

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

ННІ біології, хімії та біоресурсів  
кафедра біохімії та біотехнології

**Клініко-біохімічні маркери гепаторенального синдрому**

Дипломна робота

рівень вищої освіти –перший (бакалаврський)

**Виконала:**

студентка 4 курсу

спеціальність - біологія

кафедра біохімії та біотехнології

**Лункаш Ванесса Василівна**

**Науковий керівник:** професор Г.П. Копильчук

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № \_\_\_\_

від „\_\_” \_\_\_\_\_ 2023 р.

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

Чернівці

2023

## Анотація

Робота присвячена дослідженню можливості диференційної діагностики гепаторенального синдрому за допомогою клініко-біохімічних маркерів у пацієнтів із гепатопатологіями.

Аналіз клініко-біохімічних маркерів сироватки крові в 1 групі хворих засвідчив незначний рівень гіперферментемії та білірубінемії внаслідок підвищеної проникності мембран гепатоцитів без порушення трансформаційної здатності печінки та без ознак гепаторенального синдрому.

У хворих із гострою печінковою недостатністю встановлено виражену печінкову енцефалопатію та білірубінемію, що свідчить про втрату трансформаційної здатності печінки внаслідок цитолізу гепатоцитів, на що вказує 10-кратне збільшення показника активності АлТ у сироватці крові.

У хворих 2 групи під впливом гострої печінкової недостатності розвинувся гепаторенальний синдром, на що вказує розвиток помірної гіпонатріємії та гіперкреатиніемії при відсутності в анамнезі ознак захворювання нирок до госпіталізації.

## Зміст

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ I</b> Огляд літератури.....	5
1.1. Гепаторенальний синдром як приклад коморбідності.....	5
1.2. Діагностичні маркери гепаторенального синдрому.....	6
1.3. Форми печінкової недостатності та її вплив на організм.....	9
<b>РОЗДІЛ II</b> Методи досліджень.....	15
<b>РОЗДІЛ III</b> Результати та їх обговорення.....	22
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	28
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	29
<b>ДОДАТОК</b> .....	32

## Вступ

Печінкова недостатність, цироз печінки, ожиріння печінки (гепатостеатоз) надзвичайно поширені у всьому світі. Зловживання алкоголем, переїдання, фаст фуду, малорухливий спосіб життя – все це призводить до розвитку захворювань печінки.

Печінка – основний гомеостатичний орган людини. Це найбільша залоза людського організму. Захворювання печінки протікають безсимптомно, плавно змінюючи одну стадію іншою, вже значно складнішою. Зокрема, жирова дистрофія печінки – це коли порушення обмінних процесів призводить до відкладання жиру в гепатоцитах, тим самим руйнуючи клітини і викликаючи розвиток запалення в тканинах органу. Незважаючи на деструктивні зміни в печінці, на цьому етапі процес ще можна віднести до оборотних. Гепатостеатоз при відсутності належного лікування переходить у фіброз – необоротний процес. Далі – цироз або злоякісна трансформація. Тут уже вихід лише один – трансплантація печінки [1].

Більше того гостра або хронічна печінкова недостатність здійснює негативний вплив на весь організм. Дуже поширеним є гепаторенальний синдром, коли розвивається важка ниркова недостатність лише під впливом захворювань печінки, без будь-яких морфологічних змін у нирках. Недостатність двох гомеостатичних органів призводить до загибелі організму. Тому надзвичайно важливо вчасно діагностувати захворювання печінки, провести адекватне лікування, щоб не допустити розвитку гепаторенального синдрому.

**Мета роботи** – за допомогою клініко-біохімічних маркерів провести диференційну діагностику наявності гепаторенального синдрому в пацієнтів із гепатопатологіями.

## Розділ I

### Огляд літератури

#### 1.1. Гепаторенальний синдром як приклад коморбідності.

Нині перебіг багатьох захворювань характеризується одночасним залученням до патологічного процесу двох або кількох органів. Стан одночасної наявності двох або більше захворювань отримав назву коморбідності або поліморбідності відповідно. Прикладом коморбідності може слугувати гастроєзофагельна рефлюксна хвороба, пов'язана із захворюваннями органів гастроуденальної ділянки стравоходу; гепатохолецистит – захворювання жовчовивідних шляхів і печінки [2].

Окрім поняття коморбідності розрізняють ще поняття синтропії та інтерференції.

Синтропія – це одночасна наявність двох чи більше тотожних захворювань, інтерференція – це розвиток одного захворювання під впливом іншого, тобто класичний приклад вторинної патології.

З огляду на вищесказане гепаторенальний синдром являє собою інтерференцію важкої функціональної недостатності нирок на тлі гострої або хронічної печінкової недостатності. При гепаторенальному синдромі нирки морфологічно не змінені.

Проте взаємини печінки та нирок не обмежуються лише розвитком гепаторенального синдрому. Наприклад, вірус гепатиту В може провокувати розвиток гломерулонефриту [3]. Однозначної думки щодо механізму ураження нирок вірусом гепатиту В не існує. Проте є окремі припущення, пов'язані з дією імунокомплексів HbsAg – анти-HBs; імунокомплексів, що містять анти-HBc, HbeAg, анти- Hbe; впливом компонентів зруйнованих гепатоцитів і аутоантитіл, що виробляються під час захворювання.

При деяких захворюваннях зустрічаються також поєднані ураження печінки й нирок, але це не є гепаторенальний синдром, оскільки роль печінки у розвитку патології нирок просто відсутня. Це приклад синтропії [4].

### **1.2. Діагностичні маркери гепаторенального синдрому.**

Гепаторенальний синдром (ГРС) – це розвиток ниркової недостатності у пацієнтів з хронічними захворюваннями печінки (цироз печінки, хронічний гепатит).

При гепаторенальному синдромі відбувається вазоконстрикція (звуження) ниркових судин, що призводить до погіршення ниркового кровообігу. Водночас морфологія нирок практично не зазнає змін.

Гепаторенальний синдром розвивається у 80% хворих цирозом печінки на його термінальній стадії, що проявляється прогресуванням печінкової недостатності, портальною гіпертензією (підвищення гідростатичного тиску в руслі ворітної вени печінки), зниженням функції нирок і порушенням регуляції судинного тону.

Печінкова недостатність здійснює системний негативний вплив на функціонування всіх органів і систем. Наприклад, аномальні результати тестів функціонального стану щитоподібної залози можуть бути наслідком змін рівня пов'язаних із печінкою тиреоїдних гормонів і зв'язувальних білків плазми крові, а не порушення роботи щитоподібної залози.

Серед великого розмаїття факторів, що призводять до ураження нирок при печінковій недостатності, можна виділити основні – це порушення кровообігу в нирках через спазм ниркових капілярів, ниркова гіпоксія, неутілізовані печінкою ендogenousні токсини, які пошкоджують нирки [5].

Цироз печінки супроводжується посиленням викидом глюкагону в кров. Як наслідок, пригнічується чутливість артеріол до катехоламінів та ангіотензину II, що в свою чергу викликає зниження артеріального тиску внаслідок вазодилатації. Як компенсаторна реакція у відповідь на гіпотонію у нирках зростає викид вазоконстрикторів, який посилюється по мірі прогресування печінкової недостатності і з часом переростає у стійку ренальну вазокон-

стрикцію. Внаслідок системної вазодилатації активується РААС, внаслідок чого розвивається спазм еферентних артеріол ниркового клубочка [6].

Розвиток системної гіпотонії індукує посилену секрецію антидіуретичного гормону, який через V1-рецептори викликає вазоконстрикцію внутрішніх органів, а через V2-рецептори посилює канальцеві реабсорбцію води, що веде до розвитку дилуційної гіпонатріємії [7-8].

Внаслідок збільшення циркулюючого альдостерону в крові, ниркової затримки іонів амонію замість калію, вторинного ниркового тубулярного ацидозу або сечогінної терапії може виникати надмірна втрата калію з сечею, що призводить до гіпокаліємії.

Незважаючи на те, що нирки можуть активно затримувати натрій при гепаторенальному синдромі може зустрічатися гіпонатріємія. Цей стан погано корегується [9].

Дослідники, які займаються гепаторенальним синдромом, називають такі його діагностичні критерії: цироз печінки з асцитом, рівень креатиніну в сироватці крові перевищує 133 мкмоль/л, поліорганна недостатність, відсутність паренхіматозних захворювань нирок, відсутність протеїнурії більше 500 мг/день, мікрогематурії (<50 еритроцитів у полі зору) та змін структури нирок при ультразвуковому дослідженні [10].

Таким чином клініко-біохімічними діагностичними маркерами гепаторенального синдрому є підвищений рівень креатиніну в сироватці крові та гіпонатріємія. Щодо аналізу сечі, то він не демонструє якихось суттєвих змін. ГРС характеризується олігурією (зменшенням кількості виділеної сечі) з подальшою анурією (повним припиненням сечовиділення) [5,11].

Взагалі диференційна діагностика гепаторенального синдрому досить непроста. Існує багато захворювань з одночасними проявами ушкоджень як печінки, так і нирок, наприклад, амілоїдоз, саркоїдоз, системний червоний вовчак, синдром Шегрена, неалкогольний стеатогепатит, полікістозна хвороба тощо [7, 12-13].

Гепаторенальний синдром буває двох типів. Для гепаторенального синдрому I типу характерне швидке зростанням рівня креатиніну в сироватці крові ( $> 220$  мкмоль/л протягом 2 тижнів). Найчастіше – це наслідок спонтанного бактеріального перитоніту.

Гепаторенальний синдром II типу характеризується глибшими, але повільнішими проявами зниження функції нирок [5].

При діагностуванні ниркової недостатності, причина якої нелікований гепаторенальний синдром, спостерігається її швидке прогресування з фатальним фіналом (гепаторенальний синдром I типу), хоча в інших випадках протікання буває менш важким з ознаками постійної помірної ниркової недостатності (гепаторенальний синдром II типу).

У хворих на цироз печінки гепаторенальний синдром розвивається двома шляхами. Перший виникає внаслідок ускладнень, як наприклад, бактеріальний перитоніт, кровотеча, передозування альбуміну тощо. Гепаторенальний синдром такого типу являє собою досить важкий стан, коли показники креатиніну в крові вищі, ніж  $220$  мкмоль/л, а також відмічається прогресуюча артеріальна гіпотензія. Такі хворі за відсутності лікування живуть до 2 тижнів [7,14].

Другий тип гепаторенального синдрому розвивається при декомпенсації цирозу печінки не так швидко і може бути наслідком асцити. Рівень ниркової недостатності у цьому випадку виражений значно слабше. Креатинін крові менше, ніж  $220$  мкмоль/л, артеріальна гіпотензія помірніша. Однак, гепаторенальний синдром другого типу швидко переростає у перший тип [15].

Індукуючими факторами розвитку гепаторенального синдрому при цирозі печінки є асцит, діуретична терапія; гіпонатріємія сечі; високий вміст креатиніну, азоту та сечовини в сироватці крові при осмоляльності крові нижче, ніж сечі; прогресуюче зниження клубочкової фільтрації тощо. Як правило, відмічається систолічна артеріальна гіпотензія (менше  $80$  мм рт. ст.).

Загроза розвитку гепаторенального синдрому підвищує високий рівень білірубіну крові ( $>68$  мкмоль/л) та креатиніну крові ( $>88$  мкмоль/л). Електро-

літний дисбаланс, холестаза, порушення трофологічного статусу та прийом нефротоксичних препаратів, зокрема нестероїдних протизапальних засобів, також є чинниками ризику появи гепаторенального синдрому [11].

### **1.3. Форми печінкової недостатності та її вплив на організм.**

Гостра печінкова недостатність являє собою раптове, швидко прогресуюче послаблення функції печінки у людей без хронічного захворювання печінки, що характеризується розвитком жовтяниці, порушеннями плазмової ланки гемостазу та печінкової енцефалопатії [16].

Причинами гострої печінкової недостатності можуть бути вірусний гепатит В, D, E, А; неконтрольоване вживання лікарських засобів – парацетамол, фенітоїн, галотан, ізоніазид, статини, сульфаніламід, інші (в тому числі рослинні); різні токсини, наприклад,  $\alpha$ -аманітин (бліда поганка), жовтий фосфор, токсин *Bacillus cereus*, токсин ціанобактерій; шок, ішемія, аутоімунний гепатит, тромбоз портальної вени тощо.

За умов гострої печінкової недостатності причиною порушення метаболічної та детоксикаційної функції печінки є цитоліз гепатоцитів, що може призвести до важких наслідків у всьому організмі, оскільки печінка – це основний гомеостатичний орган.

Гостра печінкова недостатність супроводжується певними порушеннями кровообігу (оксид азоту, прозапальні цитокіни, бактеріальні ендотоксин), наслідком яких є тканинна гіпоксія, молочнокислий ацидоз та полі органа недостатність [16].

При печінковій недостатності кров не очищується від ендотоксинів, які потрапляють у кровоплин. Токсичні фактори, які накопичуються в крові призводять до ураження систем органів. Серед таких токсичних факторів – аміак, який утворюється при дезамінуванні амінокислот, біогенних амінів, нуклеотидів тощо; меркаптан, метилмеркаптан, фенол, крезол, скатол, індол – продукти гниття білків у кишечнику; гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) – продукт декарбоксілювання глутамату, що виконує роль гальмівного нейро-

медіатора; коротколанцюгові жирні кислоти тощо. У нормі всі ці сполуки (і не тільки вони) трансформуються у печінці, перетворюючись на водорозчинні, нетоксичні сполуки і виводяться з організму нирками. Проте при печінковій недостатності всі вони накопичуються у крові та здійснюють негативний вплив на тканини та органи.

Одним із найнебезпечніших є аміак, який при хронічній печінковій недостатності не метаболізується в печінці з утворенням сечовини, а накопичується в крові, звідки потрапляє у мозок і поглинається астроцитами. В астроцитах аміак внаслідок глутамінсинтетазної реакції перетворюється на глутамін. Надлишок глутаміну в астроцитах спричиняє набряк мозку і слугує основною причиною розвитку печінкової енцефалопатії [17].

Найпоширенішими механізмами розвитку печінкової енцефалопатії є: 1) ендогенна печінкова енцефалопатія виникає внаслідок зниження детоксикаційної функції печінки як результат її гострого або хронічного захворювання; 2) портосистемна печінкова енцефалопатія розвивається внаслідок формування функціональних або анатомічних шунтів між системами портального і загального кровообігу, що призводить до потраплення токсичних кишкових продуктів у головний мозок. Цей вид енцефалопатії переважає при цирозі печінки [18].

Залежно від терміну, коли розвивається печінкова енцефалопатія, печінкова недостатність буває: надгостра, коли енцефалопатія розвивається впродовж 1 тижня з початку виникнення жовтяниці. Ця форма печінкової недостатності характеризується різким зростанням активності амінотрансфераз у сироватці крові та незначною гіпербілірубінемією. Хворі мають високі шанси на одужання. Друга форма – це гостра, коли енцефалопатія розвивається в період 8-28 діб від появи жовтяниці. Третя – підгостра – енцефалопатія розвивається в період 5-12 тижнів з дня появи жовтяниці. Для цієї форми характерно незначне зростання рівня амінотрансфераз у сироватці крові, дуже важка форма жовтяниці, асцит і зменшення печінки. Клінічна картина подібна до цирозу печінки. У даному випадку потрібне невідкладне хірургічне втру-

чання у вигляді пересадки печінки, бо у противному разі хворий помирає з ознаками печінкової коми, набряку головного мозку та поліорганної недостатності.

Для лабораторної діагностики характерні показники: дуже високі показники АЛТ  $> 2000$  ОД/л характерні для токсичного або ішемічного ураження печінки, тромбоцитопенія, гіпоглікемія, високий вміст аміаку в крові, підвищений вміст лактату [16].

Встановлено, що концентрація іонів амонію в крові зростає в 2-3 рази на початкових стадіях печінкової енцефалопатії при цирозі, сягаючи 10-кратного збільшення при фульмінантній печінковій недостатності [19].

Печінкову енцефалопатію класифікують за наступними критеріями – важкість та тривалість протікання, провокуючі фактори, тип хвороби. Тип А розвивається внаслідок гострої печінкової недостатності, тип В виникає через порто системне шунтування, тип С – наслідок цирозу печінки. Печінкова енцефалопатія буває неспровокована і спровокована. Провокуючими факторами виступають різні інфекції, електролітний дисбаланс, кровотечі у травному тракті, закрепи, неконтрольований прийом діуретиків.

Гостра печінкова енцефалопатія розвивається за умов гострої печінкової недостатності, яка розвивається за декілька днів або навіть годин. При цьому спостерігається масивний некроз тканин печінки, а в крові накопичуються церебротоксичні речовини. Різко погіршується загальний стан, наростає слабкість, нудота, блювота, анорексія, з'являється сильно виражена жовтяниця. Гостра печінкова енцефалопатія буває різна за тривалістю – від кількох годин (з летальним фіналом у першу добу) до 2-9 тижнів з повільнішими проявами симптомів. Для цього захворювання характерний геморагічний синдром, який проявляється численними висипаннями на шкірі. Блювотиння нагадує кавову гущу, гематурія (масові кровотечі). Може з'являтися діурез, пізніше – асцит. Через токсичне ураження серцево-судинної системи – тахікардія, артеріальна гіпотензія. Інколи розвивається пневмонія.

Прогресуючі деструктивні зміни в печінці виражаються в тому, що вона стає м'якою, болючою при пальпації, розвивається також спонтанний біль у печінці. Різко прогресує некроз печінки, її розміри протягом кількох годин або 1-2 днів зменшуються, врешті-решт вона не пальпується. Ознакою масивного некрозу печінки є печінковий запах з рота, який розвивається внаслідок інтенсивного розпаду білків, порушення процесів деметилювання метіоніну. Печінковий запах з рота – це запах метилмеркаптану, який є продуктом гниття білків у кишечнику, і знешкодження якого не відбувається у печінці.

Стадії печінкової енцефалопатії: I стадія характеризується чергуваннями ейфорії та апатії, частою психологічною втомою, інверсією сну (сонливість вдень і безсоння вночі), розладами руху. На II стадії відмічається сплутаність свідомості, провали пам'яті, галюцинації, печінковий тремор кінцівок тощо. На III стадії – повна втрата свідомості зі збереженням реакції на холод, біль тощо. Характерні часті судоми, ригідність потиличних м'язів, млява реакція на світло, затримка сечовиділення навіть при повному сечовому міхурі. IV стадія – це термінальна стадія печінкової коми. У цей період повністю зникає свідомість, а разом з нею і відповіді на сильні зовнішні подразники, розвивається параліч дихання.

Хронічна печінкова енцефалопатія буває епізодична, коли розлади свідомості чергуються з періодами ремісії; повторна, коли розлади повторюються через кілька місяців; постійна, що характеризується стабільною втраченою свідомості.

Хронічна печінкова енцефалопатія має 5 ступенів важкості. Найменш вираженою є мінімальна хронічна печінкова енцефалопатія, коли клінічні прояви когнітивних змін практично не спостерігаються. Проте складні види діяльності, пов'язані з обробкою інформації та психомоторних навичок, обмежені. Наступний етап – клас I – характеризується незначними порушеннями свідомості, перепадами настрою, зниженням інтелектуальної працездатності, певними поведінковими змінами. II клас характеризується значними змінами свідомості з порушеннями орієнтації в часі, розвивається апатія, ро-

злади пам'яті тощо. Клас III – на цьому етапі відмічається сплутаність свідомості, порушення мови, знижена реакція на больові подразники, порушення координації рухів і рівноваги. Останній клас – IV – характеризується комою.

Механізм токсичності аміаку полягає в кількох ефектах його дії, зокрема, аміак легко проникає через клітинні мембрану і зсуває оборотну глутаматдегідрогеназну реакцію в бік синтезу глутамату, що призводить до зменшення концентрації альфа-кетоглутарату. Цей ефект в свою чергу призводить до гальмування циклу Кребса, пригнічення реакцій трансамінування амінокислот. Зростання кількості аміаку в крові веде до розвитку алкалозу. За умов алкалозу підвищується спорідненість гемоглобіну до кисню, що призводить до гіпоксії тканин та накопичення CO<sub>2</sub>. Внаслідок надлишку іонів амонію в крові порушується трансмембранний перенос іонів Na<sup>+</sup> і K<sup>+</sup>. Оскільки вищеписані ефекти універсальні для всіх клітин і тканин, то є підстави констатувати, що при патології печінки порушення обміну аміаку індукує структурно-функціональні зміни гепатоцитів [20].

Діагностика печінкової недостатності непроста і вимагає великої кількості лабораторних аналізів [21], зокрема, функціональних печінкових проб та визначення концентрації аміаку в плазмі крові.

Для діагностики вираженої форми печінкової енцефалопатії проводять біохімічний аналіз крові (активності АлТ, АсТ, ГГТ, рівень альбуміну, вміст С-реактивного білка, глюкози та аміаку в крові). Слід зауважити, що високий рівень аміаку в крові є необхідним, проте не достатнім фактором для постановки діагнозу печінкової енцефалопатії [22].

Таким чином печінкова енцефалопатія може слугувати маркером для диференційної діагностики форми печінкової недостатності. Печінкова недостатність супроводжується нирковою недостатністю, навіть при відсутності ушкоджень тканин нирок.

Отже, аналіз інформаційних джерел засвідчує надзвичайно високу небезпеку для організму людини при розвитку гепаторенального синдрому. Ге-

нез цього захворювання досить широкий. Вчасне діагностування та правильне лікування захворювань печінки може дати можливість уникнення цього небезпечного захворювання.

## Розділ II

### Методи досліджень

***Визначення концентрації аміаку в плазмі крові призначають для виявлення захворювань печінки.***

Аміак утворюється при дезамінуванні амінокислот, біогенних амінів, нуклеотидів. Знешкодження аміаку відбувається в печінці у циклі сечовини. Проте при печінковій недостатності цикл сечовини порушується і концентрація аміаку в крові зростає, розвивається гіперамоніємія. Печінкова недостатність супроводжується зростанням рівня аміаку більш, ніж в 90% випадків.

Печінкова енцефалопатія вважається найчутливішим і найпоказовішим клінічним проявом печінкової недостатності, за яким визначають позитивну або негативну її динаміку.

*Діагностичний тест для кількісного in vitro визначення аміаку в плазмі крові людини на фотометричних системах.*

Реактив «Аміак NH<sub>3</sub>» (Randox, США), у якості контрольної сироватки – «Ammonia ethanol control – level 2» (Randox, США) з відомою концентрацією.

*Тестові параметри:*

Метод: ферментативний, УФ, 2-точковий кінетичний, спадаючої реакції.

Довжина хвилі: 340 нм, 380 нм.

Температура: 37 °С.

Зразок: ЕДТА плазма або гепаринова плазма (НЕ гепарин амонію!) (Сироватка не рекомендується!)

Лінійність: чутливість до 1174 мкмоль/л, нижня межа виявлення - 4.1 мкмоль/л.

Вимірювання також можна проводити на автоматичному біохімічному аналізаторі Express Plus («Bayer Corporation», Німеччина).

*Принцип тесту.* Аміак реагує з  $\alpha$ -кетоглутаратом і НАДН з утворенням L-глутамату і НАД. Реакція каталізується за допомогою глутаматдегідрогенази.

Зменшення оптичної густини внаслідок окислення відновленого кофактора може контролюватися при 340 або 380 нм і пропорційно до концентрації аміаку.

піпетувати в пробірці	бланк	стандарт	зразок
реагент	1000 мкл	1000 мкл	1000 мкл
зразок			100 мкл
стандарт/калібратор		100 мкл	
дистилят	100 мкл		
Перемішати. Інкубувати 30 секунд при 37 °С і зчитати А1. Інкубувати ще 10 хвилин при 37 °С і зчитати А2. Підрахувати: $\Delta A = [(A2-A1) \text{ зразка або стандарту}] - [(A2-A1) \text{ бланку}]$			

*Розрахунки:*

$$\text{аміак (мкл/л)} = \Delta A_{\text{зразка}} / \Delta A_{\text{стандарту}} * \text{конц. стандарту (мкмоль/л)}$$

*Конверсія одиниць вимірювання :*

$$\text{мкг/мл} * 58.71 = \text{мкмоль/л}$$

*Референсний діапазон:*

дорослі – 12-47 мкмоль/л або 0,2-0,8 мкг/мл

*Робочі характеристики лінійність, діапазон вимірювання .*

Аналіз є лінійним від 8.8 до 1174 мкмоль/л (0.15 – 20.0 мкг/мл). При вищих концентраціях аміаку зразок слід розвести 0,9% фізіологічним розчи-

ном і досліджувати повторно, помноживши результат на коефіцієнт розведення.

*Чутливість / межа виявлення.*

Нижня межа виявлення – 4.1 мкмоль/л (0.07 мкг/мл) [23].

### **Визначення активності АлТ.**

*Принцип методу.* Для визначення активності АлТ застосовують метод Райтмана-Френкеля з динітрофенілгідрозином. Аланінамінотрансфераза каталізує оборотну реакцію трансамінування аланіну.

L-аланін +  $\alpha$ -кетоглутарат  $\leftrightarrow$  глутамат + піруват

Утворений піруват з 2,4-динітрофенілгідрозином в лужному середовищі утворює динітрофенілгідрозон, інтенсивність забарвлення якого пропорційна до концентрації АлТ в пробі.

Матеріалом для дослідження є сироватка або плазма крові, ретельно відокремлені від формених елементів крові не пізніше, ніж через 1 годину після забору крові.

Весь набір реактивів довести до кімнатної температури перед використанням.

P1, P2 готові до використання. P3 розвести дистиллятом у 20 разів (1:19).

Проведення аналізу:

1. Умови вимірювання: довжина хвилі 505 (500-600) нм кювета з товщиною оптичного шару 1 см, температура 15-25-37°C.

	макроаналіз		мікроаналіз	
	дослід	холоста проба	дослід	холоста проба
P1, мл	0,4	0,4	0,1	0,1
Змішати, інкубувати 3 хв. при 37° С на водяній бані				
P2, мл		0,4		0,1
сироватка, мл	0.08	0.08	0.02	0.02

Змішати та інкубувати 20 хв. при кімнатній температурі				
РЗ, мл	4,0	4,0	1,0	1,0
Змішати та інкубувати 10 хв. при кімнатній температурі				

2. Виміряти оптичну густину дослідної проби (E1) проти відповідної холостої проби. Забарвлення стійке як мінімум 60 хв.
3. Розрахунок результатів проводять за калібрувальною кривою.
4. Референсні величини: 0.028-0.19 мккат/л при температурі 37°C. Перехід в додаткові одиниці: Од/л  $\times 0.01667 =$  мккат/л. або до 40 Од/л [24].

### ***Визначення концентрації натрію в крові.***

Гіпонатріємія – це стан, при якому концентрація натрію у сироватці крові  $<135$  ммоль/л.

Гіпонатріємія буває:

- 1) легка – при концентрації натрію 130–134 ммоль/л
- 2) помірна – концентрація натрію становить 125–129 ммоль/л
- 3) тяжка, коли концентрація натрію  $<125$  ммоль/л.

За тривалістю розвитку гіпонатріємія буває:

- 1) гостра, коли тривалість становить  $<48$  год;
- 2) хронічна – з тривалістю  $\geq 48$  год.

У залежності від вимірюваної осмоляльності плазми гіпонатріємія буває:

гіпотонічна: оскільки іони натрію – це найважливіший осмоліт позаклітинного середовища, то зниження їх рівня викликає гіпотонію позаклітинного простору та проникнення позаклітинної рідини всередину клітини і, як наслідок, набряк клітин [25].

Рівень натрію визначають у сироватці крові. Метод, яким визначають іони натрію в крові – іоноселективний [26].

Може використовуватись ще один метод – потенціометричний.

Гіпонатріємія розвивається через надмірну втрату натрію у зв'язку з надмірним екзогенним надходженням води в організм або її затримку. Рівень електроліту може зменшуватись через зростання загального об'єму рідини в організмі, наприклад, при нефротичному синдромі чи інших захворюваннях нирок [27].

### ***Визначення рівня креатиніну в крові.***

Креатинін виділяється з організму лише нирковими клубочками без реабсорбції у ниркових канальцях. При ураженні нирок виведення креатиніну з сечею знижується, тому при аналізі відмічається його підвищений вміст у сироватці крові. В цілому визначення рівня креатиніну дає можливість оцінити клубочкову фільтрацію.

Метод визначення креатиніну – колориметричний

Одиниці вираження: мкмоль / л

Референсні значення: 44-106 мкмоль / л

Суть колориметричного методу Яффе полягає у взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою у лужному середовищі з утворенням таутомеру пікрату креатиніну помаранчевого кольору [28].

### ***Визначення вмісту білірубіну в сироватці крові.***

Концентрацію білірубіну в сироватці крові визначають за методом Ван ден Берга з діазореактивом Ерліха. Азобілірубін, який утворюється, має рожеве забарвлення, інтенсивність якого визначають колориметрично. Це прямий білірубін.

Якщо ж для появи забарвлення сироватку крові необхідно попередньо обробити етанолом, тобто має місце непряма реакція, то такий білірубін називають непрямим [29].

### ***Білірубін по Йєндрашику***

*Принцип методу.* Загальний білірубін із сульфаніловою кислотою при наявності у середовищі кофеїну утворює азобілірубін рожево-фіолетового

кольору, інтенсивність якого пропорційна до концентрації загального білірубіну в пробі. За відсутності кофеїну забарвлюється лише прямий білірубін. Концентрацію непрямого білірубіну визначають як різницю між загальним та прямим білірубіном.

Білірубін – це продукт розпаду гема, який екскретується в жовчеві протоки. Причинами загальної гіпербілірубінемії можуть бути: посилений гемоліз, генетичні порушення, неонатальна жовтяниця, неефективний еритропоез, лікарські препарати тощо. Причинами прямої білірубінемії можуть бути: холестаза, генетичні та гепатоклітинні порушення.

Матеріалом досліджень слугує сироватка або плазма крові.

*Підготовка реагентів.* Температура реагентів повинна дорівнювати кімнатній. Діазосуміш (ДС) готують безпосередньо перед початком аналізу. Р1 і Р2 змішують у співвідношенні 100:3. Р3 готовий до використання. Білірубін калібратор: відкриваючи флакон, намагатися уникнути розпилення порошку ліофілізату. У флакон додають 2 мл дистилляту з температурою 20-25°C, після чого його закривають і витримують приблизно пів години при кімнатній температурі в темному місці. Потім ретельно перемішують, уникаючи появи піни.

Умови: вимірювання проводять при довжині хвилі 540 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 1 см, при температурі 15-25°C.

Налаштування приладу на нуль проводять відносно дистилляту.

Компоненти реакційної суміші вносять в об'ємах, вказаних у таблиці.

	Білірубін загальний	Білірубін прямий	Холоста проба
дослід/калібратор, мл	0,5	0,5	0,5
Р3, мл	1,75	-	-
NaCl 9 г/л, мл	-	1,75	2
ДС, мл	0,25	0,25	-

**Прямий білірубін:** 5- хвилинна інкубація при 15-25° С. Увага! Для запобігання вступу в

реакцію непрямого білірубіну вимірювання слід провести точно через 5 хв. після додавання діазосуміші. Для визначення *загального білірубіну* вимірювання проводять після 20 хвилинної інкубації при 15-25° С. Виміряти оптичну густину (Е) дослідної проби та калібратора проти відповідної холостої проби.

Розрахунки:

$$F = C_{kal} / E_{kal}$$

Концентрація загального білірубіну в досліджуваній пробі:  $C_{досл} = E_{досл} \times F$  де: F – фактор перерахунку  $C_{kal}$  – концентрація Білірубін Калібратор, мкмоль/л.  $E_{kal}$  – оптична густина Білірубін Калібратор, оптичних одиниць.  $C_{досл}$  – концентрація досліджуваного зразка, мкмоль/л.  $E_{досл}$  – оптична густина досліду, в оптичних одиницях.

При визначенні прямого білірубіну рекомендується використовувати «Калібратор CFAS» (Іспанія).

*Референсні величини.*

Білірубін загальний до 18.81 мкмоль/л = 11 мг/л

Білірубін прямий до 4.27 мкмоль/л = 2.5 мг/л

Перехід в додаткові одиниці: мг/л \* 1.71 = мкмоль/л. [30].

### Розділ III

#### Результати та їх обговорення

Відомо, що одним із маркерів печінкової недостатності є підвищення рівня аміаку в сироватці крові. Водночас цей показник є необхідним, хоча недостатнім для діагностики печінкової енцефалопатії.

Симптокомплекс «печінкова енцефалопатія» означає комплекс оборотних нервово-психічних порушень, які розвиваються за умов печінкової недостатності найвищого ступеня важкості.

Масивний цитоліз гепатоцитів у пацієнтів без захворювань печінки в анамнезі може стати однією з причин гепатоцелюлярної недостатності, яка лежить в основі печінкової енцефалопатії. Це випадки гострої печінкової недостатності. Якщо печінкова енцефалопатія виникає через 8 тижнів після перших симптомів гепатоцелюлярної недостатності, то говорять про гостру печінкову недостатність, а якщо – через 7 днів, то це найгостріша форма печінкової недостатності. Причинами можуть бути інфекції, зокрема, вірусні, хімічні агенти, зокрема, ліки тощо.

У 1998 році на XI Всесвітньому конгресі гастроентерологів печінкову енцефалопатію розділили на типи: А – це печінкова енцефалопатія, яка виникає внаслідок гострої печінкової недостатності; В – печінкова енцефалопатія пов'язана з портосистемним шунтуванням крові без захворювань печінки; тип С – печінкова енцефалопатія, яка розвивається при цирозі печінки, портальній гіпертензії та портосистемному шунтуванні.

На нинішній день основною токсичною для організму людини речовиною за умов гепатоцелюлярної недостатності та портосистемного шунтування крові вважається аміак [31].

**Рис.1.** Концентрація аміаку в сироватці крові пацієнтів з гепатопатологіями

**Примітка** (тут і надалі):

- 1 – група хворих з порушеннями функціональної активності печінки
- 2 – група хворих, госпіталізованих із гострою печінковою недостатністю

Аналіз вмісту аміаку в сироватці крові пацієнтів з функціональними порушеннями активності печінки (група 1) не показав відхилень від норми, хоча показники сягали верхньої межі норми і навіть у деяких представників дещо перевищували її (рис.1).

Друга група – це хворі, госпіталізовані з діагнозом гострої печінкової недостатності, яка розвинулась на тлі вірусної інфекції та лікування запалення парацетамолом. Рівень аміаку в сироватці крові цих хворих перевищує верхню межу норми майже вдвічі, що дає підстави згідно до інформації, викладеної в [31], запідозрити у них розвиток печінкової енцефалопатії А. Відомо, що печінкова енцефалопатія – найпоказовіший і найчутливіший клінічний прояв печінкової недостатності, який водночас є чітким відображенням її позитивної чи негативної динаміки.

Однак, враховуючи те, що підвищений рівень аміаку в крові є необхідним, проте недостатнім показником для діагностування печінкової енцефалопатії, необхідно додатково проаналізувати ще печінкові проби. Особливо показовими будуть рівень білірубіну та активність АлТ.

**Рис. 2.** Вміст загального білірубіну в сироватці крові пацієнтів із гепатопатологіями

Як бачимо на рис. 2, показники вмісту білірубину в сироватці крові пацієнтів 1 групи незначно перевищують верхню межу норми, тоді як у 2 групі перевищення становить більше, ніж у 3 рази. Такий високий рівень білірубину в сироватці крові хворих з гострою печінковою недостатністю може бути пов'язаний не тільки зі зниженням трансформаційної функції печінки, а й зі зниженням функціональної активності нирок внаслідок гепаторенального синдрому.

**Рис. 3.** Активність АлТ у сироватці крові пацієнтів із гепатопатологіями.

З рис.3. видно, що у групи хворих з порушенням функціональної активності печінки (група 1) рівень АлТ в сироватці крові перевищує верхню межу норми приблизно вдвічі. Незначна білірубінемія, нормальні процеси знешкодження аміаку, вихід АлТ в кров у невеликих кількостях свідчать про підвищення проникності мембран гепатоцитів, але без цитолізу та про відсутність печінкової енцефалопатії.

Дані рис. 3 демонструють десятикратне перевищення норми рівня АлТ у сироватці крові хворих 2 групи. Така висока активність АлТ в сироватці крові з одночасним двократним підвищенням вмісту аміаку пов'язана з цитолізом гепатоцитів і підтверджує наявність печінкової енцефалопатії А у даної групи хворих. Гостра печінкова недостатність, яка характеризується цитолізом гепатоцитів, призводить до втрати трансформаційної функції печінки, внаслідок чого накопичуються ендотоксини, зокрема білірубін, аміак, які здійснюють токсичний системний вплив, зокрема, на нирки, спричиняючи розвиток гепаторенального синдрому.

Основними ранніми лабораторно-біохімічними маркерами гепаторенального синдрому є гіпонатріємія та гіперкреатиніємія. Для перевірки наявності гепаторенального синдрому в хворих, госпіталізованих з гострою печі-

нковою недостатністю їм проведено аналіз вмісту іонів натрію в сироватці крові.

**Рис.4.** Вміст іонів натрію в сироватці крові пацієнтів із гепатопатологіями

Дані рисунка 4 засвідчують помірну гіпонатріємію у хворих 2 групи, що є одним із проявів гепаторенального синдрому.

Незважаючи на те, що нирки можуть активно затримувати натрій при гепаторенальному синдромі гіпонатріємія є одним із його діагностичних тестів. Цей стан погано корегується.

Ще одним важливим діагностичним тестом гепаторенального синдрому є вміст креатиніну в сироватці крові. Креатинін являє собою ангідрид креатину і є продуктом дефосфорилування та неферментативної дегідратації креатинфосфату. Оскільки він виводиться з організму нирками, то гіперкреатиніємія розглядається як маркер порушення видільної функції нирок.

**Рис. 5.** Концентрація креатиніну в сироватці крові пацієнтів із гепатопатологіями

Проведений аналіз вмісту креатиніну в сироватці крові пацієнтів із гепатопатологіями засвідчив наявність гіперкреатиніємії у хворих 2 групи (рис.5).

Отже, у хворих із гострою печінковою недостатністю встановлені 2 основні симптоми порушення роботи нирок – це гіперкреатиніємія та гіпонатріємія, що свідчить про порушення видільної функції нирок під впливом печінкової недостатності, оскільки захворювання нирок в анамнезі даної групи пацієнтів відсутні. Таким чином у хворих 2 групи за допомогою лабораторно-біохімічних досліджень можна діагностувати гепаторенальний синдром.

Щодо 1 групи хворих, то у них відсутні ознаки порушення роботи нирок. Таким чином у 1 групи хворих встановлено незначний рівень гіперферментемії та білірубінемії внаслідок підвищеної проникності мембран гепатоцитів без порушення трансформаційної здатності печінки та без ознак гепаторенального синдрому.

## **Висновки**

За допомогою клініко-біохімічних маркерів здійснено диференційну діагностику наявності гепаторенального синдрому в пацієнтів із гепатопатологіями.

1. Аналіз клініко-біохімічних маркерів сироватки крові в 1 групи хворих засвідчив незначний рівень гіперферментемії та білірубінемії внаслідок підвищеної проникності мембран гепатоцитів без порушення трансформаційної здатності печінки та без ознак гепаторенального синдрому.
2. У хворих із гострою печінковою недостатністю встановлено виражену печінкову енцефалопатію та білірубінемію, що свідчить про втрату трансформаційної здатності печінки внаслідок цитолізу гепатоцитів, на що вказує 10-кратне збільшення показника активності АлТ у сироватці крові.
3. У хворих 2 групи під впливом гострої печінкової недостатності розвинувся гепаторенальний синдром, на що вказує розвиток помірної гіпонатріємії та гіперкреатиніемії при відсутності в анамнезі ознак захворювання нирок до госпіталізації.