

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів  
Кафедра біохімії та біотехнології**

**Клініко-біохімічні особливості ураження печінки у дітей з  
ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

**Дипломна робота  
освітнього рівня «Бакалавр»**

Виконала: студентка IV курсу, групи 400  
напряму підготовки 091.6 – «Біологія»

**Дорош Е. І.**

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О.В.

До захисту допущено:  
Протокол засідання кафедри № \_\_\_\_  
від „\_\_” \_\_\_\_\_ 2023 р.

зав. кафедри \_\_\_\_\_ проф. Копильчук Г.П.

## АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів функціонального стану органів гепатобіліарної системи в сироватці крові – ензимних активностей аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ), показника тимолової проби, а також рівня загального білірубіну та його фракцій у сироватці крові дітей віком до трьох років з ротавірусною інфекцією.

Показано, що у дітей з ротавірусною інфекцією спостерігається підвищення рівня ензимних активностей АЛТ та АСТ в сироватці крові за умов середньотяжкої та тяжкої форм захворювання. При легкій формі ротавірусної інфекції статистично достовірної різниці активностей амінотрансфераз у сироватці крові порівняно з показниками норми не виявлено.

Встановлено підвищення рівня загального білірубіну та його фракцій у сироватці крові при середньотяжкій і тяжкій формах ротавірусної інфекції у дітей. При чому рівень загального білірубіну більшою мірою підвищується за рахунок фракції непрямого білірубіну. Виявлене підвищення показника тимолової проби у сироватці крові пацієнтів з тяжкою формою ротавірусної інфекції може вказувати на порушення білково-синтетичної функції печінки в умовах досліджуваної патології.

## ЗМІСТ

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ                                                                    | 4  |
| ВСТУП                                                                                                     | 5  |
| 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ                                                                                       | 7  |
| <b>1.1. Патогенетичні зміни та класифікація ротавірусної інфекції</b>                                     | 7  |
| <b>1.2. Структурно-функціональна характеристика трансаміназ як маркерів стану гепатобіліарної системи</b> | 10 |
| <b>1.3. Метаболізм білірубіну в організмі</b>                                                             | 13 |
| 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ                                                                         | 17 |
| <b>2.1. Об'єкт та методи досліджень</b>                                                                   | 17 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ                                                                | 24 |
| ВИСНОВКИ                                                                                                  | 32 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ                                                                                | 33 |
| ДОДАТКИ                                                                                                   | 37 |

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ**

2,4-ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідразин

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

ІФА – імуноферментний аналіз

УДФ-ГТ – уридиндифосфоглюкуронілтрансфераза

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

## ВСТУП

Ротавірусна інфекція відноситься до гострого інфекційного захворювання, збудником якого є ротавірус. Ця патологія характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту на кшталт гастроентериту з розвитком синдрому дегідратації (зневоднення). Збудником захворювання виступає вірус родини Reoviridae, роду Rotavirus. Основна небезпека ротавірусів – це стійкість до впливу факторів навколишнього середовища, оскільки вірус поширюється через питну воду, відкриті водойми, знаходиться у стічних водах, де ці мікроорганізми зберігають життєздатність до кількох місяців. На поверхні овочів і фруктів вірус стійкий до 30 днів [1].

На ротавірусний гастроентерит хворіють люди будь-якого віку, але найбільше ця патологія відзначається у дітей перших трьох років життя, людей похилого віку та в осіб з порушенням функціонування імунної системи [2].

Ротавіруси проникають всередину епітелію слизової оболонки дванадцятипалої кишки та у верхні відділи тонкої кишки. Розмноження та накопичення вірусу призводить до загибелі зрілих епітеліоцитів кишечника та їх відторгнення. У результаті порушується абсорбція вуглеводів та простих цукрів, і вони накопичуються у надмірній кількості. У просвіті кишечника підвищується осмотичний тиск, порушується всмоктування води та електролітів, що сприяє виникненню діареї. Утворення великої кількості органічних кислот, водню, вуглекислого газу в процесі ферментації нерозщеплених дисахаридів кишковою мікрофлорою веде до підвищення газоутворення у кишечнику [3].

У дітей з імунними порушеннями ротавірус може спричинити розвиток пневмонії, екзантеми, гепатиту, нефриту, енцефаліту з високим ризиком летального результату [4].

Оскільки ротавірусна інфекція здатна давати безліч ускладнень на різні органи, у тому числі і на органи гепатобіліарної системи, то знання змін біохімічних маркерів функціонального стану цієї системи допоможе на

ранніх стадіях розвитку цієї інфекції попередити ускладнення, частина з яких становить загрозу життю пацієнта, особливо при різних ступенях тяжкості захворювання.

Враховуючи вище вказане *метою роботи* було оцінити особливості змін біохімічних маркерів функціонування органів гепатобіліарної системи у дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості.

У зв'язку з цим поставлені наступні завдання:

1. Визначити ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) в сироватці крові дітей за умов ротавірусної інфекції.
2. Визначити рівень загального і прямого білірубіну в сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості.
3. Оцінити білково-синтетичну функцію печінки за виначенням тимолової проби в сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Патогенетичні зміни та класифікація ротавірусної інфекції

Ротавірусна інфекція у дітей – це гостре інфекційне захворювання кишкової групи, що викликається однойменним збудником (ротавірусом). Проникаючи в організм, цей вірус сприяє пошкодженню шлунково-кишкового тракту (ШКТ), провокуючи діарею, багаторазове блювання й інші характерні симптоми. Свою назву захворювання отримало через зовнішній вигляд патогену, який під мікроскопом нагадує колесо (rota – «колесо»). Багато пацієнтів помилково називають цю патологію кишковим грипом, хоча віруси грипу вражають дихальні шляхи, а ротавірус живе у ШКТ [2].

Ротавірусна інфекція – найпоширеніше інфекційне захворювання шлунково-кишкової системи у дитячому віці. Найбільш сприйнятливі до вірусу діти до 3 років, у яких імунний захист ще сформований не повністю. Для них же інфекція і становить найбільшу небезпеку: багаторазове блювання, діарея, висока температура призводять до патологічних втрат вологи та солей. В результаті розвивається зневоднення, яке за відсутності грамотної допомоги може призвести до незворотних неврологічних порушень, пошкодження інших систем і органів, і навіть смерті [5].

Оцінкою симптомів, діагностикою та лікуванням ротавірусної інфекції у дітей займаються гастроентерологи, педіатри, інфекціоністи.

Переважна кількість випадків захворювання посідає дітей віком від 6 місяців до 2 років. Відмінностей у сприйнятливості у хлопчиків і дівчаток немає: усі хворіють з однаковою частотою та симптоматикою. Специфічного імунітету після перенесеної ротавірусної інфекції не виробляється, тому захворіти дитина може ще не один раз [4].

Основне джерело та резервуар ротавірусної інфекції – хвора людина наприкінці інкубаційного періоду та у перші дні хвороби, що виділяє вірус з фекаліями, а також інші вірусоносії. Основний механізм передачі збудника – фекально-оральний. Проте, вірус найчастіше передається наступними шляхами – водяний (при вживанні води, в якій присутні віруси); контактно-

побутовий (через брудні руки та предмети побуту); харчовий (найчастіше при вживанні молока, молочних продуктів); рідше – повітряно-краплинний шлях [6].

Класифікація захворювання проводиться за формою інфекції, за тяжкістю перебігу, за характером перебігу тощо [7].

Форми ротавірусної інфекції: 1) типова (гастрит, гастроентерит, ентерит); 2) атипова (стерта, безсимптомна); 3) вірусоносійство.

За тяжкістю перебігу: легка; середньотяжка; тяжка.

За характером перебігу: без загострення; з загостреннями та рецидивами.

За тривалістю та результатом: гостра (до 1 місяця); затяжна (до 3 місяців); хронічна (понад 3 місяці).

Спостерігається зимово-весняна сезонність захворювання, проте спорадичні випадки захворювання реєструються протягом усього року [4].

Інкубаційний період ротавірусної інфекції становить від 14 години до 7 днів (в середньому 1-4 дні). Захворювання найчастіше починається гостро з підвищення температури тіла від субфебрильних до фебрильних значень, з'являються симптоми інтоксикації (млявість, слабкість, зниження апетиту), діарея та повторне блювання [8].

Кишкова дисфункція характеризується рідким, водянистим, пінистим випорожненням жовтого кольору без патологічних домішок. При рясному рідкому стуглі розвивається зневоднення. У важких випадках можливе зменшення кількості сечі до повної її відсутності, зниження артеріального тиску [6].

Протягом 3-6 днів можуть бути помірні або сильні переймоподібні або постійні болі у верхній половині живота. У дітей молодшого віку на початку захворювання можуть спостерігатися катаральні явища, що передують дисфункції кишечника: покашлювання, нежить або закладеність носа, рідко – кон'юнктивіт, катаральний отит. У дітей раннього віку на тлі високої



температури можуть розвинути генералізовані судоми, що супроводжуються втратою свідомості [8].

Для легких форм ротавірусної інфекції характерні такі симптоми: помірна інтоксикація протягом 1-2 днів; температура тіла 37,1-38,0 ° С; нечасті блювання; рідке випорожнення до 5-10 разів на добу [9].

При середньотяжких формах захворювання спостерігаються такі симптоми: виражена інтоксикація; температура тіла 38,0-39,0 ° С; повторне блювання протягом 1,5-2 днів; випорожнення від 10 до 20 разів на добу; зневоднення I-II ступеня [7].

Тяжка форма ротавірусного гастроентериту характеризується: бурхливим початком; значними втратами рідини (зневоднення II-III ступеня), багаторазовим блюванням; випорожненням понад 20 разів на добу; зниженням артеріального тиску [10].

Типовий ротавірусний гастроентерит характеризується доброякісним циклічним перебігом, наявністю специфічних ознак захворювання, а також виявленням збудника у фекаліях.

До атипових форм ротавірусного гастроентериту відносяться: стерта і субклінічна форми зі слабо вираженими і симптомами, які швидко проходять; безсимптомна форма з відсутністю клінічних ознак хвороби, але з наростанням титрів специфічних антитіл у крові; носійство ротавірусів після перенесеного гострого ротавірусного гастроентериту, у здорових осіб у вогнищах з інфекційною діареєю; хронічна форма, що зберігається понад 3 місяці [9].

Отже, ротавірусна інфекція здатна давати безліч ускладнень, частина яких становить загрозу життю пацієнта [4, 8]:

- зниження артеріального тиску;
- гіповолемічний шок – стан, обумовлений швидким зменшенням об'єму циркулюючої крові і що проявляється зниженням артеріального тиску, тахікардією, спрагою, нудотою, запамороченнями, втратою свідомості та блідістю шкіри;

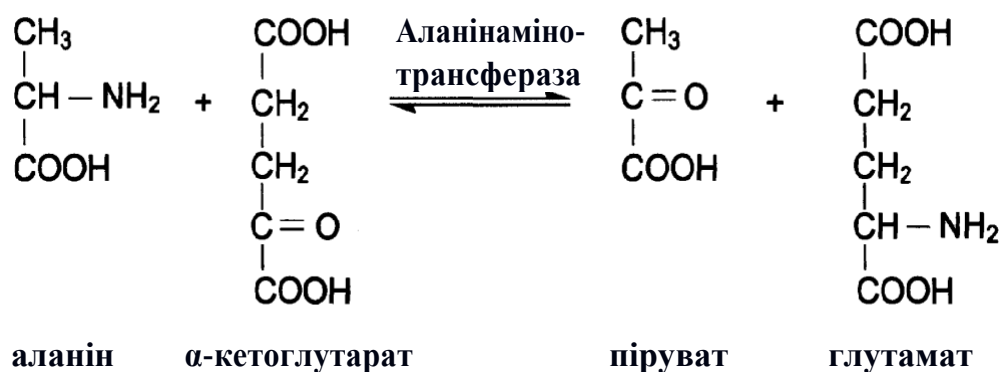
- проявляється гостра серцево-судинна недостатність – стан, спричинений порушенням функції серця;
- гостра ниркова недостатність – раптове порушення функції нирок, що веде до розладу водного, електролітного, азотистого та інших видів обміну;
- вторинна дисахаридазна недостатність – непереносимість вуглеводів через недостатність ферментів (лактази, сахарази, мальтази, трекалази);
- кардіоміопатія – це захворювання міокарда, що виявляється збільшенням розмірів серця та/або серцевою недостатністю;
- дисбактеріоз кишківника – порушення складу мікрофлори кишківника;
- інтоксикація організму, що може супроводжуватися дисфункціонуванням органів гепатобіліарної системи.

## **1.2. Структурно-функціональна характеристика трансаміназ як маркерів стану гепатобіліарної системи**

Амінотрансфери в організмі каталізують реакції трансамінування – перенесення аміногруп з амінокислот на кетокислоти. Посередником у цих процесах є піридоксальфосфат (вітамін В<sub>6</sub>), який є складовою частиною активного центру амінотрансфераз. Реакції трансамінування в організмі є зворотніми та можуть відбуватися в обох напрямках. Це процес залежить від співвідношення концентрацій компонентів, які беруть участь у реакціях і необхідності в цих компонентах. Специфічній дії амінотрансфераз піддаються всі амінокислоти, окрім лізину і треоніну [11].

Дві амінотрансфери – це аланінамінотрансфераза (АСТ) й аспартатамінотрансфераза (АСТ) мають найбільше клініко-діагностичне значення.

*Аланінаміотрансфераза* (АЛТ, КФ.2.6.1.2) – це ензим, який каталізує реакцію трансамінування між амінокислотою аланіном і  $\alpha$ -кетоглутаратом, у якій утворюється амінокислота глутамат і піруват. Переамінування відбувається в присутності похідного вітаміну В<sub>6</sub> – це кофермента піридоксальфосфату. Під час оберненого проходження реакції – при взаємодії глутамату і пірувату знову утворюється амінокислота аланін і  $\alpha$ -кетокислота –  $\alpha$ -кетоглутарат (рис.1.1) [12].

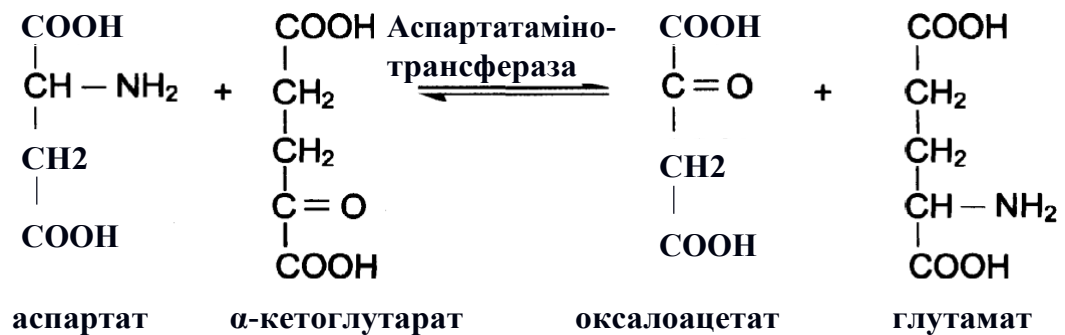


**Рис.1.1. Рівняння реакції, яка каталізується аланінаміотрансферазою**

АЛТ локалізується внутрішньоклітинно, тому вміст цього ензиму в сироватці крові здорової людини незначний. АЛТ – це в основному цитоплазматичний ензим, який належить до індикаторних ензимів, оскільки у значній кількості локалізований у клітинах печінки. Підвищення активності цього ензиму в сироватці крові вказує на пошкодження гепатоцитів і може свідчити про запальну природу захворювання органів гепатобіліарної системи, одним із яких є печінка [13].

Із великої групи піридоксальних ферментів найкраще вивчена *аспартатаміотрансфераза* (АСТ, КФ.2.6.1.1) – це ензим, який каталізує реакцію переамінування між амінокислотою аспартатом і кетокислотою  $\alpha$ -кетоглутаратом. У цій реакції амінокислота (аспартат), яка у процесі реакції втрачає свою аміногрупу (NH<sub>2</sub>), трансформується в оксалоацетат.

Аміногрупа приєднується до  $\alpha$ -кетоглутарату, який у процесі реакції перетворюється в глутамат (рис.1.2) [14, 15].



**Рис.1.2. Рівняння реакції, яка каталізується аспаратамінотрансферазою**

При зворотньому проходженні хід реакції відбувається утворення  $\alpha$ -кетоглутарату й амінокислоти аспартату під час взаємодії оксалоацетату і глутамату [15].

В організмі людини АСТ має дві ізоформи – мітохондріальна і цитозольна, які локалізовані у відповідних компартментах клітини. Обидві ці ізоформи АСТ являють собою димер, який складається з ідентичних поліпептидних ланцюгів, кожний з яких містить біля 400 амінокислотних залишків. У вторинній структурі молекули АСТ розрізняють високий вміст  $\alpha$ -спіралей. У відсотковому відношенні на долю  $\alpha$ -спіралей припадає 47%, на  $\beta$ -шари – 13 % і реверсивні повтори – 9 % амінокислотних залишків [16].

Субодиницю аспаратамінотрансферази умовно розділяють на два домени – малий домен і великий домен, а також перехідні ділянки між ними.

У молекулі АСТ локалізовано два активні центри, які незалежні один від одного у процесі проходження реакції (функціонально). Обидва центри у молекулі АСТ локалізовані в глибоких впадинах, які знаходяться на протилежних сторонах молекули, тобто на межі між субодиницями. Периферійна частина кожного активного центра утворена великим і малим доменом однієї субодиниці, окрім того сюди входить і край великого домена

суміжної субодиниці. Початок (вхід) активного центру ензиму частково прикритий  $\text{NH}_2$ -кінцевою ділянкою ланцюга. Активний центр містить амінокислотні залишки з обох субодиниць молекули ензиму. Тому, у мономера відсутня каталітична активність [17].

Отже, підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові може бути наслідком розвитку в організмі пошкодження клітин печінки різного походження (хронічний гепатит, цироз печінки, гострий вірусний гепатит, ендогенна інтоксикація організму, пухлини печінки, алкогольна інтоксикація, прийом деяких гепатотоксичних лікарських препаратів).

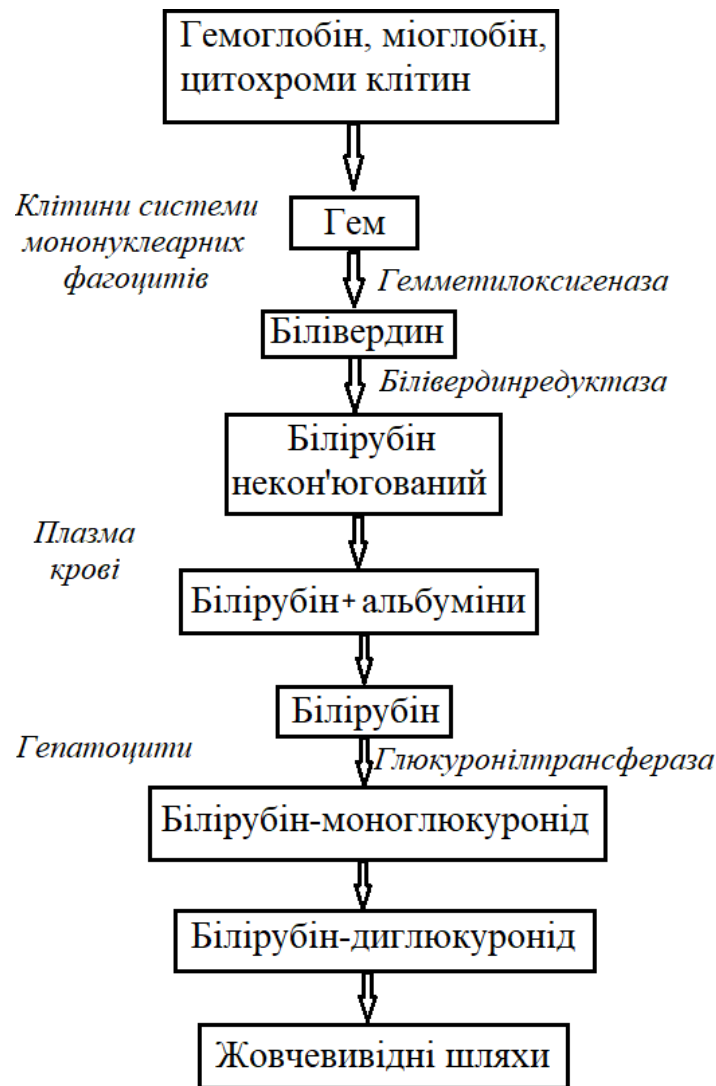
Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові, особливо АСТ також може бути результатом гострого інфаркту міокарда, гострого міокардиту, некрозу скелетних м'язів, гемолізу еритроцитів [16]. Тому, у клініко-лабораторних дослідженнях велике значення має визначення співвідношення активностей АСТ/АЛТ у крові (коефіцієнт де Рітіса).

Отже, трансамінази беруть участь в обміні амінокислот, але їхні функції можуть відрізнятися залежно від типу тканини.

### **1.3. Метаболізм білірубіну в організмі**

Білірубін – це жовтий пігмент, який утворюється після розпаду гемопротеїнів. Вільний гемоглобін при попаданні в плазму крові транспортується в комплексі з гаптоглобіном, який використовується як субстрат ензимом гем- $\alpha$ -метінілоксигеназою [18].

Під її впливом відбувається розрив метинового містка, виділяється СО (карбонмонооксид) та утворюється вердохромальдегідоглобін. Сполука нестійка і розпадається з відщепленням іонів заліза та білкової частини, яка остаточно гідролізується. Під впливом білівердинредуктази за участю відновленого НАДФ синтезується білівердин, що перетворюється на білірубін (рис.1.3) [19].



**Рис.1.3. Схема метаболізму білірубину в організмі**

У фізіологічних умовах в організмі людини (масою 70 кг) за добу утворюється близько 250-300 мг білірубину. До того ж 70-80% його загальної кількості виходить при розпаді гемоглобіну; 10-20% є продуктами розпаду інших гемопротеїнів [20].

Так як білірубін є кінцевим продуктом розпаду гема, то він виводиться з організму. Місцем утворення цієї амфіфільної сполуки найчастіше слугує кістковий мозок, йому потрібна допомога у транспорті до органів видільної системи [21]

Щоб забезпечити розчинність білірубину в плазмі, з ним зв'язуються альбуміни. При зниженні рН (гіперкетонемії, гіперлактацидемії)

спорідненість білків до білірубіну зменшується. У подібних умовах жовчний пігмент може комплексуватися з ліпідами плазми, плазмолемі, з колагеном матриксу. Використання у фізіологічних умовах альбумінів з метою транспорту білірубіну необхідне ще й тому, що останній, будучи амфіфілом, легко долає цитоплазматичні мембрани та мембрани органел [20].

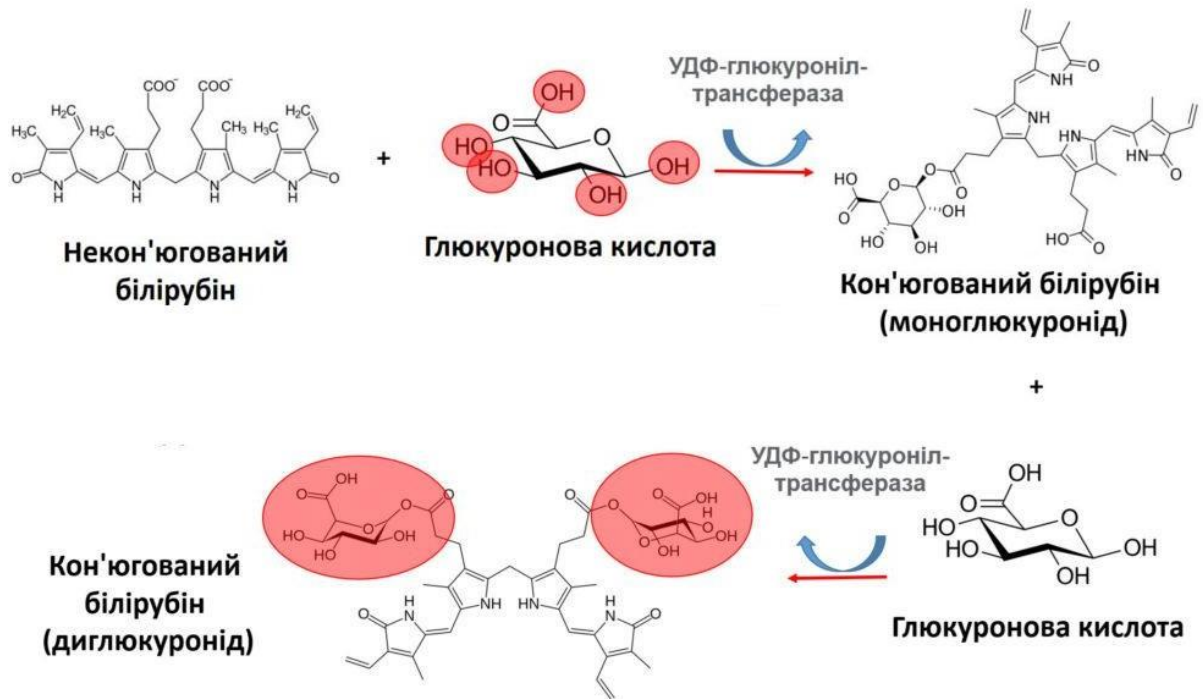
Потрапляючи в мітохондрії, він здатний втручатися в енергетичні процеси, що відбуваються в них, впливаючи на біологічне окислення і окисне фосфорилування, тим самим білірубін пошкоджує динаміку енергетичного ресурсу. Тому, щоб запобігти потенційному токсичному впливу цього жовчного пігменту, він потрапляє у печінку у зв'язаному з альбумінами вигляді [22].

Печінка людини виконує в обміні білірубіну три найважливіші функції: захоплення його з крові гепатоцитом; з'єднання з глюкуроною кислотою; виділення кон'югованої фракції в жовчні капіляри [21].

Білірубін виходить з центрів зв'язування з альбуміном і взаємодіє зі специфічними білками-транспортерами – Y, Z-протеїнами (лігандинами), які і доставляють його в гладкий ендоплазматичний ретикулум, де білірубін за дії уридиндифосфоглюкуронілтрансфери (УДФ-ГТ) кон'югується. Процес протікає у дві стадії: спочатку утворюється білірубінмоноглюкуронід, потім – білірубіндиглюкуронід (рис.1.4) [23].

Утворений пігмент добре розчиняється у воді, і не токсичний. Підходячи до жовчного полюса гепатоциту, кон'югований з глюкуроною кислотою білірубін виходить із клітини за допомогою складної системи активного транспорту (з використанням енергії АТФ та різних білків-переносників) [24].

Потрапляючи в жовчні капіляри, прямий білірубін у складі жовчі спрямовується через фатерів сосочок у тонку кишку, де піддається дії мікробної бета-глюкуронідази, яка гідролізує його до вільної форми, а потім під впливом специфічної бактеріальної редуктази, він відновлюється [25].



**Рис.1.4. Кон'югація білірубіну в печінці**

З метою діагностики патології вивчають спектр показників пігментного обміну. У плазмі здорових людей загальний вміст білірубіну коливається в межах 8 – 20 мкмоль/л. Зазвичай переважає так звана вільна форма – «непрямий білірубін». У здорової людини на частку вільної фракції припадає щонайменше 75% від її загальної кількості. Чверть, що залишилася, становить кон'югований білірубін – "прямий білірубін" [26].

При перешкодах виходу жовчі у дванадцятипалу кишку в крові підвищується рівень прямого білірубіну, що нерідко є ознакою обтураційної жовтяниці. Це єдина фракція білірубіну, яка здатна виділятися нирками та забарвлювати сечу [23].

Збільшення білірубіну як за рахунок прямої, так і непрямой фракції свідчить про захворювання печінки. Некон'югований білірубін володіє токсичною дією [24].

Отже, визначення рівня прямого або непрямого білірубіну в крові може вказувати на стан органів гепатобіліарної системи.



## **2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **2.1. Об'єкт та методи досліджень**

У роботі проведено аналіз лабораторних результатів дослідження 19 пацієнтів з діагнозом ротавірусної інфекції. Усі пацієнти були діти віком від 1 до 3 років, які проходили стаціонарне лікування на базі інфекційного відділення.

Комплекс обстеження дітей перед лікуванням та у процесі лікування включав клінічні (пальпація, перкусія, огляд та аускультация) і лабораторні (загальний аналіз крові з визначенням печінкових проб) методи обстеження.

Клінічними ознаками ротавірусної інфекції було поєднання ураження ШКТ та симптомів інтоксикації, розвиток зневоднення, що мало велике значення у діагностиці захворювання.

Діагностику ротавірусної інфекції проводили з використанням методів, які засновані на виявленні ротавіруса та його антигенів у фекаліях (електронна та імуноелектронна мікроскопія, імуноферментний аналіз (ІФА)); для виявлення вірусної РНК у копрофільтратах використовували метод молекулярних зондів – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та гібридизації; для виявлення специфічних антитіл до ротавірусів у сироватці крові використовували метод ІФА.

Для точної постановки діагнозу та своєчасного початку терапії також враховувалися причини захворювання, визначалися джерела інфікування та можливі шляхи передачі інфекції. Проводилися відповідні профілактичні заходи у вогнищах гострої кишкової інфекції.

Для остаточного діагнозу ротавірусної інфекції проводилося лабораторне підтвердження. При підозрі на ураження органів та їх систем проводять додаткові інструментальні дослідження: оглядовий рентген органів грудної клітки; ультразвукове дослідження органів черевної порожнини.

За клінічними та лабораторними результатами дослідження визначався ступінь тяжкості ротавірусної інфекції – легкий, середньотяжкий, тяжкий.

У залежності від ступеня тяжкості ротавірусної інфекції усіх пацієнтів розділили на три групи:

I група – 6 дітей віком від 1 до 3 років з ротавірусною інфекцією легкого ступеня тяжкості;

II група – 7 дітей віком від 1 до 3 років з ротавірусною інфекцією середнього ступеня тяжкості;

III група – 6 дітей віком від 1 до 3 років з тяжкою формою ротавірусної інфекції.

Всі пацієнти отримували патогенетичну і симптоматичну терапію. При всіх формах тяжкості захворювання хворі діти отримували жарознижувальні засоби, базисну терапію, вітамінотерапію тощо.

Для лабораторного дослідження біохімічних показників використовували сироватку крові (свіжу та вільну від домішок). Кров відбирали до лікування під час надходження хворих у стаціонар.

Під час біохімічного аналізу крові проводили визначення ензимних активностей АЛТ і АСТ, вміст загального та прямого білірубіну та показники тимолової проби.

### **Визначення ензимної активності аланінамінотрансферази в сироватці крові**

*Принцип методу:* аланінамінотрансфераза каталізує реакцію переамінування, внаслідок якої утворюються глутамат і піруват. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ) утворюється забарвлена сполука в лужному середовищі – гідразон піровиноградної кислоти. Концентрація цієї сполуки прямо пропорційна активності АЛТ у сироватці крові. За величиною абсорбції визначали активність ензиму [27].

*Склад набору:*

1. Калібрувальний розчин натрію пірувату.
2. Субстратно-буферний розчин.
3. Розчин 2,4-ДНФГ.

#### 4. Гідрооксид натрію.

##### *Хід визначення*

Визначення ензимної активності АЛТ проводили за методикою представленою у табл. 2.1.

**Таблиця 2.1**

##### **Процедура визначення аланінамінотрансферазної активності**

| Компоненти                                                                                                                                                            | Макрометод |     | Напівмакрометод |      | Мікрометод |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----|-----------------|------|------------|------|
|                                                                                                                                                                       | Д          | Х   | Д               | Х    | Д          | Х    |
| Залежно від застосованого методу у дослідні або холості пробірки додавали                                                                                             |            |     |                 |      |            |      |
| Субстратно-буферний розчин                                                                                                                                            | 0,5        | 0,5 | 0,25            | 0,25 | 0,1        | 0,1  |
| Проби інкубували 5хвилин при температурі 37°, після чого додавали сироватку крові в дослідні пробірки                                                                 |            |     |                 |      |            |      |
| Сироватка                                                                                                                                                             | 0,10       | -   | 0,05            | -    | 0,02       | -    |
| Проби інкубували 60 хвилин при температурі 37°, після чого додавали сироватку в холості пробірки та 2,4-ДНФГ                                                          |            |     |                 |      |            |      |
| 2,4-ДНФГ                                                                                                                                                              | 0,5        | 0,5 | 0,25            | 0,25 | 0,1        | 0,1  |
| Сироватка                                                                                                                                                             | -          | 0,1 | -               | 0,05 | -          | 0,02 |
| Проби витримували 20 хвилин при кімнатній температурі                                                                                                                 |            |     |                 |      |            |      |
| Гідроксид натрію                                                                                                                                                      | 5,0        | 5,0 | 2,5             | 2,5  | 1,0        | 1,0  |
| Проби витримували 10 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну щільність дослідної проби проти холостої проби. спектрофотометрично при довжині хвилі 520 нм. |            |     |                 |      |            |      |

Амінотрансферазну активність у сироватці крові розраховували за калібрувальним графіком, який побудований за різними концентраціями пірувату і показує залежність абсорбції від вмісту пірувату в калібрувальній пробі.

*Принцип методу:* аспартатамінотрансфераза каталізує реакцію переамінування, у результаті якої утворюється глутамат і оксалоацетат. При додаванні 2,4-ДНФГ утворюються забарвлені гідрозони оксалоацетату в лужному середовищі. При самовільному декарбоксилюванні оксалатацетату утворюється гідрозон пірувату [28].

1. Калібрувальний розчин натрію пірувату.
2. Субстратно-буферний розчин
3. Розчин 2,4-ДНФГ.
4. Розчин гідрооксиду натрію.

Визначення ензимної активності АЛТ проводили за методикою представленою у табл. 2.2.

## Процедура визначення аспартатамінотрансферазної активності

| Компоненти                                                                                             | Макрометод |     | Напівмакрометод |      | Мікрометод |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----|-----------------|------|------------|-----|
|                                                                                                        | Д          | Х   | Д               | Х    | Д          | Х   |
| Залежно від застосованого методу у дослідні або холості пробірки додавали                              |            |     |                 |      |            |     |
| Субстратно-буфер розчин                                                                                | 0,5        | 0,5 | 0,25            | 0,25 | 0,1        | 0,1 |
| Проби інкубували 5 хвилин при температурі 37°, після чого додавали сироватку крові в дослідні пробірки |            |     |                 |      |            |     |
| Сироватка                                                                                              | 0,10       | -   | 0,05            | -    | 0,02       | -   |
| Проби інкубували 60 хвилин при температурі 37°, після чого                                             |            |     |                 |      |            |     |

| додавали сироватку в холості пробірки та 2,4-ДНФГ                                                                                                                     |     |     |      |      |     |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|-----|------|
| 2,4-ДНФГ                                                                                                                                                              | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,25 | 0,1 | 0,1  |
| Сироватка                                                                                                                                                             | -   | 0,1 | -    | 0,05 | -   | 0,02 |
| Витримують 20 хвилин при кімнатній температурі                                                                                                                        |     |     |      |      |     |      |
| Гідроксид натрію                                                                                                                                                      | 5,0 | 5,0 | 2,5  | 2,5  | 1,0 | 1,0  |
| Проби витримували 10 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну щільність дослідної проби проти холостої проби. спектрофотометрично при довжині хвилі 520 нм. |     |     |      |      |     |      |

Ензимну активність АСТ виражали у мкмоль/хв на мл сироватки крові.

### Визначення білірубіну в сироватці крові

*Принцип методу:* діазотована сульфанілова кислота в присутності кофеїнового реактиву здатна утворювати з білірубінном (як непрямим, так і прямим) азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність утвореного забарвлення прямо пропорційна концентрації загального білірубіну в дослідній пробі. За умов відсутності кофеїнового реактиву в реакцію вступає тільки прямий білірубін. За різницею між загальним та прямим білірубінном можна визначити концентрацію непрямого білірубіну [28, 29].

*Склад набору:*

1. Розчин сульфанілової кислоти (25,0 ммоль/л).
2. Кофеїновий реактив, що містить бензоат натрію, ацетат натрію, кофеїн.
3. Розчин нітриту натрію.

*Хід визначення*

Визначення загального і прямого білірубіну проводили за методикою представленою у табл. 2.3.

**Таблиця 2.3****Процедура визначення загального і прямого білірубіну**

| Склад пробірки,<br>мл                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Загальний<br>білірубін | Холоста проба | Прямий<br>білірубін | Холоста<br>проба |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------|---------------------|------------------|
| Сироватка                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0,50                   | 0,50          | 0,50                | 0,50             |
| Кофеїновий<br>реактив                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1,75                   | 1,75          | -                   | -                |
| Фізрозчин                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -                      | 0,25          | 1,75                | 2,00             |
| Діазосуміш                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,25                   | -             | 0,25                | -                |
| <p>Під час визначення прямого білірубіну проводили фотометрування при температурі плюс 18-25 °С через (5-10) хв після додавання до проби діазосуміш. При довготривалій дії у реакцію вступає непрямий білірубін.</p> <p>Під час визначення загального білірубіну для утворення забарвлення проби витримували 20 хвилин при температурі плюс 18-25 °С.</p> <p>Після витримування проби фотометрували. При подальшій експозиції забарвлення не змінювалося.</p> <p>Оптичну щільність вимірювали проти відповідної холостої проби.</p> |                        |               |                     |                  |

Концентрацію загального білірубіну розраховували за калібрувальним графіком. Визначення концентрації непрямого білірубіну проводили за різницею загального білірубіну і прямого білірубіну.

Референтні значення білірубіну в дітей:

Загальний білірубін – 8,5-20,5 мкмоль/л.

Прямий білірубін – 0,86-5,1 мкмоль/л.

Непрямий білірубін – 4,5-17,1 мкмоль/л.

**Визначення тимолової проби в сироватці крові.**

*Принцип методу:* під час додавання до сироватки крові тимолового реактиву (тимоловотрис-(оксиметил)-амінометановий буфер) з'являється

помутніння оскільки утворюється глобулін-тимолово-ліпідний комплекс. За ступенем помутніння фотометрично визначають утворення комплексу [28].

#### *Хід визначення*

Визначення тимолової проби проводили за методикою представленою у табл. 2.4.

**Таблиця 2.4**

#### **Процедура визначення тимолової проби**

| Компоненти           | Макрометод |                |                | Напівмакрометод |                |                |
|----------------------|------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
|                      | Д          | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | Д               | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> |
| Сироватка            | 0,10       | -              | 0,10           | 0,05            | -              | 0,05           |
| Фізіологічний розчин | -          | 0,10           | 6,00           | -               | 0,05           | 3,00           |
| Тимоловий реактив    | 6,00       | 6,00           | -              | 3,00            | 3,00           | -              |

Після додавання всіх компонентів проби перемішували та витримували 30 хв при кімнатній температурі.

Після цього проби знову перемішували та вимірювали оптичну щільність дослідної проби проти холостої. Реєстрацію показників проводили при довжині хвилі 620 нм у к'юветах з товщиною 10 мм. Розрахунки проводили за калібрувальним графіком.

Референтні значення 0-5 Од S-H.

#### **Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів здійснювали на персональному комп'ютері Pentium з обов'язковим використанням пакету аналізу програми "Excel 2000 for Windows". Під час обробки результатів застосовували t-критерій Стюдента. Достовірними вважали результати при  $p \leq 0,05$  [30].

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ротавірус – це дволанцюговий РНК-вірус без оболонки, який викликає важкий гастроентерит у 90% дітей віком до трьох років [3]. Оскільки ротавірусна інфекція була вперше виявлена у дітей з діареєю, вважалося, що тропізм ротавірусу обмежений епітеліальними клітинами тонкої кишки і, отже, обмежений кишечником. Однак сьогодні показано, що вірусемія виникає у дітей під час гострої ротавірусної інфекції, і показано, що деякі прояви не пов'язані з ШКТ, включаючи ураження центральної нервової системи та органів гепатобіліарної системи [31].

Одним із проявів ротавірусної інфекції може бути ураження органів гепатобіліарної системи, зокрема ураження печінки, яке може проявлятися гепатомегалією з імовірним наступним розвитком серйозніших ускладнень [32].

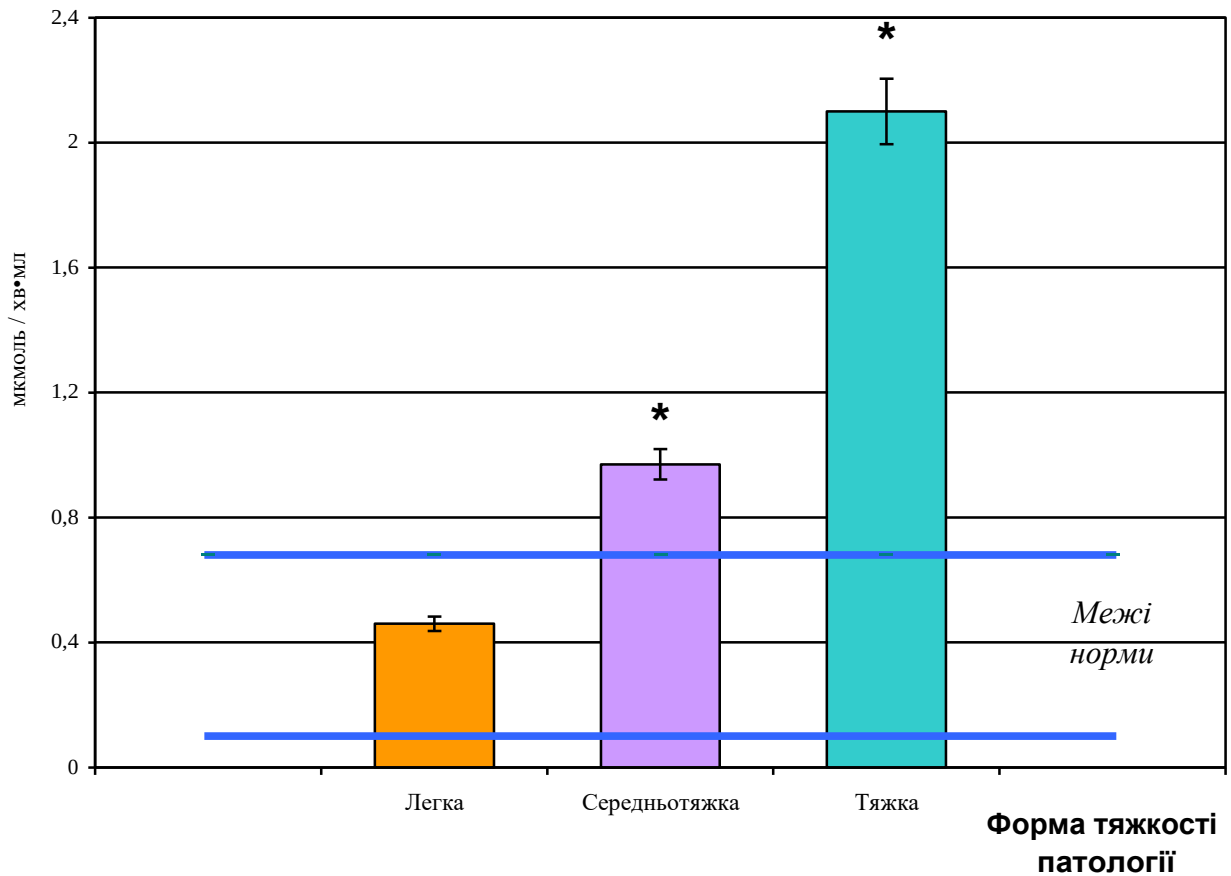
Печінка в організмі людини відноситься до основних гомеостатичних органів. Це сприяє її подвійному кровопостачанню – печінкова артерія і ворітна вена. Великий об'єм крові, який за добу проходить через печінку, сприяє виконанню нею функції метаболізму великої кількості лікарських препаратів. Порушення функцій печінки під час ротавірусної інфекції сприятиме зниженню її детоксикаційної функції в організмі дитини [5, 32].

Аналіз клінічних обстежень хворих дітей показав, що при ротавірусній інфекції різного ступеня тяжкості може відзначатися різна реакція печінки: від несуттєвого збільшення її розмірів до проявів більш серйозних змін [6]. Тому, для встановлення функціонального стану печінки у хворих дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості досліджено біохімічні маркери функціонального стану печінки – АЛТ, АСТ, рівня білірубину і показника тимолової проби.

Аналіз проведених досліджень показав, що у хворих дітей з легкою формою досліджуваної патології не виявлено підвищення ензимної активності АЛТ у сироватці крові дітей. Проте, по мірі підвищення тяжкості захворювання спостерігається підвищення аланінамінотрансферазної



активності з максимальними показниками у пацієнтів з тяжкою формою патології. Так, у цієї групи хворих дітей рівень ензимної активності АЛТ у 2,9 рази перевищував значення верхньої межі норми (рис.3.1).



**Рис.3.1. Ензимна активність аланінамінотрансферази у сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

*Примітка (тут і надалі): \* – статистично достовірна різниця порівняно з показниками норми,  $p \leq 0,05$ .*

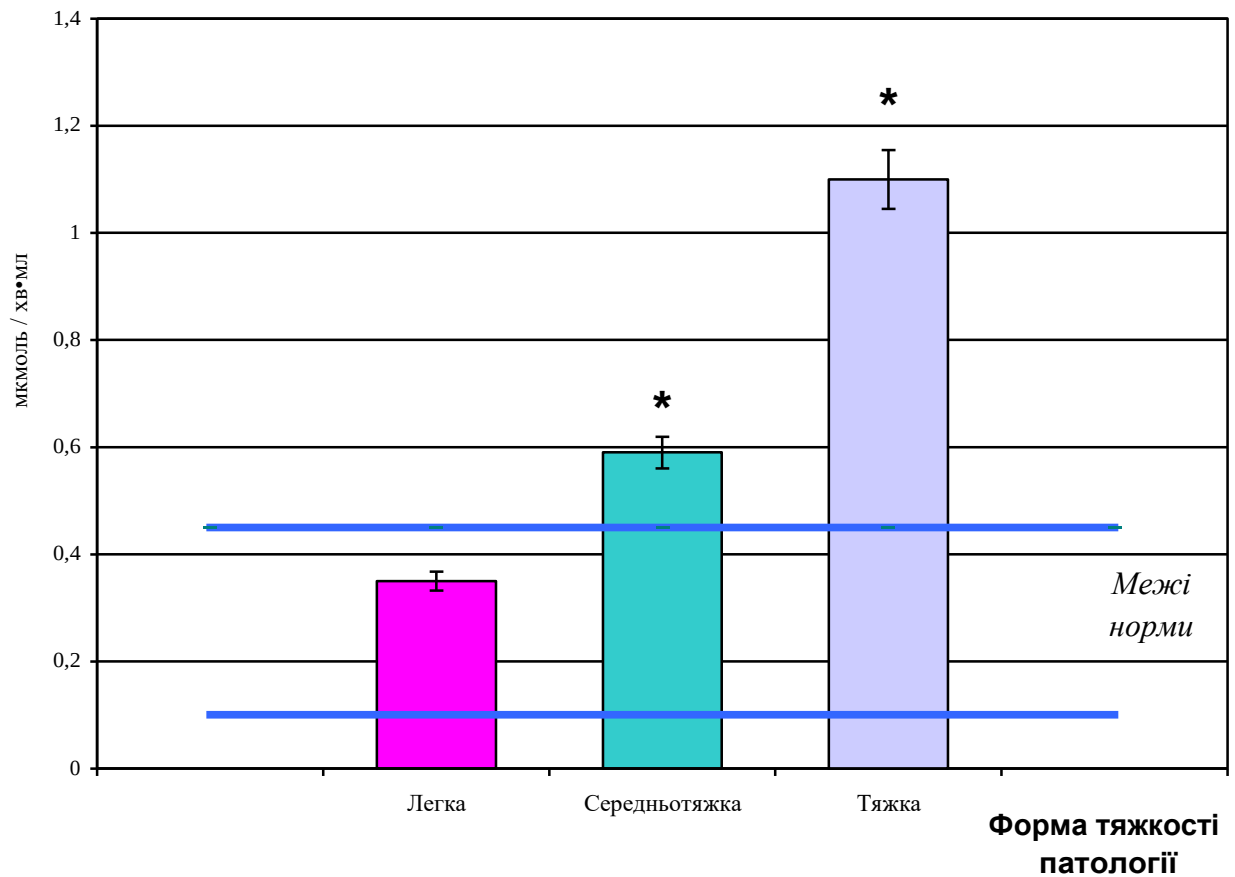
Підвищення ензимної активності АЛТ у сироватці крові дітей, хворих ротавірусною інфекцією, може бути наслідком дії ротавірусу або інтоксикаційних змін в організмі на функціональний стан печінки [32].

Така тенденція зміни аланінамінотрансферазної активності в сироватці крові дітей віком до трьох років може бути зумовлена станом імунної системи у дітей. Так, згідно даних літератури у дітей молодших вікових груп

ще не повністю сформований імунітет, тому за дії ротавірусної інфекції можуть спостерігатися відхилення імунних показників у гострому періоді. Тобто може відмічатися дисбаланс між прозапальними (інтерлейкін-1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ) і антизапальними (ІЛ-10) цитокінами. Зсув в сторону підвищення прозапальних цитокінів може відігравати ключову роль у розвитку запальних реакцій печінки [4]. Тому, підвищення АЛТ у сироватці крові дітей може свідчити про порушення функціонування печінки за умов прямого або опосередкованого впливу ротавірусної інфекції.

Іншим ензимом, який вказує на функціональний стан печінки є АСТ, яка синтезується внутрішньоклітинно. У нормі в кровотік потрапляє лише невелика частина цього ензиму. Гіперферментемія може виявлятися при пошкодженні печінки або міокарда. У результаті підвищення проникливості плазматичних мембран клітин цих органів або внаслідок цитолізу ензим потрапляє в кров [15].

Результати проведених досліджень показали підвищення ензимної активності АСТ у сироватці крові дітей, хворих ротавірусною інфекцією. Проте, таке підвищення залежало від форми тяжкості захворювання. Так, якщо при легкій формі ротавірусної інфекції рівень аспартатамінотрансферазної активності не відрізнявся від показників норми, то при середньотяжкій формі захворювання цей показник підвищувався у 1,3 рази порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.2). При підвищенні тяжкості досліджуваної патології досліджуваний показник підвищується ще більшою мірою – у 2,3 рази при тяжкій ротавірусній інфекції порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.2). Виявлені зміни також можуть вказувати на порушення структурно-функціональних властивостей клітин печінки за умов розвитку в організмі дітей до трьох років ротавірусної інфекції.



**Рис.3.2. Ензимна активність аспартатамінотрансферази у сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

З результатів дослідження видно, що при тяжкій формі ротавірусної інфекції приріст АЛТ (активність збільшується у 2,9 рази) (рис.3.1) перевищує підвищення АСТ (активність збільшується у 2,3 риза) (рис.3.2), що є більш характерним для пошкодження клітин печінки [22].

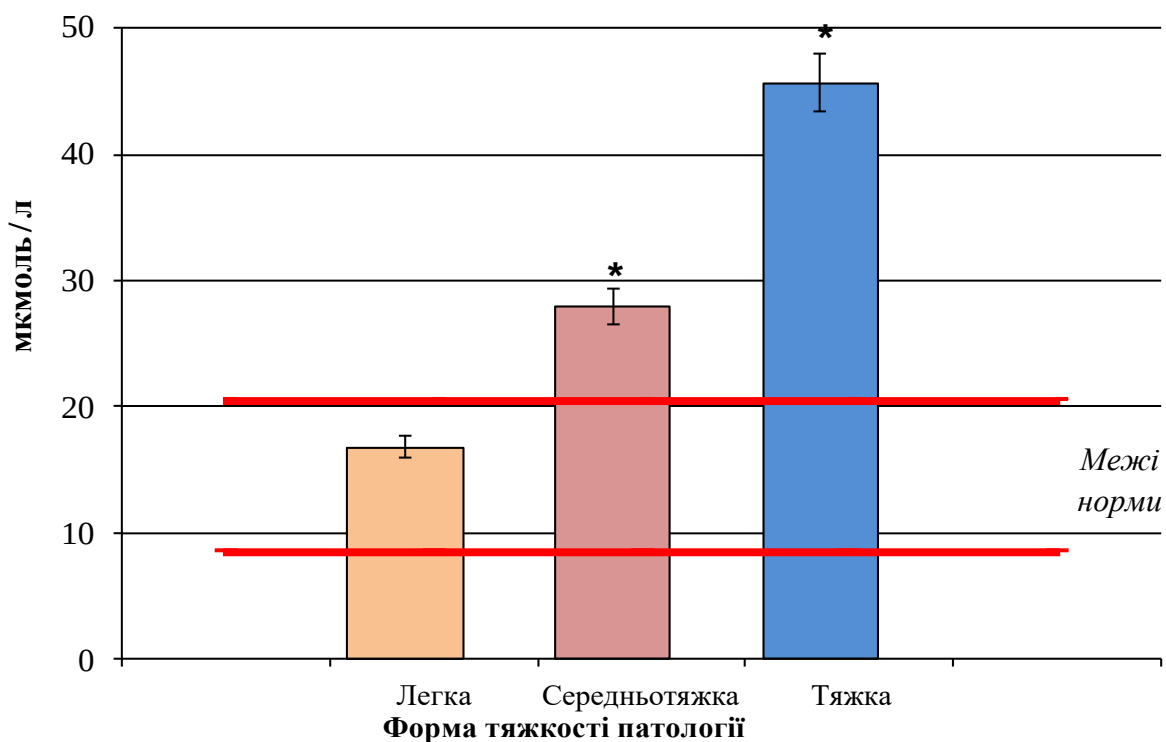
Імовірно, це пов'язано з тим, що розвиток ротавірусної інфекції сприяє зниженню рівня в організмі протизапального цитокіну ІЛ-4 – основний цитокін Т-хелперів 2-го типу, які регулюють активність гуморального імунітету [4]. При ротавірусній інфекції, імовірно, домінує активність клітинного імунітету. Цей факт може вказувати на порушення імунітету з різким посиленням запального потенціалу. Посилена секреція прозапального цитокіну – фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) може призвести до

збільшення об'єму гепатоцитів, а це, у свою чергу, призведе до гепатомегалії та гепатоцелюлярного апоптозу [4, 21].

Отже, виявлена гіперферментемія може бути результатом пошкодження клітин печінки з виходом у кров'яне русло досліджуваних амінотрансфераз, що призводить до підвищення їхньої активності в сироватці крові. Встановлений факт вказує на пошкодження клітин печінки за умов розвитку в організмі ротавірусної інфекції [23].

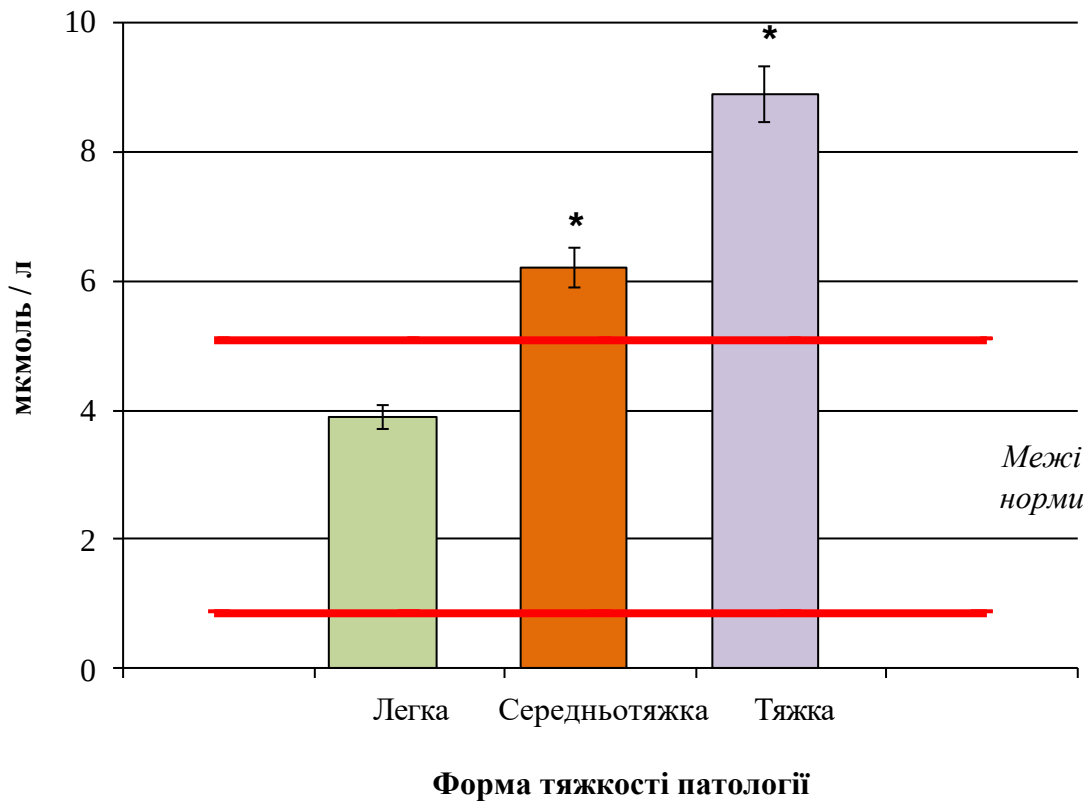
Оскільки до органів гепатобіліарної системи належить також жовчний міхур, то нами визначено рівень загального та прямого білірубіну у сироватці крові дітей, оскільки ці показники вказують на стан як печінки, так і жовчного міхура [33].

Встановлено, що у дітей з ротавірусною інфекцією середньотяжкого та тяжкого ступеня тяжкості вміст загального білірубіну перевищував показники верхньої межі норми у 1,4 рази та у 2,2 рази порівняно з показниками верхньої межі норми відповідно (рис.3.3).



**Рис.3.3. Вміст загального білірубіну в сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

Наразі із підвищенням рівня загального білірубіну в сироватці крові хворих дітей підвищувався рівень прямого білірубіну (рис.3.4). Проте, таке підвищення незначне, оскільки при середньотяжкій формі захворювання його рівень підвищувався у 1,2 рази, а при тяжкій – у 1,7 рази порівняно з показниками норми (рис.3.4).

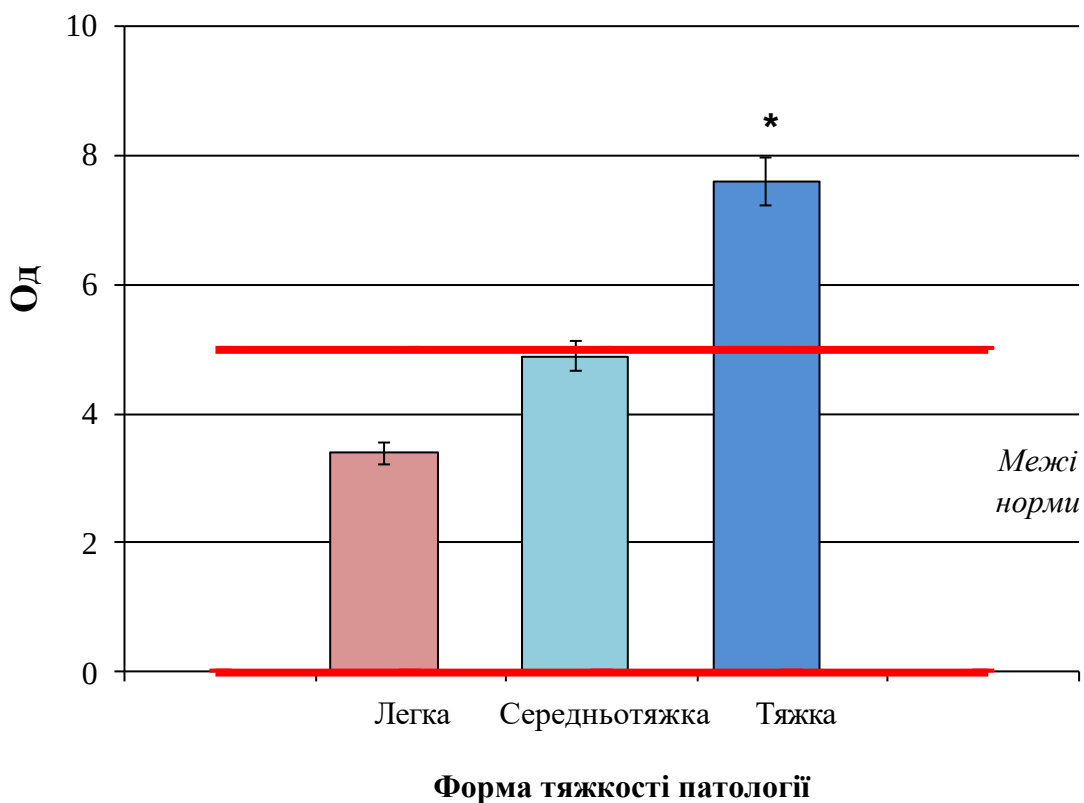


**Рис.3.4. Вміст прямого білірубіну в сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

Підвищення рівня прямого білірубіну в сироватці крові може свідчити про проблеми відтоку жовчі у жовчовивідних шляхах. Виявлений факт свідчить, що рівень загального білірубіну може підвищуватися як за рахунок фракції саме непрямого білірубіну [34], а це, у свою чергу, може свідчити про порушення процесів глюкуронування у печінці за дії ротавірусної інфекції [35].

Для оцінки білково-синтетичної функції печінки визначено показник тимолової проби.

Аналіз результатів показав, що у дітей з ротавірусною інфекцією не виявлено змін показника тимолової проби порівняно з показниками норми при легкій та середньотяжкій формах захворювання. Водночас, у пацієнтів з тяжкою формою захворювання показник тимолової проби у 1,5 рази перевищував значення верхньої межі норми (рис.3.5). Імовірно, в умовах розвитку в організмі ротавірусної інфекції при тяжкій її формі в печінці відбувається зміна балансу синтезу білків. Це призводить до зменшення в крові кількості альбуміну, що і призводить до швидшого осадження глобулінової фракції ( $\beta$ - і  $\gamma$ -глобулінів) при взаємодії з тимолом [24].



**Рис.3.5. Рівень показника тимолової проби у сироватці крові дітей з ротавірусною інфекцією різного ступеня тяжкості**

Виявлена гіперферментемія амінотрансфераз, білірубінемія та підвищення рівня тимолової проби в крові вказує на тривале напруження функціонування печінки у дітей з ротавірусною інфекцією, яке спрямоване на забезпечення компенсаторних реакцій у організмі. Це може призводити до виснаження функціонування печінки і створити передумови для формування передпатологічних і патологічних змін у органах гепатобіліарної системи.

Отже, поряд із основною причиною гострого гастроентериту ротавірусна інфекція може поширюватися за межі ШКТ. Це призводить до порушення функціонування печінки у хворих дітей, що може виражатися порушенням гепатоцитів і фрагментацією печінкових дольок, у результаті чого відбувається вихід амінотрансфераз у кров. Підвищення рівня білірубіну та його фракцій додатково вказує на порушення нормального функціонування органів гепатобіліарної системи при ротавірусній інфекції у дітей.

## ВИСНОВКИ

1. У дітей з ротавірусною інфекцією спостерігається підвищення рівня ензимних активностей АЛТ та АСТ в сироватці крові за умов середньотяжкої та тяжкої форм захворювання. При легкій формі ротавірусної інфекції статистично достовірної різниці активностей амінотрансфераз у сироватці крові порівняно з показниками норми не виявлено.

2. Підвищення рівня загального білірубіну та його фракцій у сироватці крові виявлено при середньотяжкій і тяжкій формах ротавірусної інфекції у дітей. При чому рівень загального білірубіну більшою мірою підвищується за рахунок фракції непрямого білірубіну.

3. Підвищення показника тимолової проби у сироватці крові пацієнтів з тяжкою формою ротавірусної інфекції може вказувати на порушення білково-синтетичної функції печінки в умовах досліджуваної патології.