

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЧЕВИНЫ В ЖЕЛЧИ У БОЛЬНЫХ С ХИРУРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕПАТОПАНКРЕАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Соснин Д. Ю., Зубарева Н. А.

ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия, Пермь, Россия (614090, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26) psmalf@ru

Описана модификация методики определения мочевины, пригодная для проведения анализа желчи. С ее помощью выполнено сравнительное исследование уровня мочевины и желчи у 198 пациентов с различными хирургическими заболеваниями органов гепатопанкреатобилиарной зоны. Установлена высокая проницаемость гистогематических барьеров печени и одинаковое содержание мочевины в желчи и сыворотке крови. Выявлены закономерности изменения концентрации мочевины в желчи при неосложненном течении послеоперационного периода, при формировании почечной недостаточности и при холангите. При почечной недостаточности уровень мочевины одновременно повышался в желчи и сыворотке крови. Отсутствие разницы между содержанием мочевины в желчи и сыворотке крови позволили предложить способ контроля за азотвыделительной функцией почек по анализу желчи. При анализе концентрации мочевины после 24 часовой инкубации образцов желчи у 6 (17,6 %) из 44 пациентов обнаружено достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение ее уровня. При бактериологическом анализе этих образцов желчи выделены бактерии, продуцирующие уреазу. Предложен способ диагностики холангита, вызванного уреазопродуцирующими бактериям, основанный на изменении концентрации мочевины в желчи.

Ключевые слова: желчь, мочевина, почечная недостаточность, холангит.

## DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INVESTIGATION ON UREA CONCENTRATION IN BILE AT PATIENTS WITH SURGICAL DISEASES OF HEPATOPANCREATIC AREA

Sosnin D. Y., Zubareva N. A.

SBEE HPE Perm State Academy of Medicine, Perm, Russia, (614090, Petropavlovskaya, 26 Perm), psmalf@ru

Modification of the technique for determination of urea, suitable for performing bile analysis is described. Using this method comparative research of urea in blood and bile level at 198 patients with surgical diseases of hepatopancreatic area is made. High permeability of histohematological barriers in hepar and equal contents of urea in bile and blood are revealed. Regularity of urea concentration changing in bile is revealed at non-complicated current in post-operative period, in case renal insufficiency and cholangitis are formed. In case of renal insufficiency the level of urea increased simultaneously in bile and in blood serum. Absence of difference between urea contents in bile and in blood serum allowed to offer the method of control for nitro-excretory renal function according to bile analysis. In case of testing urea concentration after 24 hour incubation of bile samples at 6 (17,6 %) patients out of 44 a reliable ( $p < 0,001$ ) decrease of it's level revealed. In bacteriology study of these bile samples urease-producing bacteria were isolated. The method for diagnosing cholangitis caused by urease-producing bacteria based on urea concentration changing in bile is proposed.

Keywords: bile, urea, renal insufficiency, cholangitis.

### Введение

Желчь является специфическим секретом печени; ее образование и состав характеризуют метаболические процессы в этом органе. Лабораторное исследование желчи позволяет выявить патологию желчевыводящих путей и изменения внешнесекреторной функции печени, которые развиваются при ряде заболеваний [1, 6, 7]. Получение образцов желчи после операций, завершающихся наружным дренированием желчевыводящих путей: холедоха, желчного пузыря, крупных внутривнутрипеченочных протоков, не представляет трудностей. Однако данные об изменениях состава желчи у пациентов с хирургической

патологией панкреатобилиарной системы немногочисленны, а диагностическое значение подобных исследований не определено.

Развитие почечной недостаточности сопровождается накоплением в сыворотке крови азотистых шлаков (креатинина и мочевины), исследование которых используется в рутинной клинической практике для оценки тяжести этой патологии. Показано, что анализ этих соединений в других биологических жидкостях организма, например, слезе [4] или экссудатах, оттекающих по наружным дренажам из брюшной полости, также имеет клинико-диагностическое значение [5]. В то же время состав мочевины в желчи практически не изучен, хотя в раннем послеоперационном периоде эта биологическая жидкость свободно оттекает по наружным дренажам, и ее сбор для исследования не представляет никаких трудностей.

Изучение компонентов желчи затрудняется высоким содержанием в ней желчных пигментов, которые не просто мешают измерению оптической плотности, но и часто меняют ход реакции, вступая в химическое взаимодействие с различными реактивами [1].

**Цель исследования** – разработать простой метод определения концентрации мочевины. С его помощью изучить динамику концентрации мочевины в желчи в раннем послеоперационном периоде и оценить диагностические возможности ее исследования.

**Материалы и методы.** Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинской декларации. С целью оценки возможности исследования желчи для диагностики почечной недостаточности провели параллельное определение концентрации мочевины в сыворотке крови и желчи у 198 больных (101 мужчина и 97 женщин) высокого операционного риска. Причинами оперативного вмешательства являлись различные хирургические заболевания органов гепатопанкреатобилиарной системы, в том числе 16 – с острым бескаменным холециститом, 24 – с острым калькулезным холециститом; 44 – с холедохолитиазом; 21 – с рубцовым стенозом большого дуоденального сосочка (БДС); 42 – с опухолями поджелудочной железы и БДС; 51 – с деструктивным панкреатитом. У 85 (42,9 %) была зарегистрирована механическая желтуха. У 64 (32,3 %) пациентов наблюдались клинико-лабораторные признаки острого гнойного холангита.

Исследовано 48 образцов пузырьной желчи, а наличие функционирующих наружных дренажей желчевыводящих путей позволило провести исследование печеночной желчи в динамике на 1–2, 3–4, 6–7 и 10–14 сутки после декомпрессии. У 37 (18,7 %) пациентов после операции зарегистрировали уменьшение объема диуреза с нарастанием уровня креатинина и мочевины в сыворотке крови, что свидетельствовало о развитии у них острой почечной недостаточности.

Концентрацию мочевины в сыворотке крови и желчи определяли унифицированным методом по цветной реакции с диацетилмоноксимом [2]. Выбор этой методики был обусловлен возможностью ее адаптации для анализа желчи. Необходимость изменения существующего метода возникла из-за влияния желчных пигментов на ход течения реакции. Для их удаления использовали сорбцию желчных пигментов на альбумине, с последующим осаждением трихлоруксусной кислотой. Для этого к 0,1 мл желчи добавляли 0,1 мл 10 % раствора альбумина, приготовленного из лиофилизированного препарата бычьего сывороточного альбумина (Serva, Германия), перемешивали, инкубировали 10–15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 0,8 мл 10 % ТХУ, еще раз перемешивали, инкубировали 10–15 минут и центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин на центрифуге ОПН-3 или аналогичной. Параллельно аналогичным способом обрабатывали и эталонный раствор мочевины. Дальнейшему исследованию подвергали надосадочную жидкость. Учитывая конечное разведение желчи и экссудатов в 10 раз, брали 0,1 мл прозрачного бесцветного супернатанта, который смешивали с 2,0 мл реакционной смеси и далее обрабатывали по стандартной методике определения мочевины в сыворотке крови. Использовались наборы фирмы Лахема (Чехия), измерения выполняли на полуавтоматическом фотометре Clima M – 15.

Результаты обработаны при помощи пакета программ Statistica 6.0 Microsoft и Office Excell 2003. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Для описания полученных количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовалось среднее арифметическое:  $M \pm$  одно среднее стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Для корреляционного анализа применялся расчет средних величин показателей корреляционных отношений для количественных признаков по Пирсону ( $r$ ). Связь между показателями оценивалась как сильная при  $r > 0,7$ , средней силы – при  $r$  от 0,3 до 0,7, слабая – при  $r < 0,3$ . Различия между выборками считались статистически достоверными при значении для  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и обсуждение**

Концентрация мочевины в сыворотке крови и желчи, полученной из желчного пузыря и холедоха, была практически идентичной. Уровень мочевины в сыворотке крови и пузырной желчи составил соответственно  $6,03 \pm 3,02$  ммоль/л и  $5,96 \pm 3,59$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ). Цифровые значения изученного показателя для протоковой желчи и сыворотки крови были равны  $4,88 \pm 3,02$  ммоль/л и  $4,92 \pm 2,96$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ). При корреляционном анализе обнаружена тесная положительная связь между содержанием мочевины в сыворотке крови и желчи. Коэффициент корреляции для пузырной желчи составил 0,91, для протоковой – 0,92. Тесная корреляционная связь между уровнем мочевины в сыворотке крови и желчи не

зависела и от характера патологии (табл. 1) и сохранялась в послеоперационном периоде ( $r = 0,91$ ).

Таблица 1

**Концентрация мочевины (ммоль/л) в сыворотке крови и желчи ( $M \pm \sigma$ ) при различной патологии**

Нозологическая форма	Сыворотка крови	Желчь	r
Желчнокаменная болезнь (n = 105)	5,68 ± 2,38	5,73 ± 2,65 p > 0,1	0,91
Деструктивный панкреатит (n = 51)	6,92 ± 2,67	6,99 ± 2,71 p > 0,1	0,92
Опухоли поджелудочной железы (n = 42)	10,12 ± 3,31	10,42 ± 3,62 p > 0,1	0,90

*Примечание:* p – различие между сывороткой крови и желчью.

При развитии почечной недостаточности концентрация мочевины в желчи увеличивалась одновременно с сывороткой крови (табл. 2). Высокая степень корреляции сохранялась как в области физиологических значений концентрации мочевины, так и при развитии почечной недостаточности ( $r = 0,93$ ), что указывает на высокую проницаемость гистогематических барьеров печени и желчевыводящих путей для этого соединения. Однотипность изменений и сильная корреляционная зависимость уровня мочевины в этих биологических жидкостях вне зависимости от характера патологии позволили предложить «Способ диагностики уремии у лиц с наружным дренированием желчных путей» (Патент RU 2109284 C1 20.04.1998).

Таблица 2

**Концентрация мочевины (ммоль/л) в сыворотке крови и желчи ( $M \pm \sigma$ ) в послеоперационном периоде**

Течение послеоперационного периода	Сроки исследования после операции (сутки)			
	1–2	3–4	6–7	10–14
Без почечной недостаточности (n = 161)	<u>6,73 ± 1,84</u>	<u>5,73 ± 2,14</u>	<u>6,07 ± 1,98</u>	<u>6,56 ± 2,29</u>
	6,89 ± 2,02 p > 0,1 n = 161	5,63 ± 2,30 p > 0,1 n = 158	5,89 ± 2,03 p > 0,1 n = 78	6,72 ± 2,11 p > 0,1 n = 14
Почечная недостаточность (n = 37)	<u>8,03 ± 2,94</u>	<u>16,43 ± 8,08</u>	<u>19,81 ± 10,13</u>	<u>29,18 ± 14,04</u>
	8,14 ± 3,11 p > 0,1 n = 37	15,99 ± 7,72 p > 0,1 n = 33	20,04 ± 11,48 p > 0,1 n = 16	29,89 ± 14,87 p > 0,1 n = 5

*Примечание:* в числителе – концентрация в сыворотке крови;  
в знаменателе – концентрация в желчи;  
p – различие между сывороткой крови и желчью.

При исследовании образцов биологических жидкостей пациентов с острым гнойным холангитом в 7 (10,9 %) случаях было обнаружено более низкое содержание мочевины в желчи в сравнении с сывороткой крови. Так, цифровые значения изученного показателя составили соответственно 11,72 ± 3,32 ммоль/л для сыворотки и 8,93 ± 2,27 ммоль/л для желчи. В среднем в каждой паре этих образцов желчи и сыворотки исходная концентрация мочевины в желчи была на 2,7 ммоль/л (разброс от 1,2 до 3,8 ммоль/л) ниже, чем в сыворотке

крови ( $p < 0,01$  для связанных показателей). При инкубации в термостате при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  этих образцов желчи и сыворотки крови в течение шести часов снижение уровня мочевины обнаружили только в желчи. Выявленные различия в уровне мочевины в сыворотке и желчи у пациентов с холангитом позволили предположить возможность ее разрушения ферментами микроорганизмов, вызывающих воспаление в желчевыводящих путях, например уреазой *Helicobacter pylori*, которые могут инфицировать билиарные пути [8].

Для изучения природы этого явления провели дополнительные исследования. Параллельно полученные образцы сыворотки крови и желчи от 34 больных с холангитом инкубировали в термостате при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. Концентрацию мочевины в исследуемых образцах измеряли через 3, 6, 9, 12 и 24 часа инкубации (табл. 3).

Таблица 3

**Динамика концентрации мочевины (ммоль/л) в сыворотке крови и желчи больных холангитом ( $M \pm \sigma$ )**

	Длительность инкубации при $37^{\circ}\text{C}$ (час)					
	Исходный уровень	3	6	9	12	24
Группа А (n = 28)	$\frac{7,44 \pm 1,07}{7,34 \pm 1,23}$ $p > 0,1$	$\frac{7,32 \pm 1,16}{7,28 \pm 1,19}$ $p > 0,1$	$\frac{7,34 \pm 1,11}{7,30 \pm 1,22}$ $p > 0,1$	$\frac{7,41 \pm 1,27}{7,40 \pm 1,19}$ $p > 0,1$	$\frac{7,36 \pm 1,15}{7,25 \pm 1,36}$ $p > 0,1$	$\frac{7,37 \pm 1,35}{7,38 \pm 1,27}$ $p > 0,1$
Группа В (n = 6)	$\frac{12,94 \pm 1,24}{11,83 \pm 1,28}$ $p = 0,547$	$\frac{12,87 \pm 1,33}{10,44 \pm 1,68}$ $p = 0,283$	$\frac{12,91 \pm 1,32}{9,16 \pm 2,17}$ $p = 0,171$	$\frac{12,89 \pm 1,33}{8,01 \pm 1,88}$ $p = 0,060$	$\frac{12,77 \pm 1,24}{7,44 \pm 1,92}$ $P = 0,042$	$\frac{12,69 \pm 1,35}{3,07 \pm 1,57}$ $p < 0,001$

*Примечание:* в числителе – концентрация мочевины в сыворотке крови;  
в знаменателе – концентрация мочевины в желчи;  
p – различие между концентрацией мочевины в сыворотке крови и желчи.

Во всех исследованных образцах сыворотки крови за время инкубации достоверного снижения концентрации мочевины не отмечено ( $p > 0,1$ ). Динамика концентрации мочевины в желчи была разнообразной. В большей части образцов 28 (82,4 %), которые составили группу А, концентрация мочевины в желчи достоверно не отличалась от таковой в сыворотке крови и не изменялась в процессе инкубации ( $p > 0,1$ ). В 6 (17,6 %) образцах (группа В) зарегистрировано достоверное снижение концентрации мочевины по сравнению с сывороткой крови за время инкубации. При этом в четырех из этих образцов исходная концентрация мочевины была несколько ниже, чем в сыворотке крови, но различие не являлось статистически достоверным ( $p > 0,05$ ) и было ниже коэффициента вариации методики, используемой в лаборатории.

Средняя концентрация мочевины в образцах группы В через 12 часов инкубации стала достоверно ниже, чем в сыворотке крови ( $p < 0,05$ ). При бактериологическом исследовании образцов желчи, инкубация которых сопровождалась уменьшением

концентрации мочевины, в них был обнаружен рост бактерий, которые продуцировали уреазу (*Proteus mirabilis*., *Citrobacter freundii* и др).

Таким образом, более низкий уровень мочевины в части образцов желчи был связан не с изменением проницаемости гистогематических барьеров желчевыводящих путей, а с появлением в желчи факторов, разрушающих мочевины, в частности, фермента уреазы.

Учитывая, что клетки человека лишены способности синтезировать этот фермент, обнаружение уреазной активности в биологических жидкостях является свидетельством инфицирования их микроорганизмами. Выявление этого фермента может осуществляться по снижению концентрации мочевины, поэтому уменьшение концентрации мочевины в желчи после инкубации при 37 °С свидетельствует о наличии в ней микроорганизмов, обладающих уреазной способностью и участвующих в развитии воспалительного процесса. Учитывая, что максимально допустимый коэффициент воспроизводимости при лабораторном исследовании концентрации мочевины, предусмотренный приказом № 45 [3], составляет 5 %, наличие холангита, обусловленного уреазопродуцирующими микроорганизмами, предполагали при снижении уровня мочевины на 10 % и более от ее исходной концентрации.

Учитывая, что классическое бактериологическое исследование желчи занимает 48–96 часов, нами предложен экспресс-способ диагностики воспалительного процесса в желчных путях, обусловленного микроорганизмами, продуцирующими уреазу «Способ диагностики холангита, вызванного уреазопродуцирующими микроорганизмами» (Патент RU 2125729 27.01.1999). Данный способ позволяет обнаружить уреазную активность в желчи в течение 4 часов и диагностировать холангит, вызванный уреазопродуцирующими микроорганизмами. Учитывая спектр возможных возбудителей, обладающих способностью продуцировать уреазу, это позволяет более адекватно выбирать препараты для проведения антибактериальной терапии.

### **Заключение**

Таким образом, предложенный способ определения концентрации мочевины в желчи позволил установить ряд закономерностей ее содержания в этой биологической жидкости и оценить клинико-диагностическое значение этого лабораторного показателя.

Содержание мочевины в желчи не отличается от ее концентрации в сыворотке крови, что обусловлено высокой проницаемостью гистогематических барьеров печени для данного соединения. Обнаруженная закономерность сохраняется как при физиологическом уровне мочевины, так и при ее увеличении у пациентов с почечной недостаточностью. Динамика концентрации мочевины в желчи соответствует изменению ее содержания в сыворотке крови. Снижение содержания мочевины в желчи в ходе ее инкубации может быть одним из признаков наличия бактериохолии, вызванной микроорганизмами, продуцирующими уреазу.

Обнаруженные закономерности динамики уровня мочевины имеют не только теоретическое значение, но и практическую ценность. Предложенные новые способы диагностики позволяют использовать анализ желчи для мониторинга азотвыделительной функции крови и диагностики холангита, вызванного уреазопродуцирующими микроорганизмами.

#### Список литературы

1. Ганиткевич Я. В., Карбач Я. И. Исследование желчи. Биохимические и биофизические методы. – Киев: Вища шк. Головное изд-во, 1985. – 136 с.
2. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
3. Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 года «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
4. Терехина Н. А., Петрович Ю. А. Диагностическое значение анализа слезы при уремии, урекемии и холестеренемии // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 6. – С. 17–18
5. Черешнев В. А., Зубарева Н. А., Соснин Д. Ю. Диагностическое значение исследования креатинина в экссудатах брюшной полости // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 3. – С. 11–14.
6. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и жёлчных путей: практич. рук-во: пер. с англ. / под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухина. – М.: Гэотар Медицина, 1999. – 864 с.
7. Kimura Y. Takada T., Kawarada Y. Definitions, pathophysiology, and epidemiology of acute cholangitis and cholecystitis: Tokyo guidelines // J. hepatobiliary pancreat. surg. – 2007. – Vol. 14. – № 1. – P. 15–26.
8. Tiwari S. K., Khan A. A., Ibrahim M. Helicobacter pylori and other Helicobacter species DNA in human bile samples from patients with various hepato-biliary diseases World J. Gastroenterol., 2006 Apr 14;12 (14):2181–6.

#### Рецензенты:

Раев М. Б., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УРО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного научно-исследовательского университета, г. Пермь.

Долгих О. В., д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФГУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь.