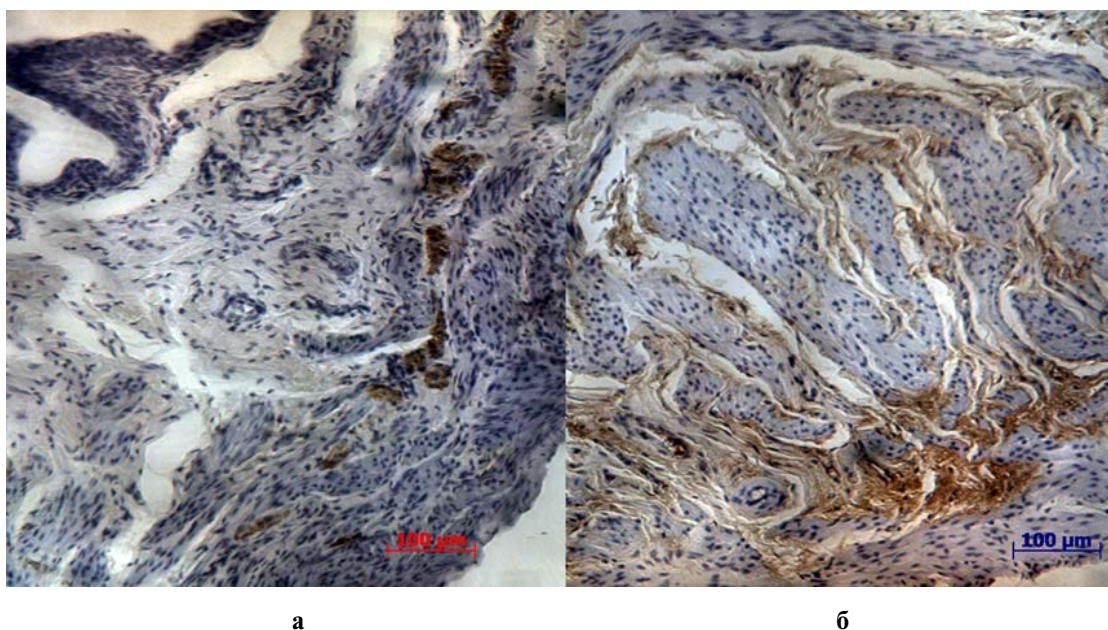


Fig. 2. UB tissue of group 3 rats (injection of CM from cryopreserved cell culture). Immunohistochemical study of S 100 (a) and actin (b) expression.

*Morphometric characteristic of the urinary bladder.*

Statistical analysis revealed an increase in the relative area of expression of the studied markers of nervous and muscle structures by both indicators in animals of group 2 by 91.6% and 78.9% (Fig. 3,  $p = 0.004$ ;  $p = 0.002$ , respectively) compared to group 4 (without treatment).

A somewhat different trend was observed when comparing the results of group 3. A statistically insignificant increase in the relative area of expression of S100 protein in the UB tissues (Fig. 3,  $p > 0.05$ ) and significantly higher actin expression by 78.8% (Fig. 3,  $p = 0.001$ ) were found compared to the untreated group.

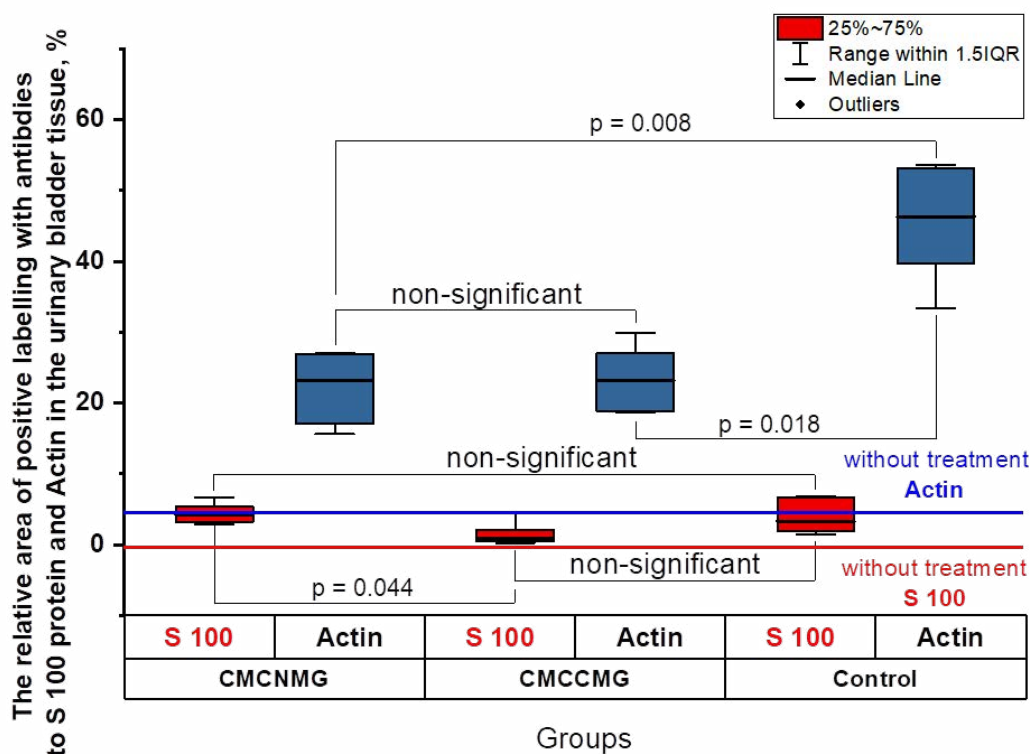


Fig. 3. Changes in the relative area (%) of positive labelling with antibodies to S100 protein and actin in the UB tissue of animals of groups 2, 3 and 4. Blue columns - positive labelling to actin, red columns - positive labelling to S100 protein.

**Discussion.** The analysis of the works of previous authors, which studied the effect of BACs obtained from SG on the morphological and functional parameters of the UB of experimental animals and humans with IVO, showed the existence of a small number of studies on this subject [24, 25]. Most of the scientific works used stem cells for tissue engineering [26, 27], studied the effect of increased contractility of the UB and endogenous NFs, as well as growth factors on the morphology and function of the urinary tract [28, 29], the effect of high hydrostatic pressure on various cell cultures [30], and the role of NFs at neurodegenerative diseases [31].

We have suggested that it is possible to improve the contractile function of the UB by restoring the innervation of the wall using secretions from cultures of neural cells. However, up to now, no attempts have been made to use glial cell culture, secretions, and other biological products to restore the UB receptor pool and improve its contractility in the case of IVO.

Infravesical obstruction causes denervation, which leads to an increase in the mass of the UB, and characteristic changes in contractile activity and morphology. There is an increase in the number and volume of bladder smooth muscle along with a decrease in the density of nerve endings and contractile proteins in the organ tissue [32]. These changes demonstrate the occurrence of the process of remodelling of the UB with the participation of several cellular compartments, namely transitional cell epithelium, mucosal lamina propria, detrusor smooth muscle, connective tissue, and neurons [8].

S100 protein actively affects the functions of the nervous system, tissue repair and regeneration, inflammation, infections, and cell growth and differentiation [33]. S100-positive neural structures and nerves are present in the UB tissues [34].

UB smooth muscle cells contain contractile proteins (myosin and actin) and proteins that regulate their interaction in response to neuroendocrine stimulation. These cells also synthesise most of the extracellular matrix surrounding them in the UB tissue. In addition, smooth muscle cells are involved in remodelling of the UB in many conditions that affect organ function [35].

Hypertrophy of UB smooth muscle, which occurs as a result of IVO, may be associated with fluctuations in the number of different actin isoforms, both in the direction of increase/decrease and in the absence of any changes at all. The contraction of the smooth muscle of the UB is initiated by an increase in the concentration of free  $Ca^{2+}$  in the cytoplasm of smooth muscle cells [36].

Actin is a component of the contractile apparatus and cytoskeleton of smooth muscle cells. Functionally, it is involved in muscle contraction and other types of cell motility. Actin in the smooth muscle of the UB accumulates in conditions when there is a stressful increase in mechanical work, as a result of which the muscle mass of the organ increases. Thus, hypertrophy of the smooth muscle of the UB may be associated with changes in the composition of contractile proteins [37].

Actin is used as a marker for myoblasts and smooth muscle cells. Hypertrophic UB muscles with IVO ex-

press increased levels of actin compared to normal tissues. A sufficient level of actin appears to be a prerequisite for the generation of normal SM contraction force [38, 39].

Neurotrophic factors or similar biologically active substances prevent nerve cell death at an early stage of IVO and increase nerve density in the UB tissue, as well as limit the severity of detrusor hypertrophy. This slows down the development of functional decompensation of the organ in the case of long-term obstruction [40].

Low values of the median relative area of S100 protein and actin expression were found in group 4 (without treatment) - 0.4 (0.07; 1.04) and 4.9 (2.3; 9.3) compared to intact animals - 3.3 (1.7; 6.7) and 46.3 (39.7; 53.1), respectively (Fig. 3,  $p < 0.05$ ). In contrast, an increase in the median relative area of S 100 protein expression was detected in groups 2 and 3 compared to the control. The aforementioned index in group 2 (CM of the native culture of SG cells) - 4.2 (3.2; 5.5) was significantly higher than in rats with IVO without treatment (Fig. 3,  $p < 0.05$ ). Higher values of the median relative area of actin protein expression were found in groups 2 (CM of native SG cell culture) - 23.2 (17.1; 26.9) and 3 (CM of cryopreserved SG cell culture) - 23.1 (18.9; 27.1) compared to rats with IVO without treatment (Fig. 3,  $p < 0.05$ ). However, this indicator in the above groups was lower than in intact animals. Thus, it was found that BACs obtained from SG affect the expression of S100 proteins and actin in the tissue of the UB of rats with IVO, which results in changes in the morphological and functional parameters of the bladder.

NFs-like activity was previously established in CM obtained from cultures of native and cryopreserved cells from the SG of newborn piglets [41].

NFs functions include regulation of axonal and dendritic growth, formation and functioning of synapses, cell migration, cell proliferation, and survival of adult neurons. It has been established that NFs affect the restoration of organ innervation of taking into account these facts [42].

Cryopreservation is an integral part of the technology for the production of CM, as cells are stored in a cryobank before cultivation. In this regard, a natural question arises about the effect of freezing on cells. In previous studies, it has been established that cryo-

preservation of MG in a cryoprotective medium with 7.5-10% DMSO allows maintaining cell viability at the level of 83-87% [19]. At the same time, the expression of neurotrophic factors remains at a level close to control values [41].

In our research, we did not investigate which types of NFs affect the reinnervation and remodeling of the UB. The data obtained indicate the prospect of discovering new drugs based on NFs contained in the secretions of native/cryopreserved SG cell cultures.

**Conclusions.** Thus, the use of biologically active compositions obtained from spinal ganglia contributed to an increase in the relative area of S100 protein and actin expression in the bladder tissue of animals with infravesical obstruction, which indicated their stimulating effect on the processes of reinnervation and remodeling of the organ.

However, the precise mechanisms by which NFs-containing BACs affect the expression of the above proteins in the bladder tissue of mammals with infravesical obstruction are not yet clear and require further study.

**Conflict of interest statement.** The authors have no competing interests to declare.

**Funding sources.** The study was carried out within the framework of the scientific research work "Morphofunctional characteristics, cryopreservation and therapeutic potential of 2D and 3D cultures of cells derived from neural crest derivatives" (State Registration Number 0121U100). Deadline: 2021-2026.

#### Author Contributions

**Vyacheslav Globa:** experiment and methodology, analyzed and interpreted the data, and was a major contributor to writing the manuscript;

**Galyna Bozhok:** conceived the presented concept, designed the study, experiment, and methodology;

**Evgeniy Legach:** final manuscript editing and research management;

**Yana Samburg:** analyzed and interpreted the data, edited the final manuscript;

**Olga Godlevska:** histopathological evaluation and data interpretation;

**Olena Vlasenko:** data collection and analysis

All authors discussed the results and commented on the manuscript.

#### References:

1. Reddy SVK, Shaik AB. Non-invasive evaluation of bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia: a clinical correlation study. Arab Journal of Urology. 2019; 17 (4): 259–64. doi: 10.1080/2090598X.2019.1660071.
2. Malde S, Solomon E, Spilotros M, Mukhtar B, Pakzad M, Hamid R, et al. Female bladder outlet obstruction: Common symptoms masking an uncommon cause. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms. 2017; 11 (1): 72–7. doi: 10.1111/luts.12196.
3. Gosling JA, Gilpin SA, Dixon JS, Gilpin CJ. Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in outflow obstruction. Journal of Urology. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).1986;136(2):501–4. doi: 10.1016/s0022-5347(17)44930-5.
4. Juan YS, Chuang SM, Jang MY, Chun-Hsiung Huang, Chou Y, Wen-Jeng Wu, Longet C. Basic research in bladder outlet obstruction. Incon Pelvic Floor Dysfunct. [Internet].2011;5(1):1–6. Available from: [http://www.tcs.org.tw/issue/folder/5\\_1/1-6.pdf](http://www.tcs.org.tw/issue/folder/5_1/1-6.pdf).

5. *Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, Kato K, Wein AJ.* Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *The Prostate.* Wiley.1990;17 (S3):9–26. doi: 10.1002/pros.2990170503.
6. *Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, Dixon JS, Gilpin SA, Gosling JA.* Bladder outflow obstruction—a cause of denervation supersensitivity. *Journal of Urology.* Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).1987;138(6):1461–6. doi: 10.1016/s0022-5347(17)43675-5.
7. *Milicic I, Buckner SA, Daza A, Coghlan M, Fey TA, Brune ME, et al.* Pharmacological characterization of urinary bladder smooth muscle contractility following partial bladder outlet obstruction in pigs. *Eur J Pharmacol.*2006; 532(1-2):107–14. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.076.
8. *Fusco F, Creta M, De Nunzio C, Iacovelli V, Mangiapia F, Li Marzi V, et al.* Progressive bladder remodeling due to bladder outlet obstruction: a systematic review of morphological and molecular evidences in humans. *BMC Urol.* 2018; 18 (1):15. doi: 10.1186/s12894-018-0329-4.
9. *Lin ATL, Juan Y-S.* Ischemia, hypoxia and oxidative stress in bladder outlet obstruction and bladder overdistention injury. *Low Urin Tract Symptoms.*2012;4 (1):27-31. doi: 10.1111/j.1757-5672.2011.00134.x
10. *Steers WD, Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB.* Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1709-15. doi: 10.1172/JCI115488.
11. *Steers WD, Tuttle JB.* Mechanisms of disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nat Clin Pract Urol.* 2006;3(2):101-10. doi: 10.1038/ncpuro0408.
12. *Zeng J, Xie K, Jiang C, Mo J, Lindstrom S.* Bladder mechanoreceptor changes after artificial bladder outlet obstruction in the anesthetized rat. *Neurourol Urodyn.* 2011;31(1):178–84. doi: 10.1002/nau.21219.
13. *Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB, et al.* Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol.* 2014;55(2):81-90. doi: 10.4111/kju.2014.55.2.81.
14. *Ekman M, Zhu B, Swärd K, Uvelius B.* Neurite outgrowth in cultured mouse pelvic ganglia - Effects of neurotrophins and bladder tissue. *Auton Neurosci.* 2017;205:41-49. doi: 10.1016/j.autneu.2017.03.004.
15. *Adamowicz J, Juszczyk K, Bajek A, Tworkiewicz J, Nowacki M, Marszałek A, et al.* Morphological and urodynamic evaluation of urinary bladder wall regeneration: muscles guarantee contraction but not proper function—a rat model research study. *Transplant Proc.*2012;44(5):1429-34. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.144.
16. *Kim JH, Lee SR, Song YS, Lee HJ.* Stem cell therapy in bladder dysfunction: where are we? And where do we have to go? *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 930713. doi: 10.1155/2013/930713.
17. *Hansebout CR, Su C, Reddy K, Zhang D, Jiang C, Rathbone MP, et al.* Enteric glia mediate neuronal outgrowth through release of neurotrophic factors. *Neural Regen Res.*2012;7(28):2165–75. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.028.001.
18. *Collazos-Castro JE, Garcia-Rama C, Alves-Sampaio A.* Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized electroconducting microfibers. *Acta Biomater.* 2016; 35: 42–56. doi: 10.1016/j.actbio.2016.02.023.
19. *Ali S, Moiseieva N, Bozhok G.* Cryopreservation of cell culture derived from dorsal root ganglia of neonatal pigs. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2020; 30(2): 158-68. doi: 10.15407/cryo30.02.158.
20. *Ali SG, Kovalenko IF, Bozhok GA.* Some phenotypic characteristics of the dorsal root ganglia cell culture of neonatal piglets. *Bulletin of Problems Biology and Medicine.*2019; 3(152): 46-50. doi: 10.29254/2077-4214-2019-3-152-46-50.
21. *Zhang N, Ma L, Zhang J, Chen J.* Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *Int Braz J Urol.* 2014;40(3):414-21. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.03.17.
22. *Buchwalow IB, Böcker W.* Immunohistochemistry: Basics and Methods. Berlin Heidelberg.2010:151 p. doi: 10.1007/978-3-642-04609-4.
23. *Avtandilov GG.* Medical morphometry. Management. M.:Medicine;1990:384 p.
24. *Arms L, Vizzard MA.* Neuropeptides in lower urinary tract function. *Handb Exp Pharmacol.*2011;(202):395-423. doi: 10.1007/978-3-642-16499-6\_19.
25. *Mundy AR.* Neuropeptides in lower urinary tract function. *World Journal of Urology.*1984;2 (3):211–5. doi: 10.1007/bf00327003.
26. *Beckel JM, de Groat WC.* Neural control of lower urinary tract function. *Oxford Res Encycl Neurosci.*2019. doi: 10.1093/acrefore/9780190264086.013.270.
27. *Imamura T, Ishizuka O, Nishizaw O.* Bone marrow-derived cells regenerate structural and functional lower urinary tracts. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering.*2013. doi: 10.5772/55558.
28. *Sellers D, Chess-Williams R, Michel MC.* Modulation of lower urinary tract smooth muscle contraction and relaxation by the urothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.*2018;391(7):675–94. doi: 10.1007/s00210-018-1510-8.

29. Sidler M, Aitken K, Jiang J, Bijos D, Belik J, Bägli DJ. Finding NeMO-nerve-sparing mid-urethral obstruction: a pathophysiologically accurate model of rodent partial bladder outlet obstruction. *Urology*.2017;105:208.e1-208.e9. doi: 10.1016/j.urology.2017.03.032.
30. Liu S, Tao R, Wang M, Tian J, Genin GM, Lu TJ, et al. Regulation of cell behavior by hydrostatic pressure. *Applied Mechanics Reviews*. 2019;71 (4): 0408031–4080313. doi: 10.1115/1.4043947.
31. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012;846:1-12. doi: 10.1007/978-1-61779-536-7\_1.
32. Zhu B, Ekman M, Svensson D, Lindvall JM, Nilsson B-O, Uvelius B, et al. Array profiling reveals contribution of *Cthrc1* to growth of the denervated rat urinary bladder. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(5):F893-F905. doi: 10.1152/ajprenal.00499.2017.
33. Donato R, Geczy CL, Weber DJ. S100 Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins*. 2013;1863–74. doi: 10.1007/978-1-4614-1533-6\_48.
34. Daub B, Schroeter M, Pfitzer G, Ganitkevich V. Expression of members of the S100 Ca<sup>2+</sup>-binding protein family in guinea-pig smooth muscle. *Cell Calcium*. 2003;33(1):1-10. doi: 10.1016/s0143-4160(02)00167-7.
35. Zheng Y, Chang S, Boopathi E, Burkett S, John M, Malkowicz SB, et al. Generation of a human urinary bladder smooth muscle cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2012;48(2):84-96. doi: 10.1007/s11626-011-9473-9.
36. Hashimoto N, Kiyono T, Saitow F, Asada M, Yoshida M. Reversible differentiation of immortalized human bladder smooth muscle cells accompanied by actin bundle reorganization. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186584. doi: 10.1371/journal.pone.0186584.
37. Zhang EY, Stein R, Chang S, Zheng Y, Zderic SA, Wein AJ, et al. Smooth muscle hypertrophy following partial bladder outlet obstruction is associated with overexpression of non-muscle caldesmon. *Am J Pathol*.2004;164(2):601-12. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63149-5.
38. Zimmerman RA, Tomasek JJ, McRae J, Haakma CJ, Schwartz RJ, Lin HK, et al. Decreased expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin results in decreased contractile function of the mouse bladder. *J Urol*. 2004;172(4 Pt 2):1667-72. doi: 10.1097/01.ju.0000139874.48574.1b.
39. Duan LJ, Qi J, Huang T, Gu X, Xu D, Kong XJ, et al. Pirfenidone attenuates bladder fibrosis and mitigates deterioration of bladder function in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):3639-3647. doi: 10.3892/mmr.2015.3814.
40. Hughes FM, Sexton SJ, Ledig PD, Yun CE, Jin H, Purves JT. Bladder decompensation and reduction in nerve density in a rat model of chronic bladder outlet obstruction are attenuated with the NLRP3 inhibitor glyburide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;316(1):F113-F120. doi: 10.1152/ajprenal.00400.2018.
41. Nesteruk HV, Alabedalkarim NM, Kolot NV, Komaromi NA, Protsenko OS, Legach EI. Effect of conditioned media from glial cell cultures on the reproductive system of female rats of different ages. *Problems of Endocrine Pathology*. 2022;79(2):88–96. doi: 10.21856/j-PEP.2022.2.13.
42. Gill BC, Balog BM, Dissaranan C, Jiang H-H, Steward JB, Lin DL, et al. Neurotrophin therapy improves recovery of the neuromuscular continence mechanism following simulated birth injury in rats. *Neurourol Urodyn*. 2013;32(1):82-7. doi: 10.1002/nau.22264.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

## Founder:

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;  
eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

## Research paper

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.07

I. Mykhaloiko<sup>1</sup>, R. Yatsyshyn<sup>1</sup>, I. Dudar<sup>2</sup>, H. Kuryliv<sup>1</sup>

## Evaluation of the level of antithrombin in patients with glomerulonephritis and nephrotic syndrome: A cross-sectional study

<sup>1</sup>Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

<sup>2</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

## Citation:

Mykhaloiko I, Yatsyshyn R, Dudar I, Kuryliv H. Evaluation of the level of antithrombin in patients with glomerulonephritis and nephrotic syndrome: A cross-sectional study. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84):57-64. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.07.

**Abstract.** *The present study aimed to evaluate the level of antithrombin (AT)-III in blood serum in patients with primary glomerulonephritis (GN) and nephrotic syndrome (NS) and to assess its correlation with markers of NS and hypercoagulation.*

**Methods.** *We conducted a cross-sectional observational study involving 76 patients with primary GN and NS admitted to the Ivano-Frankivsk Regional Clinical Hospital (Ukraine) in 2022–2024. The inclusion criteria were: age over 18 years, <1 month since the diagnosis of NS, and glomerular filtration rate (GFR) > 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. During the study, all patients underwent a standard examination, which included general clinical, biochemical, and instrumental research methods. A photometric assay of AT-III in serum using a chromogenic substrate was conducted with a set of reagents from “Granum” (Ukraine).*

**Results.** *Normal levels of AT-III were identified in 24 patients (31.6%; 95% CI: 21.4–43.3), while decreased levels were found in 52 patients (68.4%; 95% CI: 56.7–78.6). Correlation analysis revealed a direct moderate correlation between serum albumin levels and AT-III levels ( $r = 0.535$ ,  $p < 0.05$ ), an inverse moderate correlation between daily protein excretion (DPE) and AT-III levels ( $r = -0.414$ ,  $p < 0.05$ ), and an inverse moderate correlation between the albumin/creatinine ratio (ACR) in urine and AT-III levels ( $r = -0.467$ ,  $p < 0.05$ ).*

**Conclusions.** *In this cohort of patients with primary GN and NS, 68.4% exhibited decreased AT-III levels, indicating that AT-III deficiency is a common finding. The observed reduction in AT-III levels was significantly correlated with lower serum albumin levels, higher DPE, and higher ACR in urine. No significant association was found between AT-III deficiency and specific histological variants of GN, suggesting that the relationship between AT-III levels and hypercoagulopathy in GN and NS may be independent of the underlying glomerular pathology. The detected AT-III deficiency may warrant consideration for anticoagulant prophylaxis in patients with GN and NS. However, further studies are needed to determine whether AT-III levels can reliably guide anticoagulation therapy and reduce thromboembolic risk in this population.*

**Keywords:** glomerulonephritis, nephrotic syndrome, hypercoagulopathy, antithrombin III.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© I. Mykhaloiko, R. Yatsyshyn, I. Dudar, H. Kuryliv, 2024.

Correspondence should be addressed to Iryna Mykhaloiko: [iralisn@gmail.com](mailto:iralisn@gmail.com)

## Article history:

Received August 31, 2024

Received in revised form  
September 21, 2024

Accepted October 02, 2024



© Михалойко І. С., Яцишин Р. І., Дудар І. О., Курилів Г. М., 2024.

УДК: 616.611-002+616.61-008.6]:616.151.5-07

І.С. Михалойко<sup>1</sup>, Р.І. Яцишин<sup>1</sup>, І.О. Дудар<sup>2</sup>, Г.М. Курилів<sup>1</sup>

## Оцінка рівня антитромбіну у хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом: одномоментне обсерваційне дослідження

<sup>1</sup>Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна

<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м.Київ, Україна

**Резюме.** Метою даного дослідження було оцінити рівень антитромбіну (АТ)-III у сироватці крові пацієнтів з первинним гломерулонефритом (ГН) та нефротичним синдромом (НС) та перевірити його кореляцію з маркерами НС та гіперкоагуляцією.

**Методи.** Ми провели одномоментне обсерваційне дослідження за участю 76 пацієнтів із первинним ГН та НС, які були госпіталізовані в Івано-Франківську обласну клінічну лікарню (Україна) у 2022-2024 роках. Критерії для включення пацієнтів у дослідження: вік старше 18 років, менше 1 місяця від діагностики НС, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) > 60 мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>. Під час дослідження всім пацієнтам проводили стандартне обстеження, яке включало загальноклінічні, біохімічні та інструментальні методи дослідження. Фотометричне визначення антитромбіну III у сироватці крові з хромогенним субстратом проводили за допомогою набору реактивів «Гранум» (Україна).

**Результати.** Нормальний рівень АТ-III діагностовано у 24 (31.6%; 95% СІ 21.4-43.3) пацієнтів, знижений – у 52 (68.4%; 95% СІ 56.7-78.6) пацієнтів. Після проведення кореляційного аналізу ми виявили прямий середньої сили кореляційний зв'язок між рівнем сироваткового альбуміну та рівнем АТ-III ( $r = 0,535, p < 0,05$ ), зворотній середньої сили кореляційний зв'язок між добовою втратою білка (ДВБ) та рівнем АТ-III ( $r = -0,414, p < 0,05$ ) та зворотній середньої сили кореляційний зв'язок між співвідношенням альбуміну до креатиніну (САК) у сечі та рівнем АТ-III ( $r = -0,467, p < 0,05$ ).

**Висновки.** У 68,4% пацієнтів з первинним ГН та НС спостерігалось зниження рівня АТ-III, що вказує на поширеність дефіциту АТ-III серед цієї категорії пацієнтів. Зниження рівня АТ-III достовірно корелювало з нижчими рівнями сироваткового альбуміну, вищою ДВБ та підвищеним САК у сечі. Водночас, не було виявлено суттєвого зв'язку між дефіцитом АТ-III і гістологічними варіантами ГН. Виявлений дефіцит АТ-III може потребувати уваги під час розгляду питання антикоагулянтної профілактики у пацієнтів з ГН та НС. Однак для уточнення, чи можуть рівні АТ-III служити надійним індикатором для коригування антикоагулянтної терапії та зниження ризику тромбоемболій у цій популяції, необхідні подальші дослідження.

**Ключові слова.** Гломерулонефрит, нефротичний синдром, гіперкоагуляція, антитромбін III.

**Introduction.** Nephrotic syndrome (NS), typically characterised by massive proteinuria (over 3.5 g/day), hypoalbuminaemia, oedema and hyperlipidaemia, is a common presentation of many glomerular diseases [1]. NS is associated with an elevated risk of thromboembolic events (TE) leading to increased morbidity and mortality [2]. The incidence of TE in NS has been estimated to be 3–44% depending on the localization of thrombosis and the extent of the diagnostic screening [3]. The risk of TE is greatest within the first 3 months, although the risk remains elevated for more than 5 years [4].

Membranous nephropathy, minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis, membranoproliferative glomerulonephritis (GN), membranous lupus nephritis with antiphospholipid antibody and amy-

loidosis are glomerular diseases with particularly high rates of venous thromboembolism [5]. Patients with an albumin level <25 g/l are at the highest risk, with a thromboembolic event rate of 8.5 per 1000 patient-years. Each 1.0 g/l reduction in serum albumin resulted in doubling the risk of venous thromboembolism [6].

The hypercoagulability in NS is not fully understood but has been ascribed to at least three different mechanisms. First, elevated thromboxane A<sub>2</sub> may increase platelet activation and aggregation [7]. Second, urinary loss of natural anticoagulants such as antithrombin (AT)-III and protein S combined with increased hepatic synthesis of fibrinogen and coagulation factor V and VIII results in a prothrombotic state [3]. Finally, decreased plasmin levels due to urinary loss, in combination with increased plasminogen activator inhibitor-1 levels, result in decreased fibrinolytic activity [8].

Marked urinary AT-III loss resulting in acquired AT-III deficiency has often been proposed as an important mechanism underlying NS hypercoagulopathy [9]. Intuitively, this hypothesis is attractive because familial AT-III deficiency is the most severe heritable thrombophilia described to date [10].

Iryna Mykhaloiko  
iralisn@gmail.com

AT-III is a serine protease inhibitor (serpin) that physiologically inactivates thrombin (factor IIa) and factor Xa and, to a lesser extent, factors IXa, XIa, XIIa, tissue plasminogen activator, urokinase, trypsin, plasmin, and kallikrein. AT-III is an  $\alpha_2$ -globulin synthesized predominantly in the liver, has a half-life of approximately 2.4 days and a molecular weight of 58 200 Da, and contains 432 amino acids [11]. AT-III has a molecular weight similar to that of albumin and is lost in much the same manner [12]. AT-III physiologically circulates in a form that has a low inhibitory activity. The anticoagulant effect of AT-III is accelerated at least a thousand times in the presence of heparin and other heparin-like glycosaminoglycans, such as heparan sulfate [13].

Appropriate anticoagulation prophylaxis and timely treatment of thromboembolic events are crucial in improving outcomes in patients with NS [3]. The best anticoagulation for TE prevention in patients with NS remains unclear, even if the most used drug is low molecular weight heparin (LMWH) [14]. The therapeutic use of LMWH as an anticoagulant works through the potentiation of endogenous AT-III. Patients with AT-III deficiency may have resistance to therapy with LMWH and may require higher doses for the achievement of therapeutic-activated partial thromboplastin time and protective anticoagulation [15].

However, evidence directly assessing the contribution of AT-III deficiency to NS hypercoagulopathy is lacking. Some studies have attributed venous TE during NS to AT-III deficiency [10]. Others have reported venous TE despite normal AT-III levels [13]. We thus analyzed our data on AT-III deficiency in patients with primary GN and NS to evaluate its influence on NS hypercoagulopathy.

**The aim of this study** was to evaluate the level of antithrombin (AT)-III in blood serum in patients with primary glomerulonephritis (GN) and nephrotic syndrome (NS) and to check its correlation with markers of NS and hypercoagulation.

**Materials and Methods.** We conducted a cross-sectional observational study involving 76 patients with primary GN and NS admitted to the Ivano-Frankivsk Regional Clinical Hospital (Ukraine) in 2022-2024. The research was performed in accordance with international standards for the coordinated participation of respondents, the ethical component of research, and biomaterial collection (WMA Declaration of Helsinki – “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects” and “Universal Declaration on Bioethics and Human Rights” (UNESCO)). The research protocol was approved by the local ethics committee of the Ivano-Frankivsk National Medical University. All patients signed a written informed consent to participate in the study. Also, 40 practically healthy individuals were selected comprising a comparison group and were representative of the main group.

Among the patients, there were 62 men (81.6%; 95% CI 71.0-89.5) and 14 women (18.4%; 95% CI

10.5-29.0). The average age of the patients was 45 (40; 49) years. The criteria for including patients in the study were: age over 18 years, <1 month from the diagnosis of NS, glomerular filtration rate (GFR) > 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Exclusion criteria were: patient's refusal to participate in the study, age <18 years, systemic connective tissue diseases, systemic vasculitis, type 1 and type 2 diabetes, thromboembolic and cardiovascular events in history, chronic heart failure III-IV functional class (according to the NYHA classification), information about acute infectious processes of any etiology, oncological diseases, acute and chronic liver failure, mental disorders.

In all 76 patients the diagnosis of GN was confirmed morphologically as follows 23 patients (30.3%; 95% CI 20.2-41.9) were diagnosed with mesangioproliferative GN, 21 patients (27.6%; 95% CI 18.0-39.1) had membranous GN, 14 patients (18.4%; 95% CI 10.5-29.0) had focal segmental glomerulosclerosis, 11 patients (14.5%; 95% CI 7.5-24.4) had minimal change disease, and 7 patients (9.2%; 95% CI 3.8-18.1) was confirmed membrane proliferative (mesangiocapillary) GN.

Depending on the histological variant of GN, patients received pathogenetic treatment with glucocorticosteroids and cytostatics. All patients have been receiving treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. 48 (63.2%; 95% CI 51.3-73.9) patients have been receiving treatment with sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors.

The clinical diagnosis was determined based on standard examination methods according to the Classification of Kidney Diseases and clinical practice guidelines for the management of glomerular diseases [16]. During the study, all patients underwent a standard examination, which included general clinical, biochemical, and instrumental research methods. Biochemical tests were performed in the laboratory of Ivano-Frankivsk Regional Clinical Hospital.

The GFR was determined using a CKD-EPI calculator. Daily protein excretion (DPE) was determined by the colorimetric method (Dialab, Wiener Neudorf, Austria). Photometric Assay of AT-III in serum with a Chromogenic Substrate was conducted with a set of reagents Granum (Ukraine).

STATISTICA 8 software (StatSoft, Serial STA862D175437Q) was used for statistical analysis. The frequency of qualitative indicators was presented as absolute (n) and relative (%) frequencies, along with the 95% confidence interval (CI) in the form of «n (%; 95% CI).» When analyzing quantitative data, the nature of the distribution of the indicator values was determined using the Shapiro-Wilk test. For quantitative data with a normal distribution, the results were presented as the mean value and standard deviation ( $M \pm SD$ ). For quantitative data with an abnormal distribution, the median and 25-75 quartiles (Me (Q25-Q75)) were used. Quantitative indicators with a normal distribution in two independent groups were compared using Student's t-

test. Abnormally distributed data were compared using the Mann-Whitney test. A comparison of two independent groups for the qualitative indicator was conducted using Fisher's exact test.

Correlation analysis for quantitative indicators with normal distribution was performed using Pearson's correlation coefficient, while for abnormal distribution, Spearman's rank correlation coefficient was used to examine the relationships between ordinal or interval qualitative indicators and quantitative variables. The statistical significance of the correlation coefficients

was established. The critical level of significance ( $p$ ) for testing statistical hypotheses in this study was set at 0.05.

**Results.** Key demographic, clinical, and laboratory characteristics of the patients are summarized in Table 1. The patients were divided into two groups according to the level of AT-III, normal levels of AT-III (80-130 %) and low levels of AT-III (<80 %). Normal levels of AT were diagnosed in 24 (31.6%; 95% CI 21.4-43.3) patients, and decreased – in 52 (68.4%; 95% CI 56.7-78.6) patients.

Table 1

### Characteristics of patients with GN and NS according to the levels of AT-III

	The group of AT in the normal range (n = 24)	The group of decreased levels of AT (n = 52)	p-value
Age, years (Me (Q25-Q75))	41 (35; 47)	43 (38; 50)	p = 0.83
Sex, male (%; 95% CI)	79.2 (57.8-92.9)	82.7 (69.7-91.8)	p = 0.75
Sex, female (%; 95% CI)	20.8 (7.1-42.2)	17.3 (8.2-30.3)	p = 0.75
GFR ml/min/1.73 m <sup>2</sup> (Me (Q25-Q75))	72 (63; 89)	75 (64; 92)	p = 0.67
Albumin levels, g / l (Me (Q25-Q75))	27.4 (22.3; 29.7)	22.4 (18.1; 24.4)	p < 0.05
DPE g / day (Me (Q25-Q75))	4.2 (3.8; 4.6)	5.5 (4.9; 6.3)	p < 0.05
ACR mg / g (Me (Q25-Q75))	2376 (2231; 2619)	2885 (2596; 3178)	p < 0.05
Mesangioprolifera-tive GN (%; 95% CI)	33.3 (15.6-55.6)	28.9 (17.1-43.1)	p = 0.78
Membranous GN (%; 95% CI)	33.3 (15.6-55.6)	25.0 (14.0-38.9)	p = 0.58
Focal segmental glomerulosclerosis (%; 95% CI)	16.7 (4.7-37.4)	19.2 (9.6-32.5)	p = 1.00
GN with minimal changes (%; 95% CI)	12.5 (2.7-32.4)	15.4 (6.9-28.1)	p = 1.00
Mesangiocapillary GN (%; 95% CI)	4.2 (0.1-21.1)	11.5 (4.4-23.4)	p = 0.42
AT III, % (Me (Q25-Q75))	98 (85; 104)	65 (54; 76)	p < 0.001
D-dimer, mg/L, (Me (Q25-Q75))	0.32 (0.16; 0.43)	1.56 (1.02; 2.23)	p < 0.05
Platelet Count (*10 <sup>9</sup> /L), (Me (Q25-Q75))	238 (187; 289)	257 (212; 310)	p = 0.86
INR, (Me (Q25-Q75))	0.9 (0.8; 1.0)	1.0 (0.9; 1.1)	p = 1.00
APTT (s), (Me (Q25-Q75))	43 (38; 48)	46 (41; 50)	p = 0.78
PT (s), (Me (Q25-Q75))	13 (11; 15)	12 (11; 14)	p = 1.00
Fibrinogen (g/L), (Me (Q25-Q75))	2.3 (1.8; 3.4)	4.6 (3.8; 5.2)	p < 0.05

**Abbreviations:** ACR – albumin/creatinine ratio, CI – confidence interval, DPE – daily protein excretion, GFR – glomerular filtration rate; INR – international normalized ratio; APTT – activated partial thromboplastin time; PT – prothrombin time; Me (Q25-Q75) – median and quartiles

As shown in Table 1, decreased levels of AT-III were associated with decreased serum albumin levels, increased daily protein excretion (DPE), and increased albumin/creatinine ratio (ACR). Also, decreased levels of AT-III were associated with increased levels of D-dimer and fibrinogen in serum. On the other hand, we did not observe a statistically significant difference between the international normalized ratio (INR), activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin

time (PT), and platelet count in two groups of patients ( $p > 0.05$ ).

After conducting correlation analysis, we found a direct average correlation between serum albumin levels and AT-III levels ( $r = 0.535$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1), an inverse average correlation between the DPE and AT-III levels ( $r = -0.414$ ,  $p < 0.05$ , (Fig. 2), an inverse average correlation between the ACR and AT-III levels ( $r = -0.467$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

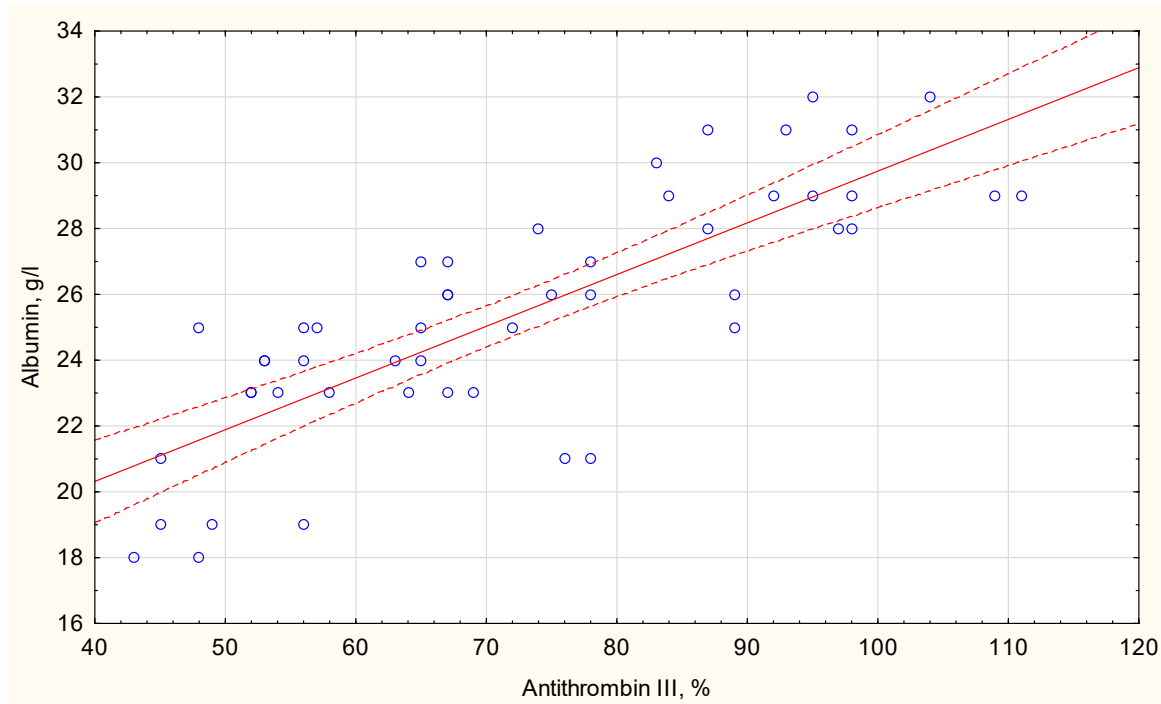


Fig. 1. The correlation between serum albumin and AT-III levels in the study cohort.

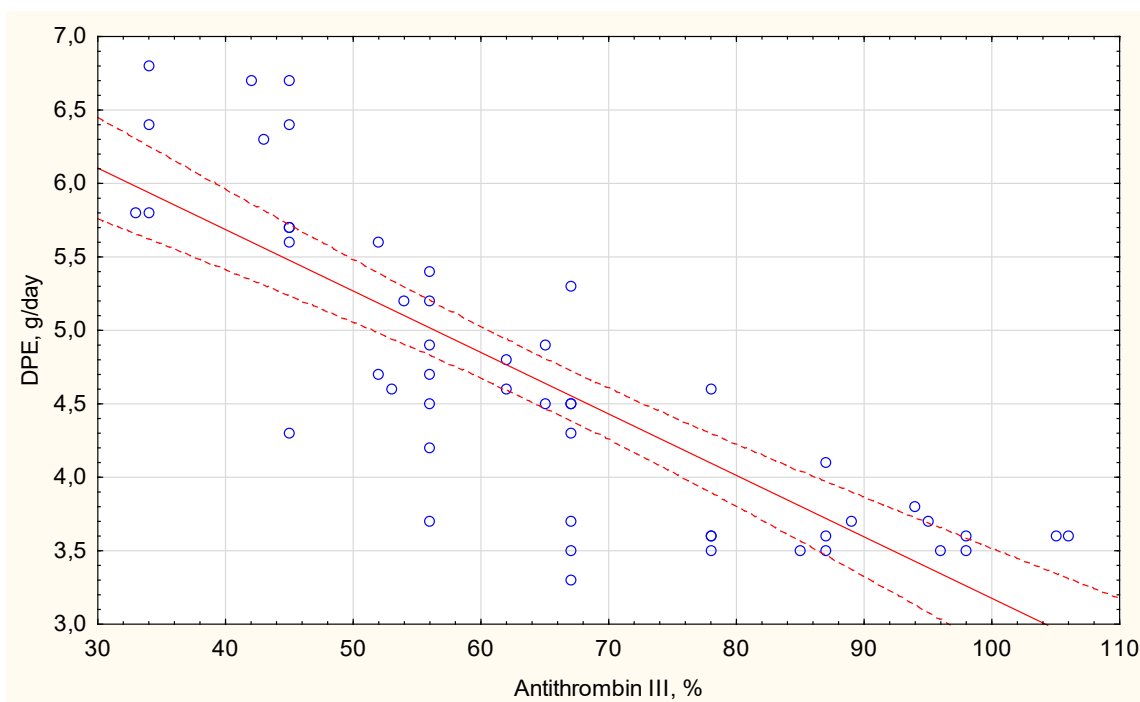


Fig. 2. The correlation between daily protein excretion (DPE) and AT-III levels in the study cohort.

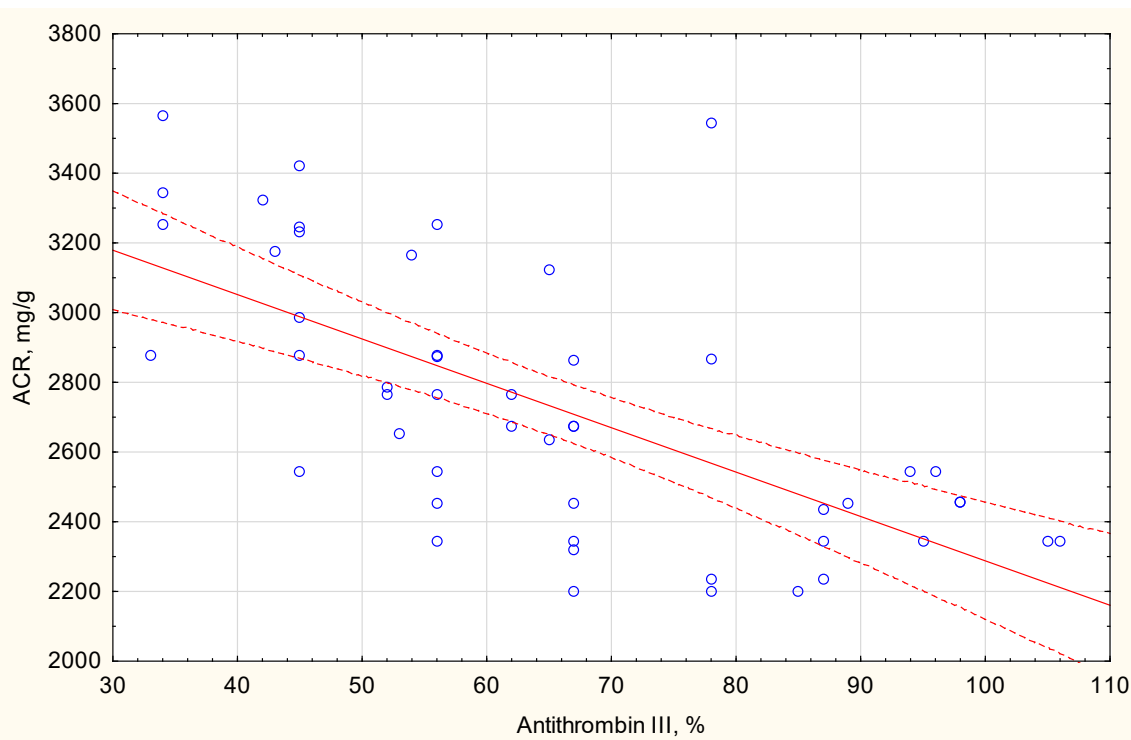


Fig. 3. The correlation between albumin/creatinine ratio (ACR) AT-III levels in the study cohort.

We also found an inverse average correlation between D-dimer and AT-III levels ( $r = -0.615$ ,  $p < 0.05$ ) and an inverse average correlation between fibrinogen and AT-III levels ( $r = -0.524$ ,  $p < 0.05$ ).

There were more men than women in both groups, but the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). We did not note the relationship between AT-III deficiency and the histological variant of GN ( $p > 0.05$ ), which suggests that other factors contribute to the increased risk of TE in membranous GN and focal segmental glomerulosclerosis.

**Discussion.** The pathophysiology underlying NS hypercoagulopathy is likely multifactorial, but acquired AT-III deficiency secondary to urinary AT-III loss has been postulated to have a prominent mechanistic influence [12]. However, there are conflicting data linking nephrotic syndrome-associated AT-III deficiency to both venous TE and hypercoagulopathy [13]. This study was thus designed to evaluate the relationships between AT-III deficiency and NS disease markers.

Decreased AT-III level at the onset of NS has been confirmed by many studies [17]. Wygledowska et al observed that the activity of protein S and AT-III were significantly decreased at the onset of NS as compared with the control group and increased during the remission state [18]. In this study plasma AT-III levels correlated well with serum albumin, which is compatible with our findings. This relationship is explained by the molecular weight and charge of AT-III that are similar to those of albumin [13]. Elidrisy et al showed that during relapse NS urine AT-III levels were increased, while during remission no AT-III was detected in urine [19].

Kauffmann et al. investigated the relationship between the AT-III value and TE in 48 patients with varying degrees of proteinuria. Nine of these patients had clinical signs of thrombosis and the AT-III value was below 70% in eight cases. There was a significant negative correlation between the AT-III value and urinary protein excretion. AT-III was noted in the urine of 32 of 42 patients in whom it was measured [10].

An increased incidence of TE has been reported with AT-III levels lower than 75% [20]. However, TE complications also occur in patients with normal AT-III levels and NS, indicating that although AT-III is a major determinant of plasma antithrombin activity, it is not the only one, because other regulatory proteins of the coagulation cascade play a role [18].

Abdelghani et al found that AT-III deficiency below a clinically accepted threshold was identified in a substantial portion of NS patients. However, AT-III levels were not strongly associated with either proteinuria or hypoalbuminemia severity. These data suggest that while AT-III levels may be a biomarker of NS hypercoagulopathy, AT-III deficiency plays only a limited role in nephrotic NS hypercoagulopathy [13].

However, emerging evidence suggests that AT-III may play an important role in maintaining healthy vascular endothelium via signaling properties that are independent of its coagulation inhibitor function. It is thus possible that AT-III deficiency may drive NS-associated TE risk via vascular mechanisms. Further exploration of this phenomenon will likely require endothelial cell-specific analyses [9].

Several studies have now shown that thrombin generation assays are a useful tool to measure hyperco-

agulopathy and may be helpful in identifying patients at risk for both incident and recurrent venous TE [21]. Meanwhile, other studies have demonstrated a relationship between thrombin generation and AT-III deficiency [20]. A recent study demonstrated that AT-III levels were associated with thromboelastography-determined hypercoagulopathy in adult NS [13].

It is clear that no single factor can explain the hypercoagulability state in patients with GN and NS. The predisposition to thrombosis is probably dependent on the balance between procoagulant and anticoagulant factors. If facilities are available, one should perform a detailed coagulogram including the definition of AT-III level.

**Limitations.** The sample size in this study is small. Larger sample sizes, long-term clinical trials, and the consideration of a greater number of procoagulant and anticoagulant factors are needed to accurately determine the impact of AT-III on the occurrence of hypercoagulation and thromboembolic (TE) events in patients with GN and NS, in order to draw more valid conclusions.

#### Conclusions:

1. In the studied cohort of patients with primary GN and NS, 68.4% demonstrated decreased levels of AT-III, indicating that AT-III deficiency is a common finding.
2. The observed decrease in AT-III levels was significantly correlated with lower serum albumin levels,

higher daily protein excretion (DPE), and a higher albumin-to-creatinine ratio (ACR) in urine.

3. No significant association was found between AT-III deficiency and specific histological variants of GN, suggesting that the relationship between AT-III levels and hypercoagulopathy in GN and NS may be independent of the underlying glomerular pathology.
4. The detected AT-III deficiency may warrant consideration of anticoagulant prophylaxis in patients with GN and NS. However, further studies are needed to determine whether AT-III levels can reliably guide anticoagulation therapy decisions and reduce thromboembolic risk in this population.

**Conflict of interest statement:** the authors declared no competing interest.

**Funding source.** The authors received no financial support for the research.

**Information about the contribution of the authors.**

**I. Mykhaloiko:** literature search, study design planning, data analysis, manuscript writing, and submission;

**R. Yatsyshyn:** concept and management of the work;

**I. Dudar:** concept and management of the paper.

**H. Kuryliv:** curation of patients, formation, and work with the database.

#### References:

1. Waller AP, Troost JP, Parikh SV, Wolfgang KJ, Rovin BH, Nieman MT, et al. Nephrotic syndrome disease activity is proportional to its associated hypercoagulopathy. *Thromb Res.* 2021;201:50-59. doi: 10.1016/j.thromres.2021.02.007.
2. Greenberg KI, Choi MJ. Understanding Hypercoagulability with Nephrotic Syndrome: How the Clot Thickens. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2023;18(2):149-151. doi: 10.2215/CJN.000000000000054.
3. Claudio P, Gabriella M. Nephrotic syndrome: pathophysiology and consequences. *J Nephrol.* 2023;36(8):2179-2190. doi: 10.1007/s40620-023-01697-7.
4. Tian Y, Sun B, Sun G. Research progress of nephrotic syndrome accompanied by thromboembolism. *Int Urol Nephrol.* 2023;55(7):1735-1745. doi: 10.1007/s11255-023-03474-8.
5. Gordon-Cappitelli J, Choi MJ. Prophylactic anticoagulation in adult patients with nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(1):123-125. doi: 10.2215/CJN.05250419.
6. Welander F, Holmberg H, Dimény E, Jansson U, Sjölander A. Prophylactic anticoagulants to prevent venous thromboembolism in patients with nephrotic syndrome-A retrospective observational study. *PLoS One.* 2021;16(7):e0255009. doi: 10.1371/journal.pone.0255009.
7. Lin R, McDonald G, Jolly T, Batten A, Chacko B. A Systematic Review of Prophylactic Anticoagulation in Nephrotic Syndrome. *Kidney Int Rep.* 2020;5(4):435-47. doi: 10.1016/j.ekir.2019.12.001.
8. Dudar I, Mykhaloiko I. The role of hemostatic disorders in the progression of chronic kidney disease. *Ukr J Nephrol Dial.* 2019;4(64):49-55. doi: 10.31450/ukrjnd.4(64).2019.07.
9. Wang SS, Tang H, Ng HY, Lian JJ, Javaid MM. Thromboembolic phenomena in patients with nephrotic syndrome: pathophysiology, risk factors, prophylaxis and treatment. *Br J Hosp Med (Lond).* 2024 Jan 2;85(1):1-10. doi: 10.12968/hmed.2023.0354.
10. Kauffman R, Veltkamp JJ, Van Tilburg NH, Van Es LA. Acquired antithrombin III deficiency and thrombosis in the nephrotic syndrome. *Am J Med.* 1978;65(4):607-13. doi: 10.1016/0002-9343(78)90848-3.
11. Bravo-Pérez C, Vicente V, Corral J. Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(6):397-405. doi: 10.1080/17474086.2019.1611424.

12. *Rezaie AR, Giri H.* Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost.* 2020;18(12):3142-3153. doi: 10.1111/jth.15052.
13. *Abdelghani E, Waller AP, Wolfgang KJ, Stanek JR, Parikh SV, Rovin BH, et al.* Exploring the role of antithrombin in nephrotic syndrome—associated hypercoagulopathy: a multi-cohort study and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2023;18(2):234-244. doi: 10.2215/CJN.0000000000000047.
14. *Mykhaloiko I, Yatsyshyn R, Dudar I.* Effectiveness of glycosaminoglycan in patients with glomerulonephritis: A prospective longitudinal cohort study. *Ukr J Nephrol Dial.* 2022;3(75):22-27. doi: 10.31450/ukrjnd.3(75).2022.03.
15. *Zhang L, Zhang H, Zhang J, Tian H, Liang J, Liu Z.* Rivaroxaban for the treatment of venous thromboembolism in patients with nephrotic syndrome and low AT-III: a pilot study. *Exp Ther Med.* 2018;15(1):739-744. doi: 10.3892/etm.2017.5471.
16. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2021;100(4):S1-S276. doi: 10.1016/j.kint.2021.05.021.
17. *Nishimura M, Shimada J, Ito K, Kawachi H, Nishiyama K.* Acute arterial thrombosis with antithrombin III deficiency in nephrotic syndrome: report of a case. *Surg Today.* 2000;30(7):663-6. doi: 10.1007/s005950070110.
18. *Wyględowska G, Grygalewicz J, Matuszewska E.* Natural coagulation inhibitors; antithrombin III, protein C, protein S in children with hypercoagulation due to nephrotic syndrome. *Med Wieku Rozwoj.* [Internet]. 2001;5(4):377-88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12004145/>.
19. *Elidrissy AT, Gader AM.* Antithrombin III (AT III) and fibrinogen levels in nephrotic syndrome in children. *Haemostasis.* 1985;15(6):384-8. doi: 10.1159/000215177.
20. *Mortazavi F, Majidi J.* Evaluation of hemostatic factors in children with nephrotic syndrome. *Pak J Med Sci.* [Internet]. 2008;24(3):356-9. Available from: <https://www.pjms.com.pk/issues/aprjun208/article/article2.html>.
21. *Kovac M, Mitic G, Lalic-Cosic S, Djordjevic V, Tomic B, Muszbek L, et al.* Evaluation of endogenous thrombin potential among patients with antithrombin deficiency. *Thromb Res.* 2018;166:50-53. doi: 10.1016/j.thromres.2018.04.004.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

**ISSN 2304-0238;****eISSN 2616-7352****Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>****Research paper**

Zhenya Yavroyan<sup>1</sup>, Anna Grigoryan<sup>2</sup>, Nune Hakobyan<sup>1</sup>,  
Agapi Hovhannisyan<sup>1</sup>, Tamara Abgaryan<sup>2</sup>, Anna Karapetyan<sup>2</sup>,  
Emil Gevorgyan<sup>1</sup>

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.08

**Cisplatin and dexamethasone separate and combined effect on nephrotoxic processes in female rats**

<sup>1</sup>Interfaculty Research Laboratory of Structural Biophysics, Research Institute of Biology, Yerevan State University, Yerevan, Republic of Armenia

<sup>2</sup>Laboratory of Human and Animal Physiology, Research Institute of Biology, Yerevan State University, Yerevan, Republic of Armenia

**Citation:**

Yavroyan Zh, Grigoryan A, Hakobyan N, Hovhannisyan A, Abgaryan T, Karapetyan A, et al. Cisplatin and dexamethasone separate and combined effect on nephrotoxic processes in female rats. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84): 65-74. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.08.

**Abstract.** Nephrotoxicity is one of the most severe side effects caused by cisplatin, limiting its use at high, effective concentrations. Dexamethasone, known for its strong anti-inflammatory and immunomodulating properties, is often used to alleviate cisplatin-induced side effects. However, dexamethasone also exhibits pro-oxidant properties and has been associated with morphological impairments and acute kidney injury. Although the mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity are complex and involve numerous cellular processes, oxidative stress is widely accepted as the primary cause of this pathology. This study aims to investigate how dexamethasone, despite having effects similar to cisplatin, alleviates the side effects caused by this drug.

**Methods.** The study measured lipid peroxide product malondialdehyde (MDA) levels using the thiobarbituric acid method and catalase activity using the molybdenum method. For histological examination, 5-6 μm thick tissue sections were prepared from samples processed with formalin and fixed with paraffin. These sections were stained with hematoxylin-eosin and observed under a light microscope.

**Results.** Cisplatin and dexamethasone independently increased MDA levels to varying degrees. Cisplatin raised MDA by 75% in the homogenate and 38% in the supernatant, while dexamethasone increased these levels by 41% and 25%, respectively. The combined use of cisplatin and dexamethasone produced effects similar to those of dexamethasone alone. Catalase activity decreased following exposure to cisplatin (36% in the supernatant and 14% in the nucleus) and dexamethasone alone (33% in the supernatant and 24% in the nucleus). Combined use of the drugs led to a similar reduction in catalase activity. Histological analysis revealed tissue damage, supporting the pro-oxidant nature of both cisplatin and dexamethasone.

**Conclusions.** The findings indicate that both cisplatin and dexamethasone exhibit pro-oxidant effects, as demonstrated by increased malondialdehyde levels, reduced catalase activity, and histological evidence of tissue damage. The ability of dexamethasone to mitigate cisplatin-induced side effects is likely attributable to a combination of its anti-inflammatory and immunomodulatory properties, as well as a "preventive or restraining" effect.

**Key words:** cisplatin, dexamethasone, malondialdehyde, catalase, nephrotoxicity, histological changes.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© Zh. Yavroyan, A. Grigoryan, N. Hakobyan, A. Hovhannisyan,  
T. Abgaryan, A. Karapetyan, E. Gevorgyan, 2024.

Correspondence should be addressed to Nune Hakobyan: [nhakobyan@ysu.am](mailto:nhakobyan@ysu.am)



© Явроян Ж., Григорян А., Акопян Н., Оганесян А., Абгарян Т., Карапетян А., Геворгян Е., 2024.

УДК: 616.61-008.6-036.11:599.323.4]-085

Женя Явроян<sup>1</sup>, Анна Григорян<sup>2</sup>, Нуне Акопян<sup>1</sup>, Агапі Оганесян<sup>1</sup>, Тамара Абгарян<sup>2</sup>,  
Анна Карапетян<sup>2</sup>, Еміль Геворгян<sup>1</sup>

## Окремі та комбіновані нефротоксичні ефекти цисплатину і дексаметазону у самок щурів

<sup>1</sup>Міжфакультетська науково-дослідна лабораторія структурної біофізики, Науково-дослідний інститут біології, Єреванський державний університет, Єреван, Республіка Вірменія

<sup>2</sup>Лабораторія фізіології людини і тварин, Науково-дослідний інститут біології, Єреванський державний університет, Єреван, Республіка Вірменія

**Резюме.** Нефротоксичність є одним із найважливіх побічних ефектів, спричинених цисплатином, що обмежує його використання в ефективних концентраціях. Дексаметазон, відомий своїми сильними протизапальними та імунomodуючими властивостями, часто використовується для полегшення побічних ефектів, спричинених цисплатином. Проте дексаметазон також проявляє прооксидантні властивості та асоційований з морфологічними порушеннями та гострим ураженням нирок. Хоча механізми індукованої цисплатином нефротоксичності є складними та включають численні клітинні процеси, окислювальний стрес визнаний однією з основних причин цієї патології. Метою цього дослідження було вивчити окремі та комбіновані нефротоксичні ефекти цисплатину і дексаметазону у самок щурів.

**Методи.** У дослідженні визначали рівні малонового діальдегіду (MDA) продукту перекису ліпідів за допомогою методу тіобарбітурової кислоти та активності каталази за допомогою молібденового методу. Для гістологічного дослідження із зразків, оброблених формаліном і фіксованих парафіном, готували зрізи тканин товщиною 5–6 мкм. Ці зрізи фарбували гематоксилін-еозином і спостерігали під світловим мікроскопом.

**Результати.** Цисплатин і дексаметазон незалежно підвищували рівні MDA різним ступенем. Цисплатин підвищував MDA на 75% у гомогенаті та на 38% у супернатанті, тоді як дексаметазон підвищував ці рівні на 41% та 25% відповідно. Комбіноване застосування цисплатину та дексаметазону викликало ефекти, подібні до ефектів окремого застосування дексаметазону. Активність каталази знизилася після впливу цисплатину (36% у супернатанті та 14% у ядрі) та дексаметазону окремо (33% у супернатанті та 24% у ядрі). Спільне застосування лікарських засобів призводило до аналогічного зниження активності каталази. Гістологічний аналіз виявив пошкодження тканин, що підтверджує прооксидантну природу як цисплатину, так і дексаметазону.

**Висновки.** Отримані результати вказують на прооксидантну дію як цисплатину, так і дексаметазону, про що свідчить підвищення рівня MDA, зниження активності каталази та гістологічні ознаки пошкодження ниркової тканини. Здатність дексаметазону пом'якшувати побічні ефекти, спричинені цисплатином, ймовірно, пояснюється поєднанням його протизапальних та імунomodуючих властивостей, а також «профілактичного або стримувального» ефекту.

**Ключові слова:** цисплатин, дексаметазон, малоновий діальдегід, каталаза, нефротоксичність, гістологічні зміни.

**Introduction.** Cisplatin (cis-diamine dichloro platinum (II), CDDP) is a chemotherapeutic drug widely used for the treatment of many solid tumors [1, 2]. However, the clinical application and efficacy of cisplatin are highly limited due to its severe adverse effects, including nephrotoxicity [3, 4]. While cisplatin induces various toxicities, such as neurotoxicity, hepatotoxicity, gastrointestinal toxicity, ototoxicity, and allergic reactions, the most commonly reported and dose-limiting side effect is nephrotoxicity [2, 3, 5]. It is estimated that 20% of patients receiving high-dose

cisplatin experience severe renal dysfunction, and approximately one-third of patients develop kidney injury within days of the initial treatment [3, 5].

Cisplatin accumulates in the proximal tubular region of the nephron, where its concentration in tubular cells is higher than in the bloodstream [2, 3]. Additionally, the mitochondria of proximal tubular epithelial cells are major intracellular sites of cisplatin accumulation [5, 6]. Although the mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity are complex and involve numerous cellular processes, such as oxidative stress, apoptosis, and inflammation, oxidative stress (OS) is generally considered the primary cause of this condition [5, 7]. Substantial evidence suggests that cisplatin-induced nephrotoxicity is due to the stimulation of reactive oxygen species (ROS) production, disruption of antioxidant systems, and accumulation of lipid peroxidation products in the kidney [3, 2, 5, 6]. The generation of ROS by cisplatin is directly linked to its cytotoxicity [7,

**Nune Hakobyan:**  
nhakobyan@ysu.am

8]. Moreover, cisplatin negatively affects antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and catalase [5, 9]. Stimulation of OS is considered an alternative mechanism of cisplatin action [1, 2].

To alleviate the undesirable side effects caused by cisplatin, dexamethasone is frequently administered in high doses at various times before, during, and after cisplatin treatment [10, 11]. In addition to its role in reducing acute toxicity, glucocorticoids (GCs) have been shown to prevent the late effects of cytotoxic therapy on normal tissues [10, 11]. Specifically, dexamethasone is used as a concomitant agent for its anti-inflammatory and immunoregulatory properties [10, 11]. However, it has been established that dexamethasone exhibits pro-oxidant properties, stimulates the formation of reactive oxygen species, and increases the degree of lipid peroxidation [10, 12, 13]. Both cisplatin and dexamethasone have also been shown to induce morphological impairments in rat kidney cells [3–5, 13].

Thus, both cisplatin and dexamethasone stimulate the formation of reactive oxygen species, increase the degree of lipid peroxidation, and induce morphological changes in kidney cells, causing nephrotoxicity [7, 8, 10, 12, 13]. In light of the above, it is of interest to investigate the lipid peroxidation levels, antioxidant enzyme (catalase) activity, and histological changes in kidney tissue resulting from the separate and combined use of cisplatin and dexamethasone.

**The aim of this study** is to determine how dexamethasone, which exhibits effects similar to those of cisplatin, alleviates the side effects caused by this drug.

**Materials and methods. Animal care and design of experiment.** The study was performed on adult Wistar albino female rats (120–150 g weight, 20 rats). Experiments were conducted according to the “International Recommendations on Carrying out of Biomedical Researches with Use of Animals” (CIOMS, 1985; 2016), to the “Human Rights and Biomedicine the Oviedo Convention” (CE, 1997), to the European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CE, 2005), and were approved by the National Center of Bioethics (Armenia). Animals were placed in a controlled environment at a temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12-hour day and night cycle, fed commercial rat feed ad-libitum, and given free access to water in the animal house of the faculty of biology at Yerevan State University.

For a single injection of cisplatin and dexamethasone usually chosen doses near the intermediate doses of these drugs. The doses we used (8 mg/kg for cisplatin and 4 mg/kg for dexamethasone) are consistent with this principle. The dose of cisplatin was chosen according to [15], and the dose of dexamethasone according [16]. Cisplatin was purchased from Sigma Aldrich, USA. Dexamethasone (dexamethasone phosphate) 4 mg/ml, solution for injection was purchased from Krka

SI-Slovenia. 2-Thiobarbituric Acid (TBA) (75241) (4,6-Dihydroxy-2-Mercaptopyrimidine, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2-Thiol) SRL India.

The animals were divided into 4 groups, 5 rats in each group. Group 1 (n=5) served as a control group of animals without treatment. Animals in group 2 (n=5) and group 4 (n=4) received a single dose of cisplatin (8 mg/kg) by peritoneal injection and were decapitated 24 hours after administration. Group 3 (n=5) was treated with dexamethasone (4 mg/kg, peritoneal injection) and decapitated 4 hours after administration. Animals in group 4 (n=5) received the same single dose of dexamethasone within 20 hours after the cisplatin injection (4 hours before decapitation). All animals were euthanized by decapitation at an appropriate time following inhalation ether anesthesia. Then, animals were sacrificed, and the kidneys were extracted from each group of animals and used for the isolation of nuclei and histopathological examination. Nuclear fraction from the kidney was isolated by the method of Blobel and Potter [17].

**The malondialdehyde amount estimation.** The malondialdehyde (MDA) amount was estimated in 10% homogenate of rat kidney tissue and in supernatant that formed after the first centrifugation of 10 min at 1000g of this homogenate (centrifuge Sigma 3-18K, Germany) [18]. The assay was based on a condensation reaction of two molecules of thiobarbituric acid with one molecule of MDA, in which the reaction rate depends on temperature, pH value, and concentration of thiobarbituric acid. The reaction mixture contains 30% trichloroacetic acid, 5 N HCl, 0,8% solution of thiobarbituric acid, and an appropriately diluted biological sample of 1 ml each. After heating for 20 min in a boiling water bath and after cooling, the solution was centrifuged at 3000 rpm/min for 10 min and the precipitate obtained was removed [18]. The absorbance of the pink supernatant was determined at 532nm against a blank that contained all reagents without the biological sample. The measurements were carried out with the Chinese-made BK-UV 1800 Spectrophotometer (Biobase China). The MDA concentration (in nmol/mg protein) was calculated using the molar extinction coefficient ( $\epsilon$ )-of MDA  $-1.56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at 532 nm; and the appropriate formula [19].

**Catalase enzyme activity assay.** Catalase (EC 1.11.1.6) activity in supernatant that formed after the first centrifugation of 10% homogenate and in the nuclear fraction of rat kidney tissue was estimated by method [20]. The method is based on the registration of the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradation by the action of catalase. The activity of catalase was determined by measuring a decrease in the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentration at 410 nm. The method of defining catalase activity was based on the development of a stable blue-colored complex as a result of ammonium molybdate reaction with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and subsequent photometric measurement of the recovered complex [20]. The enzyme activity was expressed in  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$

protein per min by the formula as described in [20]. The protein amount was determined by the spectrophotometric method [21].

$$A_{\text{Cat}} = \frac{(D_0 - D_T) V_1}{C V_2 \epsilon l t}$$

Where:

$A_{\text{Cat}}$  is the activity of catalase ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein, minute);

$D_0$  – is the optical density of the blank sample;

$D_T$  – is the optical density of the Test sample;

$V_1$  – is the volume of the reaction mixture (3.1 ml);

$V_2$  – is the volume of the homogenate (0.1 ml),

$C$  – is the amount of protein in 0.1 ml (mg);

$\epsilon$  – is the extinction coefficient of the substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ( $0.02 \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),

$l$  – is the thickness of the cuvette (1 cm),

$t$  – is the time (10 minutes).

**Histopathological examination.** For histological examination, the kidneys were removed and fixed with a 10% formalin solution according to the protocol [22]. The fixed material was subjected to standard histological processing. The tissue dehydration in increasing concentrations of alcohol to remove water was performed by Spin Tissue Processor STP-120 (MYR, Italy). For embedding tissue samples with paraffin wax we use Tissue Embedding Center EC-500 (MYR, Italy). Further, about 5–6  $\mu\text{m}$  thick paraffin sections were cut with the semi-automatic precision microtome CUT 5062 (SLEE Medical, Germany). The slides were stained with hematoxylin-eosin [22]. Hematoxylin-eosin (Hematoxylin, Sigma-Aldrich, Eosin, Sigma-Aldrich, USA) stained samples were used to examine the morphological alterations in rat kidneys. The stained specimens were mounted with DPX and underwent light microscopy using trinocular microscope B-293, OptikamB5 Digital Camera M-114 (Italy). All captured images were recorded via OptikaLiteview software with magnifications  $\times 100$  and  $\times 400$ .

#### **Hematoxylin and Eosin Staining Procedure.**

##### Deparaffinization and rehydration:

For deparaffinization and rehydration, it is necessary to incubate the slides for 5 minutes in xylene (2 times). Then transfer to 100% ethanol for 2 minutes (2 times), after which you should move to 95% ethanol for 2 minutes (2 times) and rinse in distilled water. Slides are ready for Hematoxylin Staining.

Hematoxylin Staining: For Hematoxylin Staining it is necessary to immerse slides in Hansen's Hematoxylin for 5–10 minutes. Then Rinse in running tap water until the blue color appears.

Rinsing and Differentiation: The washed slides should be immersed in 1% hydrochloric acid in ethanol for 10–30 seconds and rinse immediately in running water until the blue color returns. Next, for Bluing, soak in an alkaline solution (such as Scott's Tap Water Substitute) for 1 minute, then rinse in running tap water.

Dehydration: For dehydration, the slide should be kept in 95% ethanol for 1 minute, then transferred to 100% ethanol and kept for 1 minute.

Eosin Staining: For Eosin Staining, it is necessary to dip the slides into the eosin solution and leave it for 1–2 minutes. After that, rinse in 95% ethanol for 30 seconds, then in Eosin Y Solution for 1–2 minutes. Then you have to implement dehydration and clearing.

Dehydration and Clearing: For this purpose, the slides should be immersed in 100% ethanol for 1 minute and then immersed in xylene, leaving for 5 minutes (2 times).

Mounting: Apply a few drops of mounting medium (e.g., DPX) to the slide. Place a coverslip over the tissue section.

**Statistical analysis.** All results were expressed as Mean  $\pm$  SE from 5 independent experiments. Statistical analysis was performed using paired Student's t-test for grouped data, where  $P < 0.05$  was considered statistically significant ( $P < 0.05$  indicates significant differences compared with the control group). Statistical comparisons between experimental groups were performed using Statgraphics Centurion 19 Software (Statgraphics Technologies, Inc., USA). Statistical comparisons between all experimental groups were tested by analysis of variance (ANOVA), and  $\#P < 0.05$  considered significant differences in the case of intergroup comparison.

**Results.** The data presented in Table 1 show significant changes in the concentration of MDA after the treatment of rats with cisplatin and dexamethasone alone, as well as after co-treatment with these drugs, compared to baseline (Table 1). The results indicate that the MDA level significantly increased in the kidney homogenate of rats treated with cisplatin by approximately 75% ( $P < 0.01$ ) compared to the control group [19].

Treatment with dexamethasone increased the MDA level by about 41% ( $P < 0.01$ ). Co-injection of cisplatin and dexamethasone also led to a statistically significant increase in MDA levels by approximately 50.5% ( $P < 0.02$ ) compared to baseline (see Table 1).

As evidenced by the data, the MDA level in the kidney homogenates of animals in all experimental groups was, on average, about four times higher than in the supernatants from the first centrifugation of these homogenates (Table 1). Statistically significant changes in MDA levels compared to the control group were also observed in the supernatants obtained after the first centrifugation of kidney homogenates from all experimental groups. Specifically, cisplatin exposure led to a 38% increase in MDA levels ( $P < 0.01$ ) [19]. Similarly, a separate injection of dexamethasone resulted in a 25% increase in MDA levels in the supernatant compared to baseline ( $P < 0.01$ ) (see Table 1). The combined use of cisplatin and dexamethasone resulted in a 27% increase in MDA levels ( $P < 0.02$ ) (see Table 1).

Statistically significant changes were also observed in intergroup comparisons of the data. An increase in the amount of MDA (by 16%,  $\#P < 0.05$ ) was recorded in the

kidney homogenates of rats treated with cisplatin alone compared to the experimental group of animals receiving a combined injection of cisplatin and dexamethasone (see Table 1). Conversely, no statistically significant difference was found when comparing the data from the dexamethasone-alone group with the results from the co-injected experimental group. Cisplatin increased

the amount of MDA by 24% (#P<0.05) compared to dexamethasone, while dexamethasone decreased the amount of MDA by 19% (#P<0.05) compared to cisplatin alone (see Table 1). No statistically significant changes in MDA levels were observed in intergroup comparisons of results obtained from the supernatants of all experimental groups.

Table 1

**The amount of MDA in a 10% homogenate of kidney tissue and the supernatant from the first centrifugation of this homogenate in all experimental groups [19]**

Experimental groups		Homogenate		Supernatant	
		MDA quantity (in nmol /mg protein)	P-value	MDA quantity (in nmol /mg protein)	P-value
Group 1 (n=5)	Baseline without treatment	+ 4.36 ±0.10		+1.26±0.071	
Group 2 (n=5)	Cisplatin alone treatment	+7.62 ±0.33	<0.01	+1.74±0.070	<0.01
Group 3 (n=5)	Dexamethasone alone treatment	6.15 ±0.28	<0.01	1.58±0.065	<0.01
Group 4 (n=5)	Cisplatin+Dexamethasone	6.56 ±0.15	<0.02	1.60±0.057	<0.02

The next part of the investigation focuses on the measurement of antioxidant enzyme catalase activity in the supernatants from the first centrifugation of

these homogenates and in the nuclear fractions from all experimental groups. The data are presented in Table 2.

Table 2

**Catalase activity in supernatants of first centrifugation of kidney tissue homogenates and nuclear fractions of rats from all experimental groups [23]**

Experimental groups		Supernatant		Nuclear fraction	
		µM/min, mg protein	P-value	µM/min, mg protein	P-value
Group 1 n=5)	Baseline without treatment	++553.27 ± 9.77		++213.00±8.70	
Group 2 (n=5)	Cisplatin alone treatment	++354.15 ± 9.66	<0.05	++182.34± 6.35	<0.01
Group 3 (n=5)	Dexamethasone alone treatment	368.00 ±11.16	<0.05	162.11±10.24	<0.02
Group 4 (n=5)	Cisplatin+Dexamethasone	467.00 ± 18.60	<0.01	187.00± 5.78	<0.02

The obtained results showed that cisplatin treatment caused a significant decrease in catalase activity in the supernatant fraction of kidney tissue by approximately 36% (P<0.05) compared to the baseline level. In contrast, the decrease in the nuclear fraction was less pronounced (approximately 14%; P<0.01) [23] (see Table 2). In the case of dexamethasone alone, a reduction in catalase enzyme activity by 33.5% (P<0.05) in the supernatant fraction of kidney tissue was observed (Table 2). In the nuclear fraction, dexamethasone alone caused a 24% reduction in catalase activity (P<0.02) compared to the baseline level (see Table 2).

The combined injection of cisplatin and dexamethasone resulted in a 16% decrease in catalase enzyme activity (P<0.01) in the supernatant fraction of kidney tissue compared to the baseline (see Table 2). In the nuclear fraction, the combined treatment caused a reduction in catalase activity by approximately 12% (P<0.02) compared to the baseline.

Statistically significant changes in catalase enzyme activity in the supernatant fraction were also observed in intergroup comparisons. Cisplatin treatment alone led to a 24% reduction in catalase activity (#P<0.05) compared to the group receiving combined cisplatin and dexamethasone treatment (see Table 2). A statistically significant reduction in catalase enzyme activity (approximately 21%; #P<0.05) was also observed in the dexamethasone-alone treatment group compared to the combined treatment group (see Table 2). However, no statistically significant differences were recorded when comparing the cisplatin-alone and dexamethasone-alone treatment groups.

Intergroup comparisons of the nuclear fraction data also revealed statistically significant changes in catalase activity (see Table 2). Dexamethasone alone caused a 13% decrease in catalase activity (#P<0.05) compared to the group receiving combined cisplatin and dexamethasone treatment (see Table 2). At

the same time, the data for cisplatin treatment alone showed no statistically significant differences compared to the combined treatment group.

A statistically significant increase in catalase enzyme activity (by 12%; #P<0.05) was observed when comparing the cisplatin-alone treatment group to the dexamethasone-alone group. Conversely, dexamethasone treatment alone decreased catalase activity by 11% (#P<0.05) compared to cisplatin-alone treatment (see Table 2).

The histological observation of the kidney tissue of animals from the control group revealed normal glomerular and tubular structures (Fig. 1-A; 1-4). The kidneys of the normal group showed normal glomerular podocytes (Fig. 1-A; 1-4). Histopathology examination of renal slices from rats treated with cisplatin alone showed different alterations. (Fig. 1-B; 1-4).

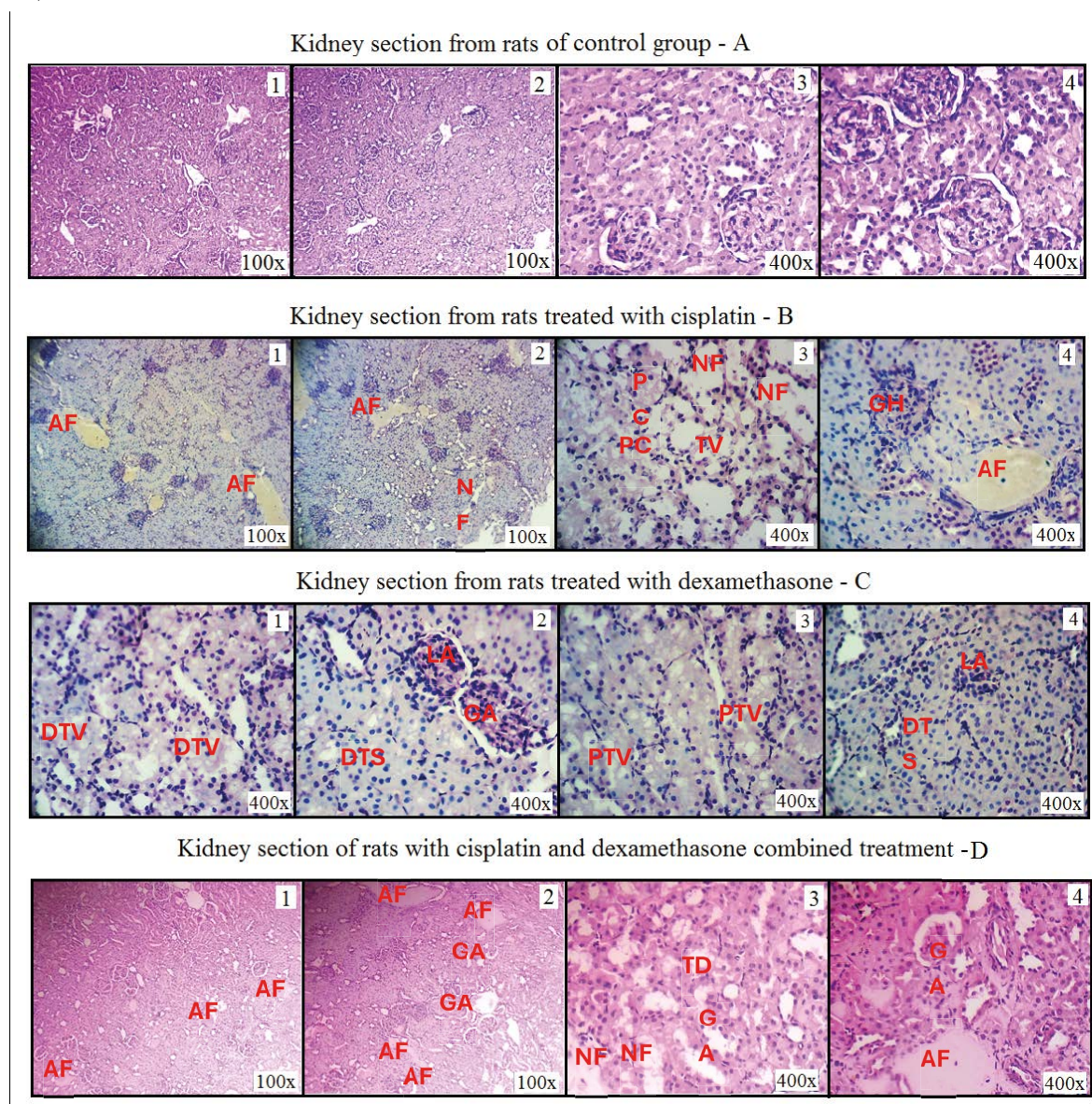


Fig. 1. Photomicrograph of rat kidney section after the staining with hematoxylin-eosin. Photomicrograph of kidney section of rats from the control group (A; 1-4), animals of the experimental group with cisplatin alone treatment (B; 1-4), after dexamethasone injection (C; 1-4), after combined use of cisplatin and dexamethasone (D; 1-4). 100x - magnification:100x; 400x - magnification:400x.

**Abbreviations:** AF-amyloidal foci; NF-necrotic foci; PC-picnic cells; TV-tubular vacuolization; GH- hemorrhagance; DTV-distall tubular vacuolization; LA- lymphocytes accumulation; GA- glomerular atrophy; PTV- proximal tubular vacuolization; DTS- distal tubular swelling; TD-tubular dilatation.

In the kidneys of rats treated with cisplatin alone, distinct regressive phenomena are found. Specifically, in the epithelium of the proximal and distal tubules of the nephron, there is cytoplasmic vacuol-

ization of cells (Fig. 1-B; 1). Additionally, in certain areas, the integrity of the tubule epithelium is compromised (Fig. 1-B; 1). The nuclei of most cells exhibit abnormal morphology, with occasional pyknotic

nuclei also present (Fig. 1-B; 2-4). Furthermore, necrotic foci and amyloidosis are evident in the kidney (Fig. 1-B; 2-4). In some segments of the Malpighian coils of the nephron, hemorrhages occur, and the cells show pyknosis, along with acute tubular necrosis. (Fig. 1-B; 2-4).

Dexamethasone alone injection also caused histomorphological alterations of kidney cells (Figure 1-C; 1-4). These changes are characterized by a narrowing of the lumen in the distal tubules, likely attributed to cellular swelling (Fig. 1-C; 1-4). This phenomenon may be due to the effect of dexamethasone on water-salt metabolism. Histological alterations are evident in the epithelial cells of both the distal and proximal tubules (Fig. 1-C; 3 and 4). Besides cytoplasmic vacuolization (Fig. 1-C; 3 and 4) the presence of lymphocyte accumulations in specific regions was also registered (Fig. 1-C; 1, 2, and 4). Cytoplasmic vacuolization and the presence of lymphocyte accumulations in specific regions are likely associated with inflammatory foci (Fig. 1-C; 2, and 4).

In the kidney of rats with dexamethasone and cisplatin combined treatment simultaneously hematoxylin and eosin (HE) staining showed severe pathological kidney lesions including glomerular atrophy (Fig. 1-D; 1-4), degeneration and necrosis of renal tubular epithelial cells (Fig. 1-D; 2,3), amyloidosis is evident [Fig. 1-D; 3].

All the observed phenomena undeniably point to the nephrotoxic effects of dexamethasone and cisplatin. Furthermore, the retrograde changes are especially pronounced during the alone injection of cisplatin.

Discussion. It is well known, that the primary targets of ROS are lipids, which undergo oxidation with lipoperoxyl radicals and lipid hydroperoxide formation upon interaction with oxidants [24]. In normal physiological conditions, the presence of ROS is vital for the normal functioning of cells [24]. Moreover, a certain physiological amount of ROS is maintained by balancing the processes of their generation and destruction, that is, due to the oxidant/antioxidant balance. This imbalance arises from either increased production of oxidants, decreased levels of antioxidants, or both [9, 24].

Cisplatin disrupts the oxidant/antioxidant balance by inducing ROS formation, oxidative stress, and reducing antioxidant levels [1, 2, 9]. Markers of oxidative stress are usually classified as molecules that become modified by interactions with ROS and as molecules of the antioxidant system that become changed in response to increased redox stress [25]. Currently, more than 20 different markers of oxidative stress have been identified, but still MDA is accepted as a marker of OS and lipid peroxide oxidation (LPO) levels [25, 26]. The amount of malondialdehyde expresses the intensity and level of oxidative stress and the resulting lipid peroxidation [24, 26]. Malondialdehyde, in turn, disrupts the functions of various biomacromolecules by directly binding to them or cross-linking them to each other through Schiff bases [24, 26].

The amount of MDA in 10% homogenates of rat kidney tissue after separate and combined exposure to cisplatin and dexamethasone was determined. The results confirm that compared to the baseline statistically significant changes in MDA quantity were revealed in all experimental groups (Table 1). In fact, both cisplatin and dexamethasone when injected separately increase the amount of MDA, thus stimulating both LPO and OS. This is also evidenced by the data obtained by different authors [7, 9, 12, 13]. However, it should be noted that the pro-oxidant properties of cisplatin are stronger compared to dexamethasone. This is evidenced not only by the changes in the amount of MDA registered compared to the control (75% and 41% in the homogenate, and 38% and 25% in the supernatant), but also by the results of the intergroup comparison of the data. The latter indicates a stronger effect of cisplatin compared to dexamethasone, both in the homogenate and in the supernatant.

The result of the joint action of these drugs is not the arithmetic sum of the effects caused by their separate use. Admittedly, co-injection also increased the amount of MDA, but these data are close to the effect shown by dexamethasone. It allows us to speculate about a certain antagonism between the cisplatin and dexamethasone action. In case of combined use, dexamethasone acts as a buffering factor for cisplatin. This is probably due to the predominance of anti-inflammatory and immunomodulatory properties of dexamethasone, which contributes to the mitigation of unwanted side effects of cisplatin by this hormone.

The pro-oxidant properties of cisplatin and dexamethasone are also evidenced by the changes in the activity of the antioxidant enzyme catalase as a result of the separate and combined effects of these drugs. In the supernatant, cisplatin and dexamethasone reduced catalase activity to an equal extent when applied separately, while the effect of co-injection is smaller than the data obtained when these drugs are used separately. The same trend is observed in the nuclear fraction of kidney cells (Table 2).

A reduction in catalase enzyme activity as a result of both cisplatin and dexamethasone exposure has also been reported by other researchers [9, 27]. The recorded results once again indicate activation of oxidative stress and LPO processes in rat kidney cells by cisplatin and dexamethasone. These processes are known to be the main companions of kidney toxicity. Moreover, it has been evidenced that OS and LPO products are the main cause of nephrotoxicity. Although nephrotoxicity is the result of a complex interaction of various factors, it has been evidenced that OS and LPO products are the main cause of nephrotoxicity [2, 28].

Nephrotoxicity is the most common and most serious of the unwanted side effects caused by cisplatin [5, 29]. This is due not only to the fact that any drug, including cisplatin, is removed from the body through the kidneys but also to the fact that cisplatin accumulates the most in the kidneys [5, 6, 29]. The level of cisplatin

in the proximal tubules of the kidney is almost five times higher than in the serum. Due to this high cisplatin accumulation, the proximal tubular cells suffer significant toxicity [5, 29]. In addition, cisplatin can also cause harm to renal arteries and decrease the glomerular filtration rate [5].

In order to visualize the nephrotoxic effect of applied drugs, histopathological studies were carried out. The obtained results show that cisplatin and dexamethasone cause different histological changes in kidney tissue (Figure 1-B-C). Cisplatin caused tubular vacuolization, amyloid foci, necrotic foci, hemorrhaging, and other degenerative changes. As a result of exposure to cisplatin, similar changes were recorded also by other authors, who noted that this drug injection partial shedding of renal tubular epithelial cells, and caused vacuolar degeneration, dilation of proximal tubules, desquamation of tubular epithelium, and acute tubular necrosis, atrophy of glomerulus [7, 30, 31]. These changes lead to cisplatin-induced renal dysfunction including alterations in glomerular function [7, 30, 31].

Separate injection of dexamethasone also caused histological changes, including atrophy of glomerulus, lymphocyte accumulations, amyloid and necrotic foci, etc. (Figure 1-B-C) [27, 32].

In fact, both cisplatin and dexamethasone compared to the control group, where normal glomeruli and tubular structures were observed, cause different changes in kidney cells, which result in acute kidney injury (AKI).

In the case of combined use these drugs caused the histological injuries that manifested when they were used separately. However, it should be noted that these changes do not have the same strength and depth as in the case of separate use of these drugs. Literature data on the combined use of cisplatin and dexamethasone were not found.

Changes in oxidative stress markers recorded as a result of separate and combined exposure to cisplatin and dexamethasone indicate the activation of free radical formation and lipid peroxidation processes. These processes underlie cisplatin-induced side effects, especially nephrotoxicity [4, 6, 7, 14, 33]. Numerous studies have demonstrated that cisplatin induces damage to an array of renal components, encompassing the vasculature, glomerular apparatus, and, most prevalently, the renal tubules [29-33]. Therefore, it can be argued that the morphological changes in the kidney tissue were recorded due to the OS effect induced by the pro-oxidants we used. However, to understand the concept of oxidative damage, several factors must be investigated in order to have a clearer understanding of these processes.

This study has several limitations. First, it was conducted on a small sample size of female Wistar albino rats, which may limit the generalizability of the findings to other populations or species, including humans. Second, the study focused on specific biochemical and histological markers, such as MDA levels and

catalase activity, without exploring other oxidative stress markers or pathways that might contribute to nephrotoxicity. Additionally, while the chosen doses of cisplatin and dexamethasone were consistent with existing literature, dose-response relationships and long-term effects were not investigated. Finally, the study did not include mechanistic evaluations at the molecular level to elucidate the observed antagonistic interactions between cisplatin and dexamethasone. Future research could address these gaps by incorporating larger sample sizes, additional biomarkers, and molecular analyses.

**Conclusions.** The observed alterations in MDA levels, combined with the decreased catalase enzyme activity, reaffirm the pro-oxidant nature of both cisplatin and dexamethasone. Notably, the oxidative effect of cisplatin is significantly greater than that of dexamethasone when these drugs are administered separately. However, during combined treatment, dexamethasone appears to act as a buffering factor, partially mitigating the oxidative effects of cisplatin.

Histological studies further demonstrate that while both cisplatin and dexamethasone exhibit pro-oxidant properties, they induce distinct histological changes in kidney tissue when used independently. The nephrotoxic injuries caused by each drug alone differ in nature, yet in combined use, these injuries are noticeably milder, likely due to the mitigating presence of dexamethasone.

These findings unequivocally highlight the nephrotoxic effects of both cisplatin and dexamethasone. However, it is hypothesized that dexamethasone's ability to alleviate the side effects of cisplatin may stem from a combination of its anti-inflammatory and immunomodulatory properties, along with a «preventive or restraining» effect on cisplatin-induced damage.

**Ethics statement.** Experiments were conducted according to the “International Recommendations on Carrying out of Biomedical Researches with Use of Animals” (CIOMS, 1985; 2016), to the “Human Rights and Biomedicine the Oviedo Convention” (CE, 1997), to the European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CE, 2005), and were approved by the National Center of Bioethics (Armenia).

**Conflict of interest.** The authors declare that there are no conflicts of interest related to this research.

**Funding source.** No financial support was sought for the completion of this study.

**Author contribution.**

**Zhenya Yavroyan:** Methodology, software, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing-original draft;

**Anna Grigoryan:** Histological sample preparation, interpretation of the results;

**Nune Hakobyan:** Investigation, data curation;

**Agapi Hovhannisyanyan:** Resources, investigation;

**Tamara Abgaryan:** Histological sample preparation;

**Anna Karapetyan:** Interpretation of the results

**Emil Gevorgyan:** Conceptualization, writing- review and editing, supervision.

**Data availability statement.** The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## References:

1. *Aldossary SA.* Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed Pharmacol J.* 2019;12(1):7-15. doi: 10.13005/bpj/1608.
2. *Ghosh S.* Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019;88: 102925 doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
3. *Jadon AS, Bhadauriya P, Sharma M.* An integrative review of cisplatin: the first metal anti-tumor drug. *Journal of Drug Delivery Ther.* 2019;9(3):673-7. doi: 10.22270/jddt.v9i3.2679.
4. *Fawzy MH, Moustafab YM, Khodeerb DM, Saeeda NM, El-Sayed NM.* Molecular mechanisms of cisplatin induced nephrotoxicity. *Rec Pharm Biomed Sci.* 2022;6(3):128-35. doi: 10.21608/rpbs.2022.145126.1152.
5. *Oh GS, Kim HJ, Shen AH, Lee SB, Khadka D, Pandit A, et al.* Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12:55-65. doi: 10.5049/Ebp.2014.12.2.55.
6. *Koulouridis I, Koulouridis E.* Cisplatin nephrotoxicity: New insights in an old problem. *Medical Research Archives.* 2022;10(3):1-17. doi: 10.18103/mra.v10i3.2725.
7. *Soni H, Kaminski D, Gangaraju R, Adebisi A.* Cisplatin-induced oxidative stress stimulates renal Fas ligand shedding. *Ren Fail.* 2018;40(1):314–22. doi: 10.1080/0886022X.2018.1456938.
8. *Wang L, Zhao X, Fu J, Xu W, Yuan J.* The role of tumour metabolism in cisplatin resistance. *Front Mol Biosci.* 2021;8:1-13. 691795. doi: 10.3389/fmolb.2021.691795.
9. *Ognjanović BI, Djordjević NZ, Matić MM, Obradović JM, Mladenović JM, Štajn AŠ, et al.* Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: A possible protective effect of selenium. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1790-803. doi: 10.3390/ijms13021790.
10. *Cook AM, McDonnella AM, Lakea RA, Nowaka AK.* Dexamethasone co-medication in cancer patients undergoing chemotherapy causes substantial immunomodulatory effects with implications for chemo-immunotherapy strategies. *Oncoimmunology.* 2016;5(3):e1066062. doi: 10.1080/2162402X.2015.1066062.
11. *Chow R, Warr DG, Navari RM, Tsao M, Milakovic M, Popovic M, et al.* Efficacy and safety of 1-day versus 3-day dexamethasone for the prophylaxis of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hosp Manag Health Polic.* 2018;25(2):1-13. doi:10.21037/jhmhp.2018.04.05.
12. *Liu W, Zhao Zh., Na Y, Meng Ch, Wang JR.* Dexamethasone-induced production of reactive oxygen species promotes apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy in MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med.* 2018;41(4):2028-36. doi: 10.3892/ijmm.2018.3412 .
13. *Owu DU, Okon IA, Ufot UF, Beshel JA.* Cardiac and renal protective effect of vitamin E in dexamethasone-induced oxidative stressed wistar rats. *Niger J Physiol Sci.* [Internet].2020;35(1):52-60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33084616/>.
14. *Jasim NH, Kareem AD, Majeed MF, Abbas BA.* Effect of long-term treatment with dexamethasone on the liver and kidney histopathology, as well as blood biochemistry in male rabbits (*Lepus Cuniculus*). *Arch Razi Inst.* 2022;77(1):333-43. doi: 10.22092/ARI.2021.356468.1847.
15. *Sahu AK, Verma VK, Mutneja E, Malik S, Nag TC, Dinda A, et al.* Mangiferin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats mediating modulation of MAPK pathway. *Mol Cell Biochem.* 2019;452(1-2):141-152. doi: 10.1007/s11010-018-3420-y.
16. *Nagendranayak IM, Chinta R, Nagaraju KB, Jetti R.* Short-term administration of high dose dexamethasone can induce maximum insulin resistance in Wistar albino rats. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.* [Internet].2021;28(4):352–362. Available from: <https://www.rjdnmd.org/index.php/RJDNMD/article/view/945>.
17. *Blobel G, Potter VR.* Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science.* 1966;154(3757):1662–65. doi: 10.1126/science.154.3757.1662.
18. *Uchiyama M, Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-78. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
19. *Yavroyan ZhV, Hovhannisyann AG, Hakobyan NR, Gevorgyan ES.* Changes in malondialdehyde level in female rats brain, kidney and liver cells after the separate and joint action of cisplatin and steroids. *Biolog Journal of Armenia.* 2021;1(73):17-25.
20. *Koroliuk M, Ivanova L, Maïorova I, Tokarev V.* A method of determining catalase activity. *Lab Delo.* [Internet].1988;1:16-19. (Article in Russian). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2451064/>.

21. *Kalb V, Bernlohr R.* A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem.* 1977;82(2):362-71. doi: 10.1016/0003-2697(77)90173-7.
22. *Korjevsky DE, Gilyarov AB.* Basics of histological technique. Spec. Lit. Sankt Peterburg. 2010. <https://www.books-up.ru/ru/book/osnovy-gistologicheskoy-tehniki-4424130>.
23. *Yavroyan ZhV, Hovhannisyan AG, Hakobyan NR, Gevorgyan ES.* Cisplatin and estradiol separate and joint action on catalase activity in liver and kidney tissues of rats. *Eurasian Union of Scientists (ESU).* 2019;68(11):12-16. doi: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.2.68.439.
24. *Ayala A, Muñoz M, Argüelles S.* Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med and Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.
25. *Fontana J, Zima M, Vetvicka V.* Biological markers of oxidative stress in cardiovascular diseases: after so many studies, what do we know? *Immunological investigations. J Mol Cell Immunol.* 2018;47(8):823-43. doi: 10.1080/08820139.2018.1523925.
26. *Jadoon S, Malik A.* A review article on the formation, mechanism and biochemistry of MDA and MDA as a biomarker of oxidative stress. *Int J Adv. Res.* 2017;5(12):811-18. doi: 10.21474/IJAR01/6024.
27. *Hasona NA, Alrashidi AA, Aldugieman TZ, Alshdokhi AM, Ahmed MQ.* Vitis vinifera extract ameliorate hepatic and renal dysfunction induced by dexamethasone in albino rats. *Toxics.* 2017;5(2):1-9. doi: 10.3390/toxics5020011.
28. *Fang CY, Lou DY, Zhou LQ, Wang JC, Yang B, He QJ, et al.* Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(12):1951- 69. doi: 10.1038/s41401-021-00620-9.
29. *McSweeney KR, Gadanec LK, Qaradakhi T, Ali BA, Zulli A, Apostolopoulos V.* Mechanisms of cisplatin-induced acute kidney injury: Pathological mechanisms, pharmacological interventions, and genetic mitigations. *Cancers.* 2021;13(7):1572. doi: 10.3390/cancers13071572.
30. *Ravindra P, Bhiwgade DA, Kulkarni S, Rataboli PV, Dhume CY.* Cisplatin induced histological changes in renal tissue of rat. *J Cell Anim Biol.* 2010;4(7):108-111. Article Number - 8ACF04113170. doi: 10.5897/JCAB.9000003.
31. *Gong Q, Yin J, Wang M, He L, Lei F, Luo Y, et al.* Comprehensive study of dexamethasone on albumin biogenesis during normal and pathological renal conditions. *Pharm Biol.* 2020;58(1):1261-71. doi: 10.1080/13880209.2020.1855214.
32. *Danaiyan S, Abbasi MM, Raeisi S, Argani H, Ghorbanihaghjo A, Shانهbandi D, et al.* The effects of remdesivir and dexamethasone on renal sirtuin1 expression and renal function in male rats. *Appl Biochem Biotechnol.* 2024;196(2):632–642. doi: 10.1007/s12010-023-04529-3.
33. *Katanić Stanković JS, Selaković D, Rosić G.* Oxidative Damage as a Fundament of Systemic Toxicities Induced by Cisplatin-The Crucial Limitation or Potential Therapeutic Target? *Int J Mol Sci.* 2023; 24(19):14574. doi: 10.3390/ijms241914574.



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

**Founder:**

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

## Research paper

Sadeem Subhi Abed<sup>1</sup>, Mayasa Mansour Mohammed<sup>2</sup>

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.09

## Spectrophotometric and cloud point extraction methods to detect Quercetin Dihydrate in supplement formulations and urine samples

<sup>1</sup>Department of Chemistry, College of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

<sup>2</sup>Department of Chemistry, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

### Citation:

Abed SS, Mohammed MM. Spectrophotometric and cloud point extraction methods to detect Quercetin Dihydrate in supplement formulations and urine samples. Ukr J Nephrol Dialys. 2024;4(84):75-85. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.09.

**Abstract.** The accurate detection and quantification of quercetin dihydrate (QRC) are vital for quality control, pharmacokinetic studies, and bioavailability assessments in pharmaceutical and biological samples. This study aimed to develop and validate a cloud point extraction (CPE) method combined with spectrophotometry for the sensitive and environmentally friendly detection and quantification of QRC in pharmaceutical formulations and spiked urine samples.

**Methods.** The CPE method employed Triton X-114 as a non-ionic surfactant to extract QRC from samples. The extraction process was optimized by evaluating key parameters, including surfactant concentration, incubation temperature, extraction time, and centrifugation speed. Spectrophotometric analysis was conducted before and after extraction to assess the sensitivity and linearity of the method. The method was validated using spiked urine samples and pharmaceutical formulations of QRC, with recovery rates, limits of detection (LOD), and linearity evaluated to ensure accuracy and precision.

**Results.** The optimized CPE conditions included an incubation temperature of 65°C, a 5-minute extraction time, and centrifugation at 3500 rpm. The CPE method significantly improved the sensitivity of QRC detection, reducing the LOD from 0.0351 µg/mL (without CPE) to 0.0234 µg/mL (with CPE). The method exhibited excellent linearity ( $r^2 > 0.998$ ) over a wide concentration range (1–12 µg/mL). High recovery rates (98.88% to 101.6%) and low relative standard deviations (RSD < 2%) were observed in pharmaceutical formulations and spiked urine samples, demonstrating the method's accuracy and precision. The enrichment factor was 1.75, and the preconcentration factor was 4.6.

**Conclusions.** The proposed CPE method combined with spectrophotometry provides a simple, sensitive, and environmentally friendly approach for QRC analysis. It offers significant advantages over conventional methods, including reduced organic solvent use and waste generation, making it suitable for routine analysis in pharmaceutical quality control and pharmacokinetic studies. The method's adaptability to complex matrices, such as urine, and its potential for broader applications, including the analysis of other polyphenolic compounds, were also demonstrated.

**Keywords:** Quercetin dihydrate, cloud point extraction, spectrophotometry, pharmaceutical analysis, urine sample, green chemistry, Triton X-114.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© S. S. Abed, M. M. Mohammed, 2024.

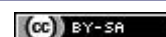
Correspondence should be addressed to Mayasa Mansour Mohammed:  
[mayasamansour@uomustansiriyah.edu.iq](mailto:mayasamansour@uomustansiriyah.edu.iq)

### Article history:

Received August 7, 2024

Received in revised form  
October 13, 2024

Accepted October 15, 2024



© Абед С. С., Мохаммед М. М., 2024.

УДК: 616.633:[535.243+542.61]

Садім Субгі Абед<sup>1</sup>, Майса Мансур Мохаммед<sup>2</sup>

## Методи спектрофотометрії та екстракції за точкою хмарності для кількісного визначення кверцетину дигідрату у добавках та зразках сечі

<sup>1</sup>Кафедра хімії, факультет наук, Університет Багдада, Багдад, Ірак

<sup>2</sup>Кафедра хімії, факультет наук, Університет Мустансірії, Багдад, Ірак

**Резюме.** Точне виявлення та кількісне визначення кверцетину дигідрату (QRC) є важливими для контролю якості, фармакокінетичних досліджень та оцінки біодоступності в фармацевтичних та біологічних зразках. Метою цього дослідження було розробити та валідувати метод екстракції за точкою хмарності (CPE) у поєднанні зі спектрофотометрією для чутливого та екологічно безпечного виявлення та кількісного визначення QRC у фармацевтичних формулах та зразках сечі.

**Методи.** Метод CPE використовував Тритон X-114 як неіонний поверхнево-активний агент для екстракції QRC із зразків. Процес екстракції був оптимізований шляхом оцінки ключових параметрів, таких як концентрація поверхнево-активної речовини, температура інкубації, час екстракції та швидкість центрифугування. Спектрофотометричний аналіз проводився до та після екстракції для оцінки чутливості та лінійності методу. Метод було валідовано з використанням зразків сечі з додаванням фармацевтичних формул QRC, із оцінкою відновлення, меж виявлення (LOD) та лінійності для забезпечення чутливості та точності.

**Результати.** Оптимізовані умови CPE включали температуру інкубації 65°C, час екстракції 5 хвилин та центрифугування на 3500 об/хв. Метод CPE значно покращив чутливість виявлення QRC, зменшивши LOD з 0,0351 мкг/мл (без CPE) до 0,0234 мкг/мл (з CPE). Метод показав відмінну лінійність ( $r > 0,998$ ) в широкому діапазоні концентрацій (1–12 мкг/мл). Високі коефіцієнти відновлення (98,88% до 101,6%) і низькі відносні стандартні відхилення ( $RSD < 2\%$ ) були отримані в фармацевтичних формулах та зразках сечі, що свідчить про точність та прецизійність методу. Фактор збагачення становив 1,75, а фактор передконцентрації — 4,6.

**Висновки.** Запропонований метод CPE у поєднанні зі спектрофотометрією є простим, чутливим та екологічно безпечним підходом для аналізу QRC у добавках та зразках сечі. Він має значні переваги порівняно з традиційними методами, зокрема зменшену кількість використаних органічних розчинників та зменшення утворення відходів, що робить його придатним для рутинного аналізу в контролі якості фармацевтичних засобів та в фармакокінетичних дослідженнях. Запропонований метод можна адаптувати для складних матриць, таких як сеча, а також для більш широкого застосування, включаючи аналіз інших поліфенольних сполук.

**Ключові слова:** кверцетин дигідрат, екстракція за точкою хмарності, спектрофотометрія, фармацевтичний аналіз, зразок сечі, зелена хімія, Тритон X-114.

**Introduction.** The growing worldwide usage of medications and their environmental contamination has become a significant concern [1]. Human urine, with its varied composition, contains both nutrients and contaminants that can act as pollutants and resources [2]. Pharmaceuticals often enter the environment through human activities, as they are excreted in various forms after administration. Pharmaceutical contaminants, particularly hormones and antibiotics, pose risks to the safe use of source-separated urine. Wastewater treatment plants are recognized as major contributors to pharmaceutical impurities in the environment [3]. Therefore, developing a dependable, straightforward, and sensitive technique for analyzing quercetin dihydrate (QRC) in pharmaceuticals and real samples is of paramount importance.

Flavonoids, the most prevalent class of bioactive polyphenolic phytochemicals, are abundant in the plant kingdom and various food sources [4, 5]. Comprising a 15-carbon skeleton (C6–C3–C6) [6], flavonoids are considered safe with a wide therapeutic range [7] and have attracted significant interest for their biological effects. Research shows that flavonoids have beneficial impacts on diabetes, obesity [8, 9], neurodegenerative diseases [10], cardiovascular diseases [11], autoimmune diseases [12], and cancer [13]. They also possess potent antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties [14, 15].

Quercetin, a flavonol, is a plant pigment with a flavonol-type structure known as 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone [16]. It is found in green tea, onions, apples, and other fruits [17, 18]. Quercetin is a small molecule with strong antioxidant qualities and various biological activities, including anti-inflammatory, antiviral, and anti-carcinogenic effects [19–21]. In nature, quercetin is often present in glycosidic forms. It undergoes metabolism in the liver and gastrointestinal tract before being absorbed into the bloodstream. Its metabolites, detectable in blood and urine, are important for evaluating bioavailability [22, 23].

**Mayasa Mansour Mohammed:**  
mayasamansour@uomustansiriyah.edu.iq

Cloud point extraction (CPE) combined with spectrophotometry is an environmentally friendly and cost-effective method for extracting and preconcentrating compounds [24, 25]. This technique is used across various domains, including pharmaceuticals, food samples, and natural materials [26, 27]. CPE combined with spectrophotometry is an environmentally friendly and cost-effective method for extracting and preconcentrating compounds [24, 25]. Despite the effectiveness of methods like high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and others for quercetin analysis [28-30], they are often time-consuming, reagent-intensive, and produce high waste, making them less compatible with green chemistry principles. Conventional liquid-liquid extraction methods also have limitations, such as health risks and environmental concerns.

Therefore, the present study aimed to address the lack of literature on the CPE approach for extracting QRC from pharmaceutical forms and urine samples, introducing a simple extraction procedure using Triton X-114 as a non-ionic surfactant.

**Materials and Methods.** *Ethical Considerations.* The collection and use of urine samples in this study were conducted in accordance with ethical guidelines. Prior to sample collection, informed consent was obtained from the volunteer participant, who was fully informed about the purpose of the study, the procedures involved, and any potential risks or benefits. The study protocol was reviewed and approved by Mustansiriyah University, protocol number 5349 dated 13/12/2023.

*Instrumentation.* A Shimadzu UV-VIS 1800 digital double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) was used to measure the absorbance spectra of the drug. For the CPE tests, absorbance measurements were performed using 50  $\mu$ L quartz cells (Cecil) with a 1 cm path length. The CPE experiments were conducted in a thermostatic water bath (Haake, Fe3) monitored with a mercury thermometer. Separation of the analyte was carried out in a Hettich EBA 21 centrifuge using 15 mL calibrated centrifuge tubes. For batch analysis, 1 cm silica cells were used with a PD-303 spectrophotometer (APEL, Japan). A Sartorius BL 210 S sensitive electronic balance was employed for all weighing procedures.

*Reagents and standard solutions.* All reagents and chemicals used were of analytical grade and did not require further purification. A stock solution of quercetin dihydrate (QRC) at a concentration of 100  $\mu$ g/mL was prepared by dissolving 0.01 g of QRC in 5 mL of 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) and diluting to 100 mL with distilled water in a volumetric flask (Carl ROTH, Germany).

The diazotized sulphadimidine (DSD) solution (0.005 M) was prepared by transferring 0.45 mL of sulphadimidine (33%) into a 100 mL volumetric flask, adding 4 mL of 1 M HCl, followed by 0.0345 g of so-

dium nitrate. The mixture was shaken and allowed to react for 5 minutes, and then distilled water was added to reach the 100 mL mark. A 0.1 M sodium hydroxide solution was prepared by diluting a concentrated 1 M NaOH solution in a 250 mL volumetric flask. Triton X-114 (10% v/v) was prepared by dissolving 3 mL of Triton X-114 in 50 mL of distilled water.

*Pharmaceutical Samples.* Fifteen Mega Quercetin capsules (1200 mg, Solaray, USA) were weighed, and an amount equivalent to 0.01 g of QRC was dissolved in 5 mL of 0.1 M NaOH. The solution was diluted to 100 mL with distilled water in a volumetric flask, stirred thoroughly, and filtered. The filtrate was further diluted with distilled water for analysis.

*Spiked Urine Sample.* A urine sample was collected from a healthy female volunteer and refrigerated without preservatives. Before the extraction process, the sample was brought to room temperature. To prepare the spiked sample, varying concentrations of pure QRC were added to 8 mL of urine. The mixture was centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes. The supernatant was collected and diluted with distilled water to a final volume of 50 mL. This diluted sample was then processed using the standard extraction method for analysis.

*General Batch Procedure.* Serial dilutions of the QRC stock solution (100  $\mu$ g/mL) were prepared in 10 mL calibrated flasks to achieve concentrations ranging from 2 to 18  $\mu$ g/mL. To each flask, 2 mL of DSD solution (0.005 M) and 1 mL of NaOH (0.1 M) were added. The solutions were then diluted to the mark with distilled water and thoroughly mixed. At room temperature (approximately 25°C), the mixtures were allowed to stabilize for 5 minutes for the azo coupling reaction to reach maximum stability. The absorbance was measured at 440 nm using a spectrophotometer.

*Cloud Point Extraction Procedure.* A 1 mL aliquot of QRC solution (100  $\mu$ g/mL) was mixed with 2 mL of DSD solution (0.005 M), 1 mL of NaOH (0.1 M), and 2 mL of Triton X-114 (10% v/v) in a 10 mL calibrated flask. The flask was then filled with distilled water. The mixture was heated to 65°C (above the cloud point temperature of the surfactant) in a thermostatic bath for 15 minutes to form a cloudy phase while avoiding the degradation of QRC. After heating, the mixture was centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes to separate the surfactant-rich phase from the aqueous phase. The mixture was then cooled in an ice bath to below the cloud point temperature to facilitate phase separation. The aqueous phase was discarded, and the surfactant-rich phase, containing the extracted analyte, was collected for further analysis. The surfactant-rich phase was diluted with 1 mL of ethanol, and the absorbance was measured at 455 nm using a PD-303 spectrophotometer (APEL, Japan). A schematic of the cloud point extraction process is presented in Fig. 1.

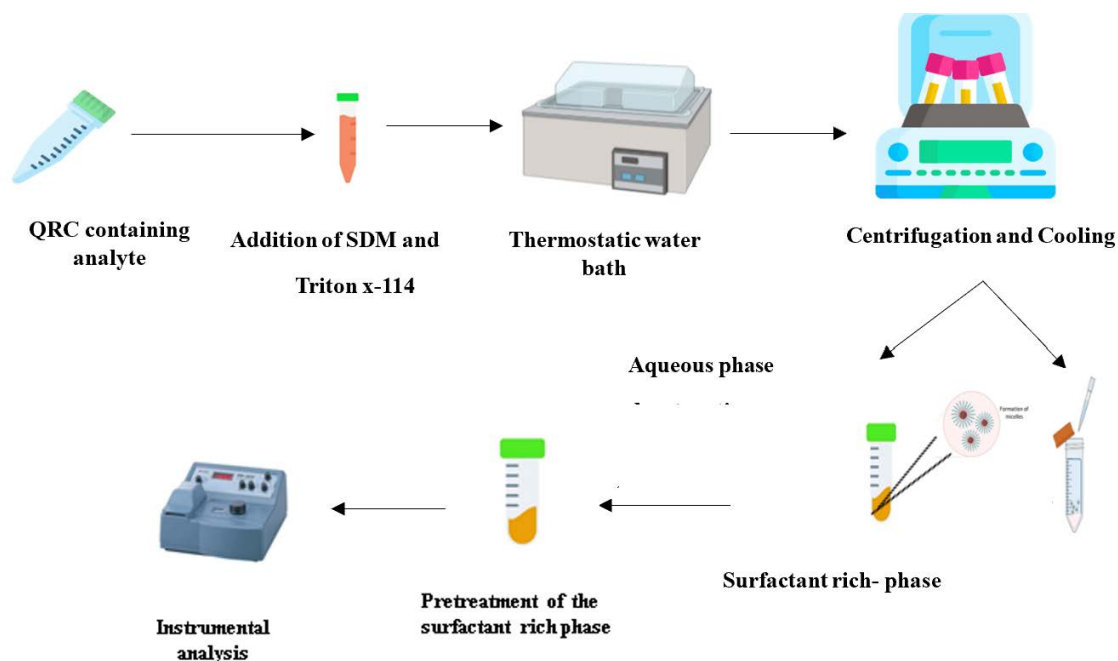


Fig. 1. Schematic representation of cloud point extraction process. Aqueous Solution: Contains QRC, DSD, and Triton X-114. Surfactant Micelles: Formed by the non-ionic surfactant Triton X-114. Heating: The solution is heated above the cloud point temperature to induce phase separation. Centrifugation: Separates the surfactant-rich phase (containing QRC) from the aqueous phase. Cooling: The mixture is cooled to room temperature to form a stable surfactant-rich phase containing the extracted analyte.

**Results.** The spectrophotometric approach demonstrated high sensitivity and efficiency in analyzing quercetin dihydrate (QRC) in pharmaceutical formulations and spiked urine samples. The coupling reaction between QRC and diazotized sulphadimidine (SDM) successfully produced an orange azo-dye product. Cloud point extraction (CPE) using Triton

X-114 as a surfactant allowed for effective phase separation, enhancing the sensitivity of the analyte.

The absorbance spectra of the QRC-SDM coupling product showed peaks at 440 nm before extraction and 455 nm after extraction, confirming successful extraction (Fig. 2).

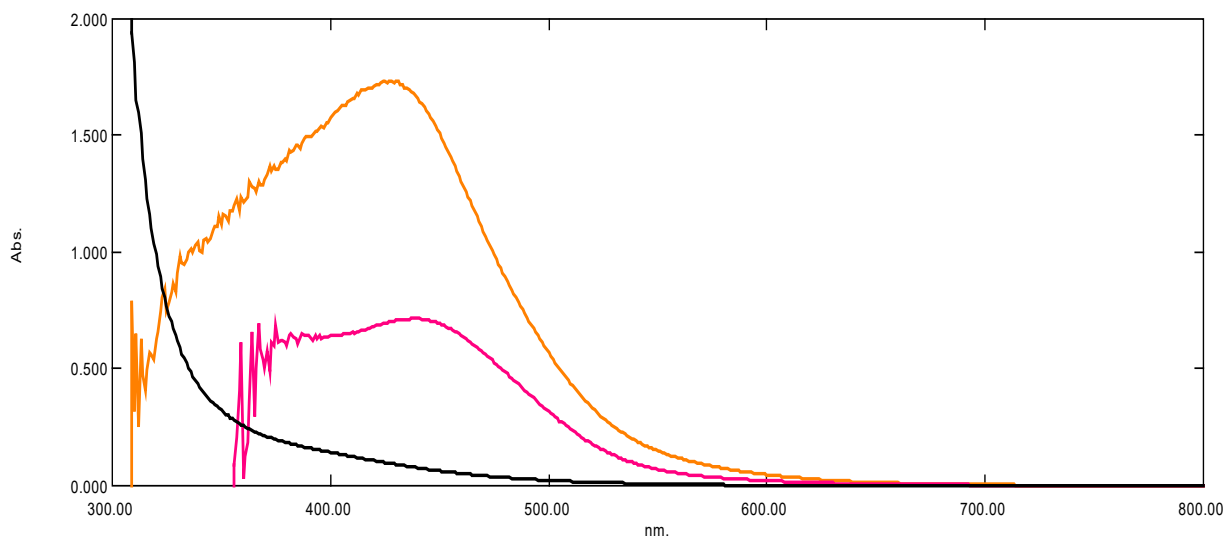


Fig. 2. Absorption spectra of the formed dye by coupling reaction of QRC treated with SDM before and after CPE, measured against a reagent blank.

Optimized conditions for the reaction (Table 1), including 1 mL of NaOH (0.1 M) and 2 mL of SDM

(0.005 M), were critical for achieving maximum color intensity and efficient extraction (Fig. 3).

Table 1

Designated parameters of the CPE technique

Factor	Studied range	Chosen value	
		Spectrophotometry	CPE
Hydrochloric acid volume (mL)	1-4 (1 M)	4	...
SDM volume (mL)	0.5-3 (0.005 M)	2	...
Volume of base solution (mL)	0.5-3 (0.1 M)	1	...
Addition order and reaction time (min)	Different orders 1-45	QRC+R+B 5	...
Triton X-114 volume (mL)	0.5-3	...	1
Incubation time (min) and equilibration temperature (°C)	5-25	...	5
	40-80	...	65
Separation time (min) and rate (rpm)	5-20	...	5
	2000-3500	...	3500

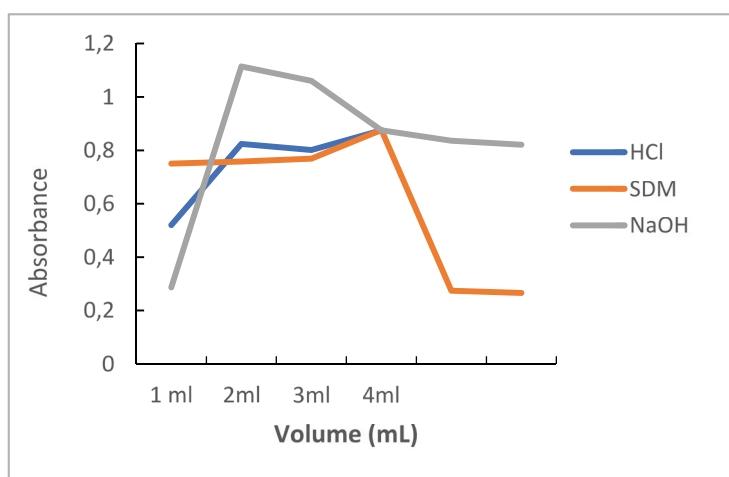


Fig. 3. Effect of volume of (a) HCl, (b) SDM, and (c) NaOH. The volume of HCl can influence the pH of the solution, which in turn affects the stability of the analyte and the surfactant micelles. Fine-tuning the reagent volume allows for precise control over complex formation and analyte recovery. The alkaline volume of the solution can significantly impact the extraction efficiency in cloud point extraction.

The molar ratio of QRC to SDM was determined to be 2:1, as supported by both Job's and mole ratio methods (Fig. 4).

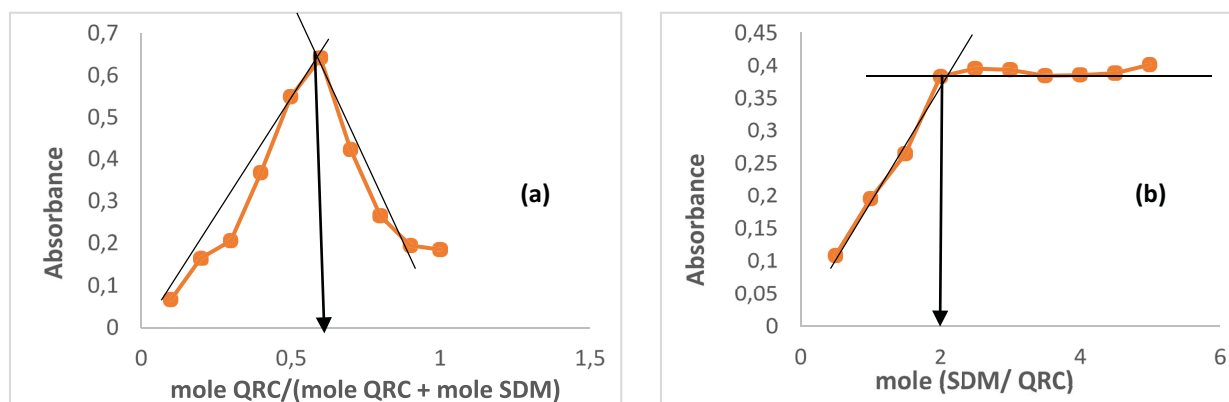


Fig. 4. (a) Job's method, (b) Mole ratio method.

The study also revealed that Triton X-114 outperformed other surfactants in promoting phase separa-

tion, with an optimal volume of 1 mL of Triton X-114 yielding the highest extraction efficiency (Fig. 5).

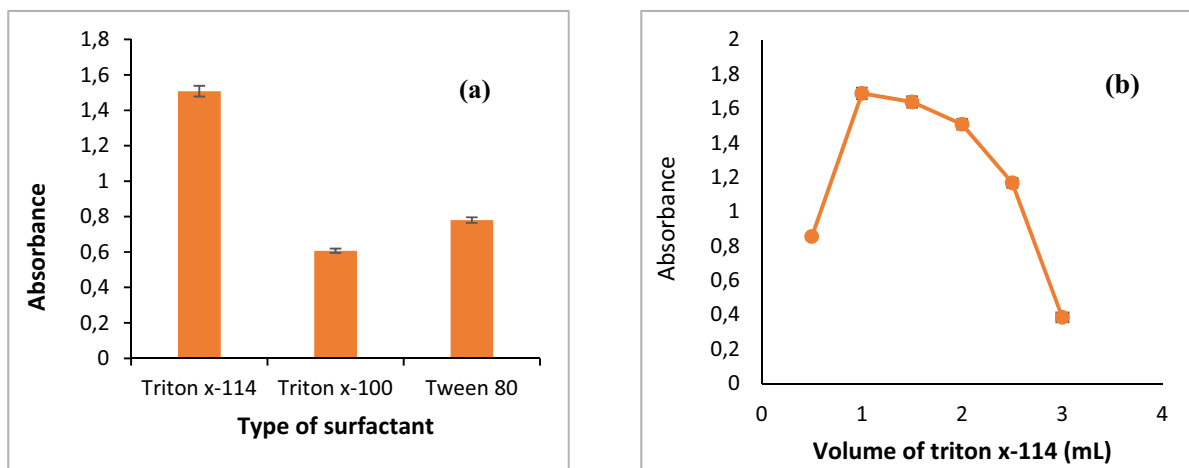


Fig. 5. Effect of (a) surfactant type and (b) Triton X-114 volume on extraction efficiency. The surfactant type and volume can influence micelle formation, phase separation, and analyte solubility in the extraction system. Higher surfactant concentrations may enhance the formation of micelles and improve extraction efficiency.

Optimal conditions for CPE were identified, with a temperature of 65°C, an incubation time of 5 minutes, and a centrifugation speed of 3500 rpm (Figs. 6-8).

These conditions ensured efficient micelle formation and phase separation, which were crucial for analyte recovery.

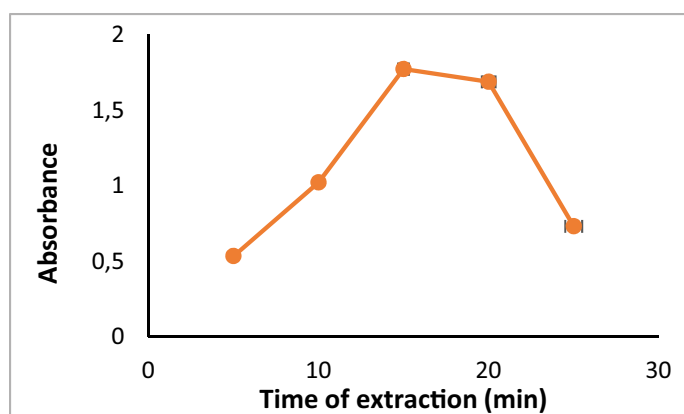


Fig. 6. Effect of extraction time on analyte concentration. Longer extraction times can lead to higher analyte concentrations in the extracted phase, but excessive extraction times may result in decreased efficiency or analyte degradation.

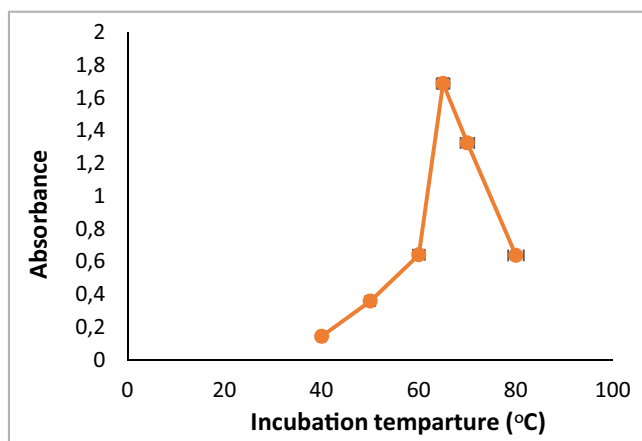


Fig. 7. Effect of incubation temperature on micelle formation and extraction efficiency. Precise control of the temperature during the cloud point extraction process is essential for promoting phase separation and maximizing analyte extraction. The cloud point temperature of the surfactant must be reached and maintained to ensure effective extraction.

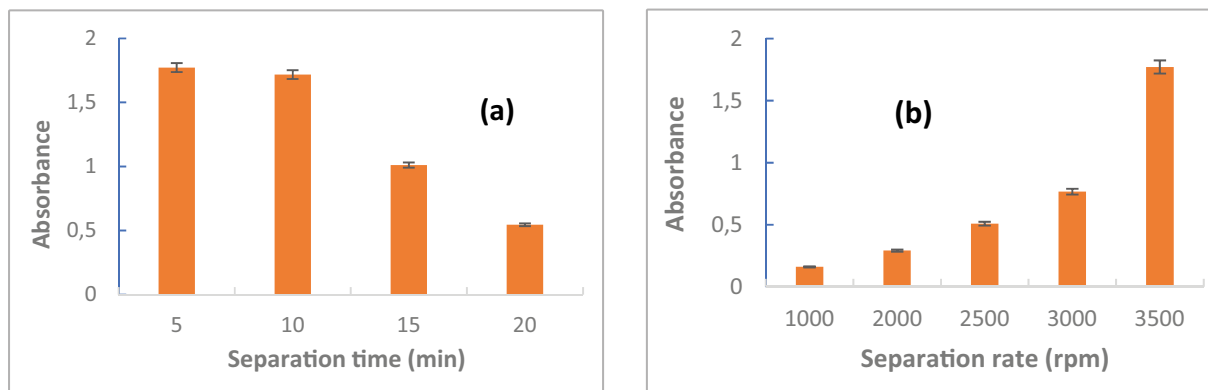


Fig. 8. Effect of (a) separation time on phase separation. Proper selection of separation time is essential to achieve successful separation of the cloudy phase containing the analyte. Longer separation times may lead to improved separation of phases and higher analyte concentrations in the extracted phase, and (b) Effect of separation rate on phase stability.

Calibration curves constructed for QRC, both with and without CPE, exhibited excellent linearity, with correlation coefficients ( $r^2$ ) greater than 0.998, indicating strong reliability in the analytical method. The limit of detection (LOD) for QRC after CPE was determined

to be 0.0234  $\mu\text{g/mL}$ , a significant improvement compared to the non-extracted method, demonstrating the enhanced sensitivity provided by the extraction process (Table 2).

Table 2

**Analytical features for the analysis of QRC using the proposed methods**

Parameter	Value	
	Without CPE	With CPE
Calibration equation	$Y=0.1003x+0.1304$	$Y=0.1754x-0.0172$
Maximum wavelength, nm	430	455
Linearity range ( $\mu\text{g/mL}$ )	2-18	1-12
Linearity coefficient, r	0.9986	0.9983
Molar absorptivity, (L/mol.cm)	33928.481	59332.558
Slope, b (mL/ $\mu\text{g}$ )	0.1003	0.1754
Intercept, a	0.1304	0.0172
Sandell's sensitivity, ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	0.0099	0.0057
Average of recovery%	99.568	99.797
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.0351	0.0234
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.1170	0.0781
RSD (%)	< 0.18	< 0.19
$S_{y/x}$	0.02167	0.043370
$S_a$	0.01574	0.026692
$S_b$	0.00139	0.003626
Enrichment factor	...	1.748754
Preconcentration factor	...	4.6

The recovery rates of QRC from pharmaceutical formulations ranged from 98.88% to 101.6%, with rela-

tive standard deviations (RSD) below 2%, confirming the high precision and accuracy of the method (Table 3).

Table 3

## Assay of QRC in pharmaceutical formulations and spiked urine samples

Sample	Spectrophotometric method	CPE method
	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Rec
Mega quercetin (1200 mg/capsule)	Spiked	Found $\pm$ SD*
6 $\mu\text{g/mL}$	5.998 $\pm$ 0.001	99.966
8 $\mu\text{g/mL}$	8.071 $\pm$ 0.001	100.897
10 $\mu\text{g/mL}$	9.862 $\pm$ 0.001	98.624
Urine sample	6 $\mu\text{g/mL}$	5.736 $\pm$ 0.002

\* Average of five determinations; SD, standard deviation; Rec%, average of recovery; RSD%, average of relative standard deviation.

These results validate the effectiveness of the proposed CPE method for the quantitative analysis of QRC in complex matrices.

The calibration curves for QRC, both before and after cloud point extraction, exhibited excellent linearity, indicating strong method reliability. The post-extraction curve showed a notable improve-

ment in sensitivity, as demonstrated by the higher slope and lower detection limit when compared to the pre-extraction curve. This highlights the effectiveness of the CPE process in concentrating the analyte and enhancing the overall sensitivity of the method. The comparison of these calibration graphs is shown in Fig. 9.

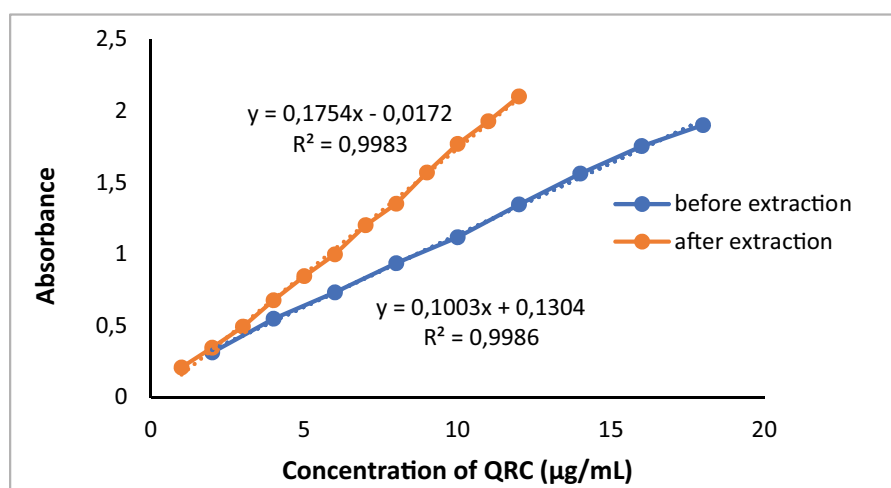


Fig. 9. Calibration graph of QRC (a) before extraction and (b) after CPE.

**Discussion.** The detection and quantification of quercetin dihydrate in supplement formulations and urine samples are crucial for quality control, pharmacokinetic studies, and bioavailability assessments [30, 31]. Various analytical methods have been developed and employed for this purpose, each with its own strengths and limitations [27–31]. The proposed CPE method combined with spectrophotometry has demonstrated significant advantages for the analysis of QRC in pharmaceutical formulations and urine samples. The CPE technique significantly improved the sensitivity of QRC detection compared to conventional spectrophotometric methods. The LOD decreased from 0.0351  $\mu\text{g/mL}$  to 0.0234  $\mu\text{g/mL}$  after extraction, indicating a substantial enhancement in the method's ability to detect trace amounts of QRC. This improvement can be attributed to the preconcentration effect of CPE, which

achieved an enrichment factor of 1.75 and a preconcentration factor of 4.6.

Our study investigated various parameters affecting the CPE process, including surfactant type and concentration, incubation temperature, and separation conditions. Triton X-114 proved to be the most effective surfactant, likely due to its optimal cloud point temperature and micelle-forming properties. The optimized conditions (65°C incubation temperature, 5-minute extraction time, and 3500 rpm centrifugation speed) ensured efficient phase separation and analyte recovery.

The method demonstrated excellent linearity ( $r^2 > 0.998$ ) over a wide concentration range, both with and without CPE. The high recovery rates (98.88% to 101.6%) and low relative standard deviations (<2%) in pharmaceutical formulations and spiked urine samples validate the method's accuracy and precision. These

results suggest that the proposed method is suitable for routine analysis of QRC in complex matrices.

Compared to traditional extraction methods and chromatographic techniques, the CPE approach aligns well with green chemistry principles [24-26]. It reduces the use of organic solvents and minimizes waste generation, making it an environmentally friendly alternative for QRC analysis [24, 27].

In line with our study, several recent advancements in the field of quercetin analysis have highlighted the need for more efficient, cost-effective, and environmentally sustainable methods [17, 23, 28]. The CPE method offers a simpler and greener alternative, with comparable sensitivity and accuracy. The reduction in organic solvent consumption and the relatively rapid extraction process makes CPE a suitable method for laboratories aiming to reduce environmental impact without compromising analytical performance.

Moreover, the successful application of the CPE method to both pharmaceutical formulations and spiked urine samples demonstrates its versatility. Urine is a complex biological matrix, often posing challenges due to the presence of interfering substances [32]. The high recovery rates observed in the spiked urine samples suggest that the CPE method efficiently isolates QRC from such complex matrices, further validating its application in pharmacokinetic and bioavailability studies. The ability to detect low concentrations of QRC in urine is particularly beneficial for monitoring therapeutic levels, drug metabolism, and excretion in clinical settings.

Future considerations for this method could include further automation to enhance reproducibility and scalability, particularly in high-throughput environments. Incorporating automation would streamline the sample preparation process and allow for even more precise control over the extraction parameters. Additionally, further research into the applicability of this method for other structurally similar compounds could expand its utility in the analysis of other nutraceuticals or active pharmaceutical ingredients.

Despite the promising results, this study does have some limitations that should be addressed in future research. First, the CPE method demands precise control over experimental conditions such as temperature, surfactant concentration, and centrifugation speed. Any deviations from these optimized parameters could impact phase separation and analyte recovery, potentially affecting the method's reproducibility in less-

controlled environments or large-scale applications. Second, while Triton X-114 is effective, its use involves manual intervention during phase separation, introducing variability and limiting scalability and automation potential, especially in high-throughput laboratories. Third, although the method has been validated for QRC in pharmaceutical formulations and spiked urine samples, its applicability to more complex biological matrices, like blood plasma or tissues, remains unexplored. These matrices often contain higher levels of interfering substances, which might reduce the method's efficiency and require further optimization. Additionally, while CPE offers environmental benefits, it still involves surfactants that may not be fully biodegradable. The long-term environmental impact of these surfactants should be considered, and future research could focus on identifying greener alternatives to Triton X-114. The suggested procedures, with a 95% confidence level, have been thoroughly validated, showing negligible variance in outcomes across classical and recently introduced means, indicating acceptable precision in determining quercetin. Finally, the study's focus on quercetin means that the method's performance with other polyphenols or structurally similar compounds has not been thoroughly tested, and its broader applicability should be investigated before generalizing its use.

**Conclusions.** In conclusion, the proposed CPE method combined with spectrophotometry provides a reliable, accurate, and environmentally friendly approach for the detection and quantification of quercetin dihydrate in both pharmaceutical and biological samples. Its sensitivity, precision, and alignment with green chemistry principles make it an excellent alternative to more resource-intensive analytical techniques, with the potential for broader applications in both clinical and industrial settings.

**Funding.** The authors did not receive financial support from any organization for the paper submitted.

**Data availability.** The data used during the current study are available from the corresponding author upon request.

**Author's contributions.**

**Sadeem Subhi Abed:** Conceptualization of the research, validation, resources, methodology, formal analysis, and manuscript proofreading.

**Mayasa Mansour Mohammed:** Writing – review & editing, statistical analysis, Writing – original draft, Validation, Resources, Methodology, Investigation, and Conceptualization.

## References:

1. *Hassan B, Hadi H.* Magnetic nanoparticles and cationic surfactants for the extraction and determination of phenolic compounds in environmental and biological samples. *Green Analytical Chemistry*.2023;6:100064. doi: 10.1016/j.greeac.2023.100064.
2. *Guangquan Y, Zhang D, Chunxue Z, Xu Y, Yang B, Xiaocheng W, et al.* Prospects and problems in the agricultural utilization of source-separated urine as a substitute for chemical fertilizers. *Journal of Agriculture Resources and Environment*. 2022;39(2):256.

3. *Li X, Wang B, Liu F, Yu G.* Occurrence and Removal of Pharmaceutical Contaminants in Urine: A Review. *Water.* 2023;15(8):1517. doi: 10.3390/w15081517.
4. *Kováč J, Slobodníková L, Trajčiková E, Rendeková K, Mučaji P, Sychrová A, et al.* Therapeutic potential of flavonoids and tannins in management of oral infectious diseases-A review. *Molecules.* 2022;28(1):158. doi: 10.3390/molecules28010158.
5. *Pereira V, Figueira O, Castilho PC.* Flavonoids as Insecticides in Crop Protection-A Review of Current Research and Future Prospects. *Plants (Basel).* 2024;13(6):776. doi: 10.3390/plants13060776.
6. *Wang T-y, Li Q, Bi K-s.* Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci.* 2018;13(1):12-23. doi: 10.1016/j.ajps.2017.08.004.
7. *Markowska A, Antoszczak M, Kacprzak K, Markowska J, Huczyński A.* Role of Fisetin in Selected Malignant Neoplasms in Women. *Nutrients.* 2023;15(21):4686. doi: 10.3390/nu15214686.
8. *Rufino AT, Costa VM, Carvalho F, Fernandes E.* Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Med Res Rev.* 2021;41(1):556-585. doi: 10.1002/med.21740.
9. *Han S, Luo Y, Liu B, Guo T, Qin D, Luo F.* Dietary flavonoids prevent diabetes through epigenetic regulation: advance and challenge. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023 Nov;63(33):11925-11941. doi: 10.1080/10408398.2022.2097637.
10. *de Andrade Teles RB, Diniz TC, Costa Pinto TC, de Oliveira Júnior RG, Gama e Silva M, de Lavor ÉM, et al.* Flavonoids as therapeutic agents in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a systematic review of preclinical evidences. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7043213. doi: 10.1155/2018/7043213.
11. *Wang S, Zhao Y, Song J, Wang R, Gao L, Zhang L, et al.* Total flavonoids from *Anchusa italica* Retz. Improve cardiac function and attenuate cardiac remodeling post myocardial infarction in mice. *J Ethnopharmacol.* 2020;257:112887. doi: 10.1016/j.jep.2020.112887.
12. *Rengasamy KR, Khan H, Gowrishankar S, Lagoa RJ, Mahomoodally FM, Khan Z, et al.* The role of flavonoids in autoimmune diseases: Therapeutic updates. *Pharmacol Ther.* 2019;194:107-131. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.09.009.
13. *Khan H, Belwal T, Efferth T, Farooqi AA, Sanches-Silva A, Vacca RA, et al.* Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;61(10):1616-1639. doi: 10.1080/10408398.2020.1763910.
14. *Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J.* Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews.* 2019;18:241-72. doi: 10.1007/s11101-018-9591-z.
15. *Hasnat H, Shompa SA, Islam MM, Alam S, Richi FT, Emon NU, et al.* Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon.* 2024;10(6):e27533. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e27533.
16. *Ghareeb MA, Zayan AZ, Shari FH, Sayed AM.* Unveiling the Potential of Quercetin: Chemistry, Health Benefits, Toxicity, and Cutting-Edge Advances. 2024. doi: 10.5772/intechopen.1005344.
17. *Sah MK, Gautam B, Pokhrel KP, Ghani L, Bhattarai A.* Quantification of the quercetin nanoemulsion technique using various parameters. *Molecules.* 2023;28(6):2540. doi: 10.3390/molecules28062540.
18. *Terao J.* Potential role of quercetin glycosides as anti-atherosclerotic food-derived factors for human health. *Antioxidants.* 2023;12(2):258. doi: 10.3390/antiox12020258.
19. *Unnikrishnan Meenakshi D, Narde GK, Ahuja A, Al Balushi K, Francis AP, Khan SA.* Therapeutic Applications of Nanoformulated Resveratrol and Quercetin Phytochemicals in Colorectal Cancer-An Updated Review. *Pharmaceutics.* 2024;16(6):761. doi: 10.3390/pharmaceutics16060761.
20. *Sheikhnia F, Fazilat A, Rashidi V, Azizzadeh B, Mohammadi M, Maghsoudi H, et al.* Exploring the Therapeutic Potential of Quercetin in Cancer Treatment: Targeting Long Non-Coding RNAs. *Pathol Res Pract.* 2024;260:155374. doi: 10.1016/j.prp.2024.155374.
21. *Li T, Zhu J, Yu Q, Zhu Y, Wu C, Zheng X, et al.* Dietary Flavonoid Quercetin Supplement Promotes Antiviral Innate Responses Against Vesicular Stomatitis Virus Infection by Reshaping the Bacteriome and Host Metabolome in Mice. *Mol Nutr Food Res.* 2024;68(11):e2300898. doi: 10.1002/mnfr.202300898.
22. *Xiong H-H, Lin S-Y, Chen L-L, Ouyang K-H, Wang W-J.* The interaction between flavonoids and intestinal microbes: A review. *Foods.* 2023;12(2):320. doi: 10.3390/foods12020320.
23. *Almeida AF, Borge GIA, Piskula M, Tudose A, Tudoreanu L, Valentová K, et al.* Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(3):714-731. doi: 10.1111/1541-4337.12342.
24. *Abdelwahed FT, Mortada WI, El-Defrawy MM, Eltabey RM.* Lead extraction from food samples by combined cloud point-micro solid phase extraction. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2024;129:106119. doi: 10.1016/j.jfca.2024.106119.
25. *Wei W-J, Yang Y, Li X-Y, Huang P, Wang Q, Yang P-J.* Cloud point extraction (CPE) combined with single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS) to analyze and characterize nano-silver sulfide in water environment. *Talanta.* 2022;239:123117. doi: 10.1016/j.talanta.2021.123117.

26. *Hagarová I, Nemček L.* Reliable quantification of ultratrace selenium in food, beverages, and water samples by cloud point extraction and spectrometric analysis. *Nutrients.* 2022;14(17):3530. doi: 10.3390/nu14173530.
27. *Travičić V, Cvanić T, Šovljanski O, Erceg T, Perović M, Stupar A, et al.* Updating the status quo on the eco-friendly approach for antioxidants recovered from plant matrices using cloud point extraction. *Antioxidants.* 2024;13(3):280. doi: 10.3390/antiox13030280.
28. *Umer M, Nisa MU, Ahmad N, Rahim MA, Kasankala LM.* Quantification of quercetin from red onion (*Allium cepa* L.) powder via high-performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV) and its effect on hyperuricemia in male healthy Wistar albino rats. *Food Sci Nutr.* 2023;12(2):1067-1081. doi: 10.1002/fsn3.3822.
29. *Ghasemi M, Rahmani M, Khajeh M.* Development of a Liquid-Phase Microextraction Method Prior to HPLC Analysis of Quercetin in Food Samples. *Journal of Chromatographic Science.* 2024;62(4):390-398. doi: 10.1093/chromsci/bmad028.
30. *Shanko SS, Badessa TS, Tura AM.* Method development and validation for the quantitative determination of total flavonoids through the complexation of iron (III) and its application in real sample. *Anal Chim Acta.* 2024;1301:342443. doi: 10.1016/j.aca.2024.342443.
31. *Solnier J, Zhang Y, Roh K, Kuo YC, Du M, Wood S, Hardy M, Gahler RJ, Chang C.* A Pharmacokinetic Study of Different Quercetin Formulations in Healthy Participants: A Diet-Controlled, Crossover, Single- and Multiple-Dose Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2023;2023:9727539. doi: 10.1155/2023/9727539.
32. *Williams ML, Olomukoro AA, Emmons RV, Godage NH, Gionfriddo E.* Matrix effects demystified: Strategies for resolving challenges in analytical separations of complex samples. *J Sep Sci.* 2023;46(23):e2300571. doi: 10.1002/jssc.202300571.



## Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

### Founder:

- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

### Research article

Anggit Prasetya<sup>1,2</sup>, Agus Santosa<sup>1</sup>, Jebul Suroso<sup>1</sup>

doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.10

### Nursing intervention: Kinesio taping to reduce restless legs syndrome symptoms in patients undergoing hemodialysis

<sup>1</sup>Faculty of Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Banyumas, Central Java, Indonesia

<sup>2</sup>Prof. Dr. Margono Soekarjo Regional General Hospital, Banyumas, Central Java, Indonesia

### Citation:

Prasetya A, Santosa A, Suroso J. Nursing intervention: Kinesio taping to reduce restless legs syndrome symptoms in patients undergoing hemodialysis. *Ukr J Nephrol Dial.* 2024;4(84):86-91. doi: 10.31450/ukrjnd.4(84).2024.10.

**Abstract.** Restless legs syndrome (RLS) is a common neurological disorder affecting hemodialysis patients, significantly impacting their quality of life. While traditional treatments can provide relief, complementary interventions such as Kinesio taping (KT) may offer additional benefits. This study aimed to evaluate the effectiveness of KT in reducing RLS symptoms in patients undergoing hemodialysis.

**Methods.** A quasi-experimental study with a one-group pretest-posttest design was conducted from June to August 2024 at the hemodialysis unit of Prof. Dr. Margono Soekarjo Regional General Hospital, Banyumas, Central Java, Indonesia. Thirty-nine patients aged 18 years or older and experiencing RLS symptoms were selected using simple random sampling. Patients with diabetes mellitus or those who did not complete the intervention were excluded. RLS symptom severity was assessed at baseline, three days, and six days post-intervention using the Assessment Criteria for Diagnostic Restless Legs Syndrome. Data were analyzed using the Wilcoxon test to assess the effect of KT.

**Results.** The study found a significant reduction in RLS symptoms after the KT intervention. Mean RLS scores showed a consistent decrease across three domains: pain, itching, and crawling sensations. By day six, pain reduced from a baseline of 3.54 to 1.22, itching from 3.32 to 1.43, and crawling sensation from 2.46 to 1.3. Other symptoms, including heat and muscle stiffness, also showed significant improvement, with  $p$ -values  $< 0.001$ .

**Conclusions.** Our preliminary findings suggest that KT can be an effective non-pharmacological intervention for alleviating RLS symptoms in hemodialysis patients. KT may serve as a beneficial nursing intervention to reduce RLS symptoms in this population. This simple, non-invasive technique should be considered as part of comprehensive RLS care for patients undergoing hemodialysis.

**Keywords:** kinesio taping, restless legs syndrome, hemodialysis, nursing intervention

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

© A. Prasetya, A. Santosa, J. Suroso, 2024.

Correspondence should be addressed to Agus Santosa: [agussantosa@ump.ac.id](mailto:agussantosa@ump.ac.id)

### Article history:

Received September 22, 2024

Received in revised form

October 21, 2024

Accepted October 22, 2024



© Прасетя А., Сантоса Аю, Суросо Дж., 2024

УДК: 614.253.5:[616.61-085.38-073.27+617.58]:615.825

Анггіт Прасетя<sup>1,2</sup>, Агус Сантоса<sup>1</sup>, Джебул Суросо<sup>1</sup>

## Сестринське втручання: кінезіотейпування для зменшення симптомів синдрому неспокійних ніг у пацієнтів, які лікуються методом гемодіалізу

<sup>1</sup>Факультет наук про здоров'я, Університет Мухаммаді Пурвокерто, Баньюмас, Центральна Ява, Індонезія

<sup>2</sup>Регіональна загальна лікарня ім. Маргоно Сукарджо, Баньюмас, Центральна Ява, Індонезія

**Резюме.** Синдром неспокійних ніг (СНН) є поширеним неврологічним розладом у пацієнтів, які лікуються методом гемодіалізу (ГД), що суттєво впливає на якість життя хворих. У той час як традиційні методи лікування можуть лише забезпечити полегшення, додаткові втручання, такі як кінезіотейпування (КТ), можуть запропонувати додаткові переваги. Це дослідження мало на меті оцінити ефективність КТ у зменшенні симптомів СНН у ГД пацієнтів.

**Методи.** З червня по серпень 2024 року у відділенні гемодіалізу Регіональної загальної лікарні імені проф. Маргоно Соекарджо, Баньюмас, Центральна Ява, Індонезія, було проведено квазіекспериментальне дослідження з одноступовою схемою претест-посттест. Тридцять дев'ять пацієнтів у віці 18 років і старше, які мали симптоми СНН, були включені до дослідження за допомогою простої випадкової вибірки. Пацієнти з цукровим діабетом або ті, хто не завершив втручання, були виключені. Тяжкість симптомів СНН оцінювали на початку, через три та шість днів після втручання за допомогою критеріїв оцінки діагностики синдрому неспокійних ніг. Дані аналізували за допомогою тесту Вілкоксона.

**Результати.** Дослідження виявило значне зменшення симптомів СНН після втручання КТ. Середні бали таких показників як біль, свербіж і відчуття повзання мурашок продемонстрували послідовне зниження. На шостий день біль зменшився з вихідного рівня 3,54 до 1,22 бали, свербіж з 3,32 до 1,43 бали, а відчуття повзання з 2,46 до 1,3 балів. Інші симптоми, включаючи жар і ригідність м'язів, також показали статистично значуще покращення ( $p < 0,001$ ).

**Висновки.** Наші попередні результати свідчать, що КТ може бути ефективним немедикаментозним втручанням для полегшення симптомів СНН у ГД пацієнтів. КТ може бути корисним медсестринським втручанням для зменшення симптомів СНН у цій популяції. Цю просту, неінвазивну техніку слід розглядати як частину комплексної допомоги ГД пацієнтам з СНН.

**Ключові слова:** кінезіотейпування, синдром неспокійних ніг, гемодіаліз, медсестринське втручання.

**Introduction.** Restless legs syndrome (RLS) is a prevalent and debilitating condition, especially among patients undergoing hemodialysis. It is characterized by an irresistible urge to move the legs, often accompanied by uncomfortable sensations such as itching, pain, and tingling. The prevalence of RLS in this population varies widely, with estimates ranging from 6.6% to 80%, largely due to differences in diagnostic criteria, study methodologies, and patient populations [1–4]. Hemodialysis patients, due to the chronic nature of their condition and associated physiological disruptions, are particularly vulnerable to RLS, which significantly impacts their quality of life [5]. Despite its high prevalence, managing RLS in these patients remains challenging due to complex pathophysiological factors, including uremia, iron deficiency, and chronic inflammation [6, 7].

Pharmacological treatments such as dopaminergic agents and gabapentin have shown efficacy in reducing RLS symptoms; however, these medications often have side effects and may not be suitable for long-term use in all patients [8, 9]. Non-pharmacological interventions, including reflexology, massage, and aerobic exercise, have also shown some success in alleviating symptoms and improving sleep quality [10, 11]. Nevertheless, there remains a need for alternative, non-invasive treatments that can be easily applied and integrated into the daily routines of hemodialysis patients, particularly for those who continue to experience discomfort despite current treatments. This presents an empirical gap in identifying effective, low-risk interventions for managing RLS in this population.

Kinesio taping (KT) has emerged as a potential therapeutic approach for a variety of conditions involving pain and discomfort, yet its application specifically for RLS remains underexplored. Previous studies have shown that KT can improve muscle function, enhance proprioception, and increase circulation, potentially offering relief for symptoms associated with RLS [12–14]. Despite these promising mechanisms, a notable theoretical gap exists in understanding how KT can be effectively utilized for RLS symptom management in

**Agus Santosa**  
agussantosa@ump.ac.id

hemodialysis patients. Most existing studies focus on KT's effects in musculoskeletal conditions, and limited empirical evidence addresses its use in neurological conditions such as RLS.

This study aims to address both the empirical and theoretical gaps by investigating the effectiveness of KT as a non-pharmacological intervention for reducing RLS symptoms in hemodialysis patients. This study's contribution lies in exploring KT as an underutilized intervention for RLS in hemodialysis patients, offering a novel approach in symptom management. The findings highlight KT's potential utility as an adjunctive non-pharmacological treatment, with implications for improving patient quality of life.

**Materials and methods.** This quasi-experimental study used a one-group pretest-posttest design [15] and was conducted from June to August 2024 in the Hemodialysis Unit of Prof. Dr. Margono Soekarjo Regional General Hospital in Banyumas, Central Java, Indonesia. The research received ethical approval from the Ethics Committee of Prof. Dr. Margono Soekarjo Regional General Hospital (Approval No: KEPK/RSMS/420/05090). All participants provided written informed consent before inclusion in the study.

The study population comprised patients undergoing hemodialysis. A total of 39 respondents were se-

lected using simple random sampling, with inclusion criteria of patients aged 18 years or older, regularly undergoing hemodialysis, experiencing RLS symptoms, and willing to participate [16, 17]. Patients with comorbid diabetes mellitus or those who did not complete the intervention were excluded to reduce potential confounding effects, as diabetes is known to independently affect RLS symptoms. Excluding these cases allowed a more focused evaluation of the effectiveness of KT in a homogenous RLS patient population.

The study's outcome was RLS symptom severity, measured using the Assessment Criteria for Diagnostic Restless Legs Syndrome. This tool provides a multi-dimensional assessment, evaluating pain, itching, crawling sensations, and muscular stiffness on a 0–4 scale, where 0 indicates no symptoms and 4 denotes the most severe level [18]. Symptom data were collected at three points: baseline, three days post-intervention, and six days post-intervention.

The KT intervention was applied to the affected lower extremities, targeting muscle activation areas around the calves and shins. The tape was applied at approximately 15–25% tension to offer moderate support without restricting movement (Fig. 1).



Fig 1. Kinesio taping applications.

Each application remained for 3–5 days, with re-assessment and reapplication as needed. Taping was conducted by trained practitioners, and participants received basic instructions on reapplication if required post-study.

For the statistical analysis, the Wilcoxon test was used to analyze the effectiveness of KT in reducing RLS symptoms in hemodialysis patients [19].

**Results.** Among the study participants, there were 16 males and 23 females, aged 26 to 81, with most falling within the 46–55 age range. The majority experienced RLS with varying severity levels, and a significant proportion had moderate to severe symptoms. When analyzed by gender, both male and female pa-

tients displayed a similar distribution of RLS severity, with a notable percentage experiencing severe symptoms (Table 1).

KT was applied to mitigate RLS symptoms, with its effectiveness evaluated at three intervals: at baseline (before intervention), three days post-intervention, and six days post-intervention. Results demonstrated substantial improvements in key symptoms, including pain, itching, crawling sensations, sensations of heat, and muscle cramps or stiffness. Pain and itching showed especially consistent reductions from baseline through day six, while crawling sensations, heat, and muscle stiffness also displayed marked improvement over time (Fig. 2).

Table 1

**Demographic and clinical characteristics of the participants (n=39)**

Characteristics	Result
Sex	
Man	16 (41%)
Woman	23 (59%)
Age, years old	
Mean	46-55
Min-Max	26-81
Grade RLS	
Mild	0 (0%)
Moderat	16 (41%)
Sever	23 (59%)
Grade RLS based on sex	
Man	Mild 0 (0%); Mild 5 (13%); Sever 11(28%)
Woman	Mild 0 (0%); Mild 11 (28%); Sever 12 (31%)

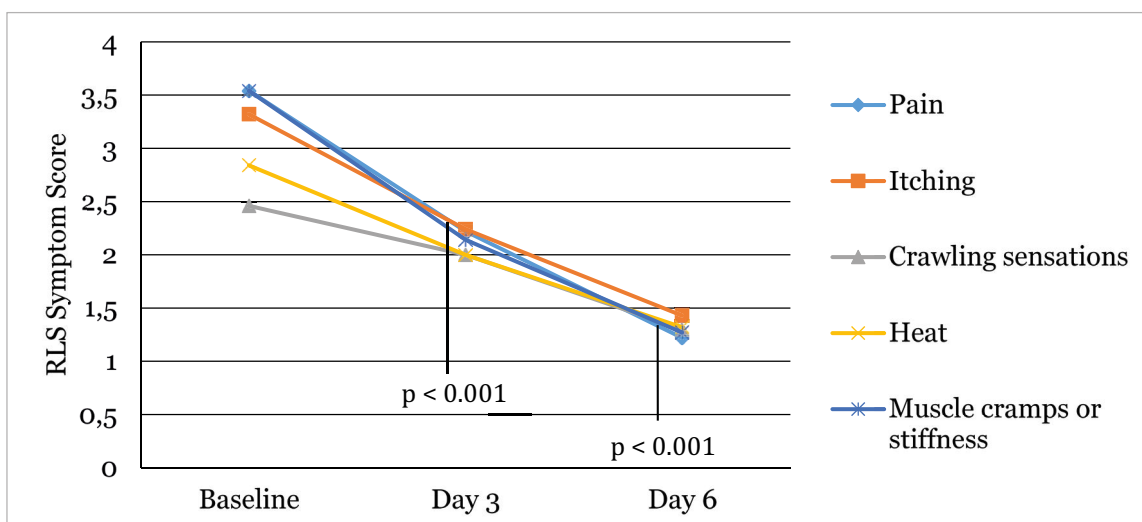


Fig 2. Effectiveness of kinesio taping in reducing RLS symptoms

Statistical analysis confirmed the symptom reductions were significant, with p-values < 0.001 across all parameters. Qualitative feedback from patients further supported these findings, with patients reporting high comfort levels with KT application during both hemodialysis sessions and daily activities. No adverse effects or discomfort were noted during the study period, suggesting KT as a well-tolerated intervention. These findings indicate that KT could serve as an effective, non-pharmacological approach to reduce RLS symptoms and improve the quality of life for hemodialysis patients with RLS.

**Discussion.** The findings of this study demonstrate that KT effectively reduces RLS symptoms in patients undergoing hemodialysis. Symptoms such as pain, itching, crawling sensations, heat, and muscle cramps

or stiffness showed significant improvement after KT application, with statistical analysis revealing p-values < 0.001 across all symptom parameters. These results suggest that KT can be a beneficial non-pharmacological intervention for managing RLS in hemodialysis patients.

Qualitative feedback highlighted patient comfort with KT, as patients consistently reported ease of application and tolerance of the tape both during hospital hemodialysis sessions and at home. This positive feedback aligns with KT's intended design as a non-invasive intervention, supporting its feasibility for long-term use. Additionally, the absence of adverse effects, such as skin irritation, further reinforces KT's suitability for integration into routine care for RLS management in hemodialysis patients.

The physiological mechanisms underlying KT's effectiveness in alleviating RLS symptoms likely include improvements in muscle function and pain modulation. KT is known to enhance proprioception, improve neuromuscular control, and increase local circulation and lymphatic flow [12, 20]. This enhanced circulation can help reduce discomfort associated with the urge to move the legs, a characteristic of RLS [21]. In this study, reductions in pain, itching, and crawling sensations support the hypothesis that KT's circulatory and neuromuscular effects play a significant role in symptom relief.

Previous studies have shown that KT can reduce pain and improve functional outcomes in patients with musculoskeletal and neurological conditions [22, 23]. Although direct evidence of KT's effect on RLS is limited, mechanisms observed in other contexts, such as increased proprioceptive feedback and improved balance, may explain the positive outcomes in this study. Enhanced proprioception and muscle activation likely contributed to better limb control, potentially reducing the frequency of involuntary leg movements common in RLS patients [12].

Managing RLS in hemodialysis patients remains a challenge due to the multifactorial nature of the condition, with contributing factors such as iron deficiency, uremia, and imbalances in calcium and phosphorus metabolism well-documented [6, 7]. Chronic inflammation in end-stage renal disease further exacerbates RLS symptoms [24]. While pharmacological treatments, such as dopaminergic agents like pramipexole and gabapentin, have been effective [8, 9], non-pharmacological interventions like KT provide an appealing alternative, particularly for patients seeking non-invasive therapies.

Other non-pharmacological approaches, such as reflexology, massage, and aerobic exercise, have also shown promise in reducing RLS symptoms and improving sleep quality [10, 11, 25]. Similar to KT, these interventions may improve circulation and muscle relaxation, underscoring the potential of physical function enhancement to relieve RLS discomfort. However, KT has the added advantage of being easy to apply, non-invasive, and convenient for long-term use, distinguishing it from other treatments requiring frequent sessions.

Compared to other interventions, KT offers a continuous and convenient approach that may be particularly suited for hemodialysis patients, who might find frequent appointments challenging. Reflexology and

aerobic exercise have been effective in alleviating RLS symptoms, but KT's prolonged symptom relief and suitability for long-term use present it as a unique and valuable option.

The novelty of this research lies in applying KT to a patient population and condition not extensively studied in this context. By evaluating KT's impact on key RLS symptoms, such as pain, itching, and crawling sensations, the study contributes to the understanding of non-pharmacological interventions for RLS and offers a novel approach that could complement existing therapies. The results may significantly impact quality of life improvements for hemodialysis patients with RLS, while also expanding KT's clinical applications.

Despite promising results, this study has limitations, including the potential for self-report bias, as patients' assessments of symptom changes were subjective and could be influenced by personal expectations. Additionally, the small sample size limits generalizability. Future studies should consider a randomized controlled trial design with a larger sample size to validate KT's effectiveness in this population.

**Conclusions.** In conclusion, KT shows promise as an intervention for reducing RLS symptoms in patients undergoing hemodialysis. Its potential to enhance proprioception, increase circulation, and improve neuromuscular control likely underlies the observed symptom relief. Given its non-invasive nature and potential effectiveness, KT could be integrated into standard nursing care practices for RLS management among hemodialysis patients. Future studies should aim to develop standardized KT protocols, considering individual patient needs and incorporating multidisciplinary insights to optimize outcomes.

**Conflict of interest statement.** The authors declare that they have no competing interests.

**Funding source.** The research was entirely self-funded.

**Author Contributions.** All the authors equally participated in draft preparation, manuscript revision, and content evaluation. All authors have read and agreed to the content of the manuscript and confirm the accuracy and integrity of every detail of this research.

**Data Availability Statement.** The data used in this study are available from the corresponding author and all co-authors upon request.

**Acknowledgment.** All authors thank Margono Soekarjo Regional General Hospital and Universitas Muhammadiyah Purwokerto for their support.

## References:

1. Salib M, Memon AN, Gowda AS, Rallabhandi B, Bidika E, Fayyaz H, et al. Dialysis Patients With Restless Leg Syndrome: Can We Relieve Their Suffering? *Cureus*. 2020;12(8):e10053. doi:10.7759/cureus.10053.
2. Tang M, Ge J, Sun K, Cui B, Guan Y, Wang J. A Network Meta-analysis of the Effectiveness and Safety of Drugs for Restless Legs Syndrome in Dialysis Patients. *Semin Dial*. 2021;35(4):293-306. doi:10.1111/sdi.13021.

3. *Tutan D, Ulfberg J, Aydemir N, Eser B, Doğan İ.* The Relationship Between Serum Selenium Levels and Restless Leg Syndrome in Chronic Kidney Disease Patients. *Medicina (B Aires)*. 2023;59(10):1795. doi:10.3390/medicina59101795.
4. *Harahap RH, Muzasti RA, Nasution AT.* Laboratory finding and restless legs syndrome in regular hemodialysis patients. *Int J Res Sci Manag*. 2020;7(11):68-71. doi: 10.29121/ijrsm.v7.i11.2020.8.
5. *Dikici S, Bahadır A, Baltacı D, Ankaralı H, Eroglu M, Ercan N, et al.* Association of Anxiety, Sleepiness, and Sexual Dysfunction With Restless Legs Syndrome in Hemodialysis Patients. *Hemodial Int*. 2014;18(4):809-818. doi:10.1111/hdi.12175.
6. *Kahvecioğlu S, Yıldız D, Büyükkoyuncu N, Celik H, Tufan F, Kılıç AK, et al.* Effect of Renal Transplantation in Restless Legs Syndrome. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(1):45-9. doi: 10.6002/ect.2014.0163.
7. *Neves PDM de M, Gracioli FG, Oliveira IB, Bridi RA, Moysés RMA, Elias RM.* Effect of Mineral and Bone Metabolism on Restless Legs Syndrome in Hemodialysis Patients. *J Clin Sleep Med*. 2017;13(01):89-94. doi: 10.5664/jcsm.6396.
8. *Safarpour Y, Vaziri ND, Jabbari B.* Restless Legs Syndrome in Chronic Kidney Disease- A Systematic Review. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2023;13:10. doi: 10.5334/tohm.752.
9. *Hajian S, Nikfam MRR, Esmayeilzad Z.* Comparison of the Effects of Pramipexole and Gabapentin on the Treatment of Restless Leg Syndrome in End-Stage Chronic Renal Failure Patients Undergoing Hemodialysis. *J Nephropathol*. 2020;9(3):e25-e25. doi: 10.34172/jnp.2020.25.
10. *Ghanbari A, Shahrabaki PM, Dehghan M, Mardanparvar H, Abadi EKD, Emami A, et al.* Comparison of the Effect of Reflexology and Swedish Massage on Restless Legs Syndrome and Sleep Quality in Patients Undergoing Hemodialysis: A Randomized Clinical Trial. *Int J Ther Massage Bodywork*. 2022;15(2):1-13. doi: 10.3822/ijtmb.v15i2.705.
11. *Mortazavi M, Vahdatpour B, Ghasempour A, et al.* Aerobic Exercise Improves Signs of Restless Leg Syndrome in End Stage Renal Disease Patients Suffering Chronic Hemodialysis. *Sci World J*. 2013;2013(1). doi: 10.1155/2013/628142.
12. *Kim WI, Choi YK, Lee JH, Park YH.* The Effect of Muscle Facilitation Using Kinesio Taping on Walking and Balance of Stroke Patients. *J Phys Ther Sci*. 2014;26(11):1831-1834. doi: 10.1589/jpts.26.1831.
13. *Lim C, Park Y, Bae Y.* The Effect of the Kinesio Taping and Spiral Taping on Menstrual Pain and Premenstrual Syndrome. *J Phys Ther Sci*. 2013;25(7):761-764. doi: 10.1589/jpts.25.761.
14. *Hartanto WD.* Physical Exercise Intervention in Reducing the Severity Level of Restless Leg Syndrome in Hemodialysis Patients: Literature Review. *J Aisyah J Ilmu Kesehat*. 2023;8(3). doi: 10.30604/jika.v8i3.2179.
15. *Miller CJ, Smith SN, Pugatch M.* Experimental and quasi-experimental designs in implementation research. *Psychiatry Res*. 2020;283:112452. doi: 10.1016/j.psychres.2019.06.027.
16. *Kang H.* Sample size determination and power analysis using the G\*Power software. *J Educ Eval Health Prof*. 2021;18:17. doi: 10.3352/jeehp.2021.18.17.
17. *Elfil M, Negida A.* Sampling methods in Clinical Research; an Educational Review. *Emerg (Tehran, Iran)*. [Internet]. 2017;5(1):e52-e52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286859/>.
18. *Brindani F, Vitetta F, Gemignani F.* Restless legs syndrome: differential diagnosis and management with pramipexole. *Clin Interv Aging*. 2009;4:305-313. doi: 10.2147/cia.s4143.
19. *Proudfoot JA, Lin T, Wang B, Tu XM.* Tests for paired count outcomes. *Gen psychiatry*. 2018;31(1):e100004. doi: 10.1136/gpsych-2018-100004.
20. *Choi YK, Park YH, Lee JH.* Effects of Kinesio Taping and McConnell Taping on Balance and Walking Speed of Hemiplegia Patients. *J Phys Ther Sci*. 2016;28(4):1166-1169. doi: 10.1589/jpts.28.1166.
21. *Bae SH, Lee JH, Oh KA, Kim KY.* The Effects of Kinesio Taping on Potential in Chronic Low Back Pain Patients Anticipatory Postural Control and Cerebral Cortex. *J Phys Ther Sci*. 2013;25(11):1367-1371. doi: 10.1589/jpts.25.1367.
22. *Aksu NT, Erdoğan M, Erdoğan A.* The Effect of Kinesio Taping on Pain, Respiratory Function, and Muscle Strength After Thoracotomy. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg*. 2023;31(4):507-516. doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2023.24407.
23. *Kaplan Ş, Alpaycı M, Karaman E, Çetin O, Özkan Y, İler S, et al.* Short-Term Effects of Kinesio Taping in Women With Pregnancy-Related Low Back Pain: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Med Sci Monit*. 2016;22:1297-1301. doi: 10.12659/msm.898353.
24. *Capelli I, Pizza F, Ruggeri M, Gasperoni L, Carretta E, Donati G, et al.* Time Evolution of Restless Legs Syndrome in Haemodialysis Patients. *Clin Kidney J*. 2021;14(1):341-347. doi: 10.1093/ckj/sfz148.
25. *Ghasemi M, Rejeh N, Bahrami T, Heravi-Karimooi M, Tadrisi SD, Vaismoradi M.* Aromatherapy Massage vs. Foot Reflexology on the Severity of Restless Legs Syndrome in Female Patients Undergoing Hemodialysis. *Geriatrics*. 2021;6(4):99. doi: 10.3390/geriatrics6040099.

## ВИМОГИ ДО РОБІТ, ЩО ПОДАЮТЬСЯ ДО ПУБЛІКАЦІЇ В “УКРАЇНСЬКИЙ ЖУРНАЛ НЕФРОЛОГІЇ ТА ДІАЛІЗУ”

У зв'язку з індексуванням журналу міжнародними пошуковими системами та підвищенням вимог до оформлення наукового матеріалу, редколегія формалізує вимоги до видання для ефективного розповсюдження матеріалів у світовій мережі Інтернет та приєднання до міжнародних наукових баз даних.

Правила для авторів складені відповідно до «Єдиних вимог до рукописів, що подаються у біомедичні журнали» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), які сформульовані Міжнародним комітетом редакторів медичних журналів (International Committee of Medical Journal Editors) та містяться на ресурсі ICMJE.org.

### ЖУРНАЛ СТРУКТУРОВАНО ЗА 5 ОСНОВНИМИ РОЗДІЛАМИ:

1. Точка зору
2. Проблеми організації та економіки нефрологічної допомоги
3. Оригінальні наукові роботи
4. Школа нефролога
5. Редакційна інформація, інформація про наукові форуми, коментарі, рецензії, знаменні дати.

Перший розділ. В цьому розділі друкуються статті, які відображають точку зору на конкретну проблему автора чи авторів.

Другий розділ висвітлює можливі шляхи покращення організаційної складової діяльності нефрологічної служби в Україні на всіх етапах надання спеціалізованої медичної допомоги та її економічний аналіз.

У третьому розділі розміщуються статті, які знайомлять з результатами оригінальних досліджень.

Розділ “Школа нефролога” друкує роботи, метою яких є підвищення нефрологічної грамотності читачів.

Останній розділ інформує про основні науково-практичні події, публікує рецензії, редакційну інформацію і т.п.

**Рукопис разом з дозволом на його використання направляється до редакції тільки в електронному варіанті через он-лайн систему, яка міститься на сайті журналу. У редакції здійснюється двостороннє сліпе (анонімність рецензента та автора) наукове рецензування і літературне редагування статей.**

**Дозвіл на використання рукопису можна завантажити за посиланням**

Статті, оформлені без додержання правил не приймаються, авторам не повертаються.

У разі негативної наукової рецензії, статті не публікуються, авторам ел. поштою надсилається відгук з можливістю доопрацювання статті чи заміни її іншим матеріалом.

До публікації приймаються оригінальні роботи, огляди літератури, лекції, короткі повідомлення, рекомендації практичним лікарям, опис випадків з практики, інформація про наукові форуми.

Редакція не приймає раніше опубліковані роботи або статті, прийняті до друку в інших виданнях.

Статті публікуються українською, російською та англійською мовами. Файл зі статтею представляти у форматі Microsoft Word (розширення \*.doc, \*.docx, \*.rtf).

### ПОСЛІДОВНІСТЬ РОЗМІЩЕННЯ МАТЕРІАЛУ НАСТУПНА:

1. Ініціали та прізвища авторів англійською мовою;
2. Назва статті англійською мовою;
3. Назва установи та організації, в якій працюють автори англійською мовою;
4. Резюме статті англійською мовою;
5. Ключові слова (8-10 слів чи словосполучень, що розкривають зміст статті) англійською мовою;
6. УДК;
7. Ініціали та прізвища авторів мовою, якою написана стаття;
8. Назва статті (мовою оригіналу);
9. Назва установи та організації, в якій працюють автори, місто (мовою статті);
10. Ключові слова (8-10 слів чи словосполучень, що розкривають зміст статті) мовою статті;
11. Резюме мовою статті;
12. Текст статті;
13. Розкриття потенційних конфліктів інтересів;
14. Інформація про внесок кожного учасника;
15. Список використаних джерел під назвою «Література (References)», оформлений відповідно до стандарту Vancouver style;
16. Відомості про відповідального автора: ПІБ, наукове звання, посада та місце роботи; e-mail (обов'язково) та робочий телефон.

**Формат тексту рукопису.** Текст статті друкується шрифтом Times New Roman, розмір 14 pt, з полуторним міжрядковим інтервалом. Відступи з кожного боку сторінки 2 см. На всі ілюстрації, графіки і таблиці мають бути посилання в тексті.

Виділення в тексті можна робити курсивом або напівжирним шрифтом, НЕ підкресленням. З тексту слід видалити всі перенесення, повторювані пропуски, зайві розриви рядків (в автоматичному режимі через сервіс Microsoft Word “знайти і замінити”).

Файл з текстом статті містить всю інформацію для публікації, у тому числі рисунки і таблиці після їх першого згадування.

**Структура рукопису** має відповідати наведеному шаблону (залежно від типу роботи).

УДК розміщується у верхньому лівому куті.

**Автори.** Прізвище авторів вказувати після ініціалів (**О. С. Іванов, С. І. Петров**), жирним шрифтом, мовою оригіналу та англійською мовою, вирівнювання за центром. ПІБ авторів англійською необхідно вказувати відповідно з закордонним паспортом, або як в раніше опублікованих зарубіжних журнальних статтях. Авторі, які публікуються вперше і не мають закордонного паспорта, мають скористатися стандартом транслітерації КМУ—2010.

Багато додати посилання на власні офіційні інтернет сторінки автора(ів) (<https://.....>), Scopus ID, Researcher ID або ORCID ID для розміщення гіперпосилання на сайті журналу та pdf-версії статті.

**Назва статті** англійською мовою та мовою оригіналу розміщується за центром після прізвищ авторів жирним шрифтом («**Оцінка резидуальної функції нирок у хворих на ХХН VД СТ. та підходи до її збереження**»). Англійська назва має бути грамотною з точки зору англійської мови та повністю відповідати україно/російськомовній назві за змістом.

**Установа.** Необхідно наводити офіційну повну назву установи (без скорочень). Після назви установи через кому зазначити назву міста та країни. Якщо у дослідженні брали участь автори з різних установ, слід співвіднести назви установ і прізвища авторів за допомогою цифрових індексів у верхньому реєстрі. Під назвою необхідно додати інтернет адресу (<https://.....>) офіційної сторінки установи.

**Реферат** (якщо робота оригінальна) має бути структурованим: мета, матеріали і методи, результати, висновки. Реферат має повністю відповідати змісту роботи, **обсяг тексту не менше 1 800 знаків** (з пропусками). Резюме до публікацій, що подаються в інші розділи журналу (1,2,4,5) оформляється довільно, але з таким самим обсягом.

Англійська версія резюме статті за змістом і структурою (Aim, Methods, Results, Conclusions) повністю відповідає україно/російськомовній.

**Ключові слова.** Необхідно вказати ключові слова — від 3 до 10 для індексування статті в пошукових системах. Ключові слова повністю відповідають українською/російською та англійською мовою. Для вибору ключових слів англійською використовують тезаурус Національної медичної бібліотеки США (Medical Subject Headings — MeSH).

**Текст статті** (українською або російською мовою) структурований за розділами: вступ (актуальність), мета, матеріали і методи, результати, обговорення, висновки.

**Розділ «Обговорення» є обов'язковим та має включати 3000–3500 знаків без пробілів.**

#### **Розкриття потенційних конфліктів інтересів**

Автори повинні розкривати всі відносини або інтереси, які можуть мати прямий або потенційний вплив чи надати упередженість в роботі. Хоча автор, можливо, не відчуває, що існує який-небудь конфлікт, розкриття відносин і інтересів забезпечує більш повний і прозорий процес, що призводить до точної і об'єктивної оцінки роботи.

Усвідомлення реального або передбачуваного конфлікту інтересів — це перспектива, на яку мають право читачі. Це не означає, що фінансові відносини з організацією, яка спонсорувала дослідження або компенсацію, отриману за консультаційну роботу є недоречними.

Приклади потенційних конфліктів інтересів, які прямо або побічно пов'язані з дослідженням, можуть включати, але не обмежуються наступним:

- Наукові гранти від фінансових агентств (прохання надати дані про спонсора дослідження та номер гранту)
- Гонорари за виступи на симпозиумах
- Фінансова підтримка участі в симпозиумах
- Фінансова підтримка освітніх програм
- Зайнятість або консультації
- Підтримка з боку спонсора проекту
- Посада в консультативній раді або раді директорів або в інших відносинах управління
- Кілька філій
- Фінансові відносини, наприклад, пайову участь або інвестиційний інтерес
- Права інтелектуальної власності (наприклад, патенти, авторські права і роялті від таких прав)
- Утримання чоловіка і / або дітей, які можуть мати фінансовий інтерес до роботи

Крім того, слід розкривати інтереси, що виходять за рамки фінансових інтересів і компенсації (нефінансові інтереси), які можуть бути важливі для читачів. Вони можуть включати, але не обмежуються, особисті відносини або конкуруючі інтереси, прямо або побічно пов'язані з цим дослідженням, або професійні інтереси або особисті переконання, які можуть вплинути на ваше дослідження.

Відповідальний автор збирає форми розкриття конфлікту інтересів від усіх авторів. В авторській співпраці, де допускаються формальні угоди про представництво, для відповідного учасника досить підписати форму розкриття від імені всіх авторів.

#### **Приклади розкриття інформації**

Дослідження фінансувалося X (грант № X).

Конфлікт інтересів: автор А отримав дослідні гранти від компанії А. Автор В отримав гонорар доповідача від компанії X і володіє акціями в компанії Y. Автор С є членом комітету Z.

Конфлікт інтересів: автори заявляють, що у них немає конфлікту інтересів.

**Подяка.** Авторі можуть висловити подяку особам та організаціям, що сприяли публікації статті, але не є її авторами.

Інформація про внесок кожного учасника (і осіб, зазначених у розділі “подяка”).

**Приклад:** О.С. Іванов — концепція та дизайн дослідження, І.П. Петров — аналіз отриманих даних, оформлення тексту роботи.

Автори висловлюють подяку (Прізвище І. Б.) за оформлення ілюстрацій.

**Список літератури.** У бібліографії (пристатейному списку літератури) кожне джерело зазначають з нового рядка під порядковим номером. Вимоги до оформ-

лення літературних джерел за Vancouver style детально представлено на сайті журналу. **Після кожного джерела ОBOB'ЯЗКОВИМ є додавання його інтернет адреси** (<https://ukrjnd.com.ua/index.php/journal/article/view/22>).

Перед відправкою автори мають здійснити **самоперевірку тексту наукової статті** на:

1. **Плагіат.** Україно та російськомовні тексти статті перевіряють на плагіат за допомогою програми eTXT Антиплагиат <https://www.etxt.ru/antiplagiat>, що є необхідною умовою для передачі статті для подальшого рецензування. Рівень індивідуальності дослідження має бути не нижчий 80%.
2. Науковий стиль викладення матеріалу.
3. Тавтологію – повторювання у тексті.
4. Універсальність викладення матеріалу (читабельність). Текст статті має легко та просто сприйматися, не бути переобтяженим аббревіатурами, спеціальною вузькопрофільною термінологією або такою, що не набула міжнародної адаптації. Речення мають бути простими, лаконічними і нести завершений зміст.
5. Кількість посилань на статті та наукові матеріали з ідентифікатором DOI (не менше 80 %).
6. Відповідність вимогам видання.

### **ПОМИЛКИ, ЩО НАЙЧАСТІШЕ ВИНΙΚЮТЬ У ПОДАНИХ РУКОПИСАХ:**

1. Використовують у реченнях «зайві» слова і вирази. Усього зайвого треба уникати. Керуйтеся правилом: «Якщо слово з речення можна викинути і при цьому зміст не втрачено – слово треба викинути». Це саме стосується і більших за обсягом фрагментів тексту.
2. Не вірно вказують одиниці виміру. Системні одиниці виміру системи СІ наводять без крапки (м, г, га, моль), а нестандартизовані одиниці – за скороченнями.

3. Треба розрізняти символи «—», «-» та «-». Перший із них у рукописах не використовують.
4. Більшість редакторських правок обумовлені невірним вживанням слів «в», «у», «і», «та», «з», «із», «зі».
5. У статтях не використовують вирази «на протязі» – заміняємо «протягом», «найбільш потужний» – «найпотужніший», «при» – «у разі» і т. п.
6. Зайве використання слова «було». Треба уникати слова «було»: без нього, зазвичай, зміст речення не зміниться.
7. Скорочення наукових термінів у статті треба звести до мінімуму.
8. Назви таблиць і рисунків (та примітки до них) повинні бути «вичерпними». Читач не повинен додатково перечитувати «Матеріал і методи досліджень» або назву роботи, щоб розібратися у змісті таблиці чи рисунка.
9. Статті найчастіше відхиляються редколегією через відсутність статистичного опрацювання первинних даних (загальні вимоги до фахових публікацій).
10. Не рекомендовано вживати в тексті пасивний залог: «проби відбиралися», замість цього – «проби відбирали»; «дослідження здійснювалися» – «дослідження здійснили».
11. Якщо виникають питання щодо оформлення чи представлення певних даних у статті – можна брати зразок останнього номеру журналу.
12. Відсутня можливість редагування рисунків, таблиць, формул, наведених у роботі. Необхідно надати редакції змогу їх редагувати, тобто не використовувати нестандартні програми.

**Статті, оформлені без додержання правил не приймаються, авторам не повертаються.**

**У разі негативної наукової рецензії, статті не публікуються, авторам ел. поштою надсилається відгук з можливістю доопрацювання статті чи заміни її іншим матеріалом.**