

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХОЛАНГИТА



Р. С. Шило, Э. В. Могилевец, К. С. Белюк, Н. И. Прокопчик, В. В. Ващенко
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Фотодинамическая терапия острого холангита предполагает введение фотосенсибилизатора внутрь общего желчного протока и последующее лазерное облучение печени. Перспективным является изучение комбинированного лазерного воздействия на печень.

Цель. Оценить в эксперименте эффективность фотодинамической терапии острого холангита с введением фотосенсибилизатора в общий желчный проток и комбинированным лазерным облучением печени.

Материал и методы. У кроликов был смоделирован острый холангит. В 1 группе в общий желчный проток вводился физиологический раствор, во 2 и 3 – «Фотолон». Далее во 2 группе выполнялась фотодинамическая терапия с эндохоледохеальным лазерным облучением печени, в 3 – с комбинированным облучением. Оценивалось общее состояние животных, их лабораторные, микроскопические и микробиологические показатели. После аутопсии производилось гистологическое исследование печени и общего желчного протока.

Результаты. На вторые сутки эксперимента у всех кроликов развивался острый холангит. После лечения в группе «Опыт 3» по сравнению с другими группами отмечалось снижение показателей воспаления и холестаза в крови, количества микроорганизмов и лейкоцитов в желчи. В 1 группе гистологически отмечено формирование абсцессов печени. Патологические изменения стенки общего желчного протока и печени в 3 группе были менее выраженными, чем во 2.

Выводы. 1. Экспериментальная модель позволяет на вторые сутки воспроизводить острый холангит у кроликов. 2. Фотодинамическая терапия фотосенсибилизатором «Фотолон» с комбинированным (эндохоледохеальным и поверхностным) лазерным облучением печени оказывает более выраженное бактерицидное действие по сравнению с эндохоледохеальным ее облучением.

Ключевые слова: фотолон, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, эндохоледохеальное облучение печени, комбинированное лазерное облучение, общий желчный проток, холедох.

Для цитирования: Фотодинамическая терапия экспериментального холангита / Р. С. Шило, Э. В. Могилевец, К. С. Белюк, Н. И. Прокопчик, В. В. Ващенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2021. Т. 19, № 1. С. 96-105. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-1-96-105>.

Актуальность

Антимикробная фотодинамическая терапия острого холангита (ОХ) – это метод лечения, основанный на применении света определенной длины волны и светочувствительных веществ – фотосенсибилизаторов. Последние могут вводиться в организм или внутривенно, или местно, обладают свойством избирательного накопления в микробных клетках с повышенной митотической активностью. После облучения таких клеток светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения конкретного фотосенсибилизатора, происходит фотохимическая реакция, в результате которой молекулярный триплетный кислород превращается в синглетный или образуется большое количество высокоактивных кислородсодержащих радикалов. Синглетный кислород и радикалы вызывают гибель микробных клеток по механизму некроза и апоптоза. Активные формы кислорода, воздействуя на элементы микробной клетки (белки, липиды, нуклеиновые кислоты), оказывают прямое повреждающее действие.

Описанные в литературе методики фотодинамической терапии ОХ [1, 2, 3] предполагают эндохоледохеальное или транскутанное лазерное облучение печени для активации фотосенсибилизатора. Первый вариант позволяет облучить из всего желчевыводящего дерева лишь площадь общего желчного протока (ОЖП), общего

печёночного и долевых протоков из-за несоответствия диаметра световода диаметру сегментарных долевых протоков. При втором способе лазерного облучения печени по мере прохождения через морфологические структуры излучение затухает, его мощность уменьшается в экспоненциальной форме. Глубина проникновения лазера красного спектра в мышечную ткань составляет 2 см, кожа с мышцей (толщиной в 1 см) при этой же длине волны имеет коэффициент пропускания света лишь 12 [4]. Транскутанное облучение печени не позволяет проникнуть лазерному излучению глубоко в ткань печени, а при выраженной подкожно-жировой клетчатке не позволит ему проникнуть даже в поверхностные слои печени, что и определяет в итоге его низкое биологическое действие.

Таким образом, для повышения эффективности лечения ОХ перспективным представляется изучение фотодинамической терапии с комбинированным лазерным облучением печени.

Цель – оценить в эксперименте эффективность фотодинамической терапии острого холангита с введением фотосенсибилизатора в общий желчный проток и комбинированным лазерным облучением печени.

Материал и методы

Все исследования проводили с соблюдением этических норм обращения с животными. У 18 беспородных кроликов (самки) массой тела

4,5±0,35 кг (M±σ, где σ – стандартное отклонение) была воспроизведена экспериментальная модель ОХ (патент на изобретение № 21306 «Способ моделирования острого гнойного обтурационного холангита» от 09.03.2015) [5]. После выполнения лапаротомии и гастротомии проводили дренаж с боковым отверстием через двенадцатиперстную кишку в ОЖП так, чтобы отверстие находилось в просвете кишки. В желудке катетер фиксировался по Штамму. Холодох в своей дистальной части перевязывался узловым швом на проведенном катетере для фиксации последнего и исключения попадания желчи в двенадцатиперстную кишку мимо дренажа (рис. 1).

В ОЖП вводили микробную взвесь *E. Coli* в разведении 1×10^5 КОЕ/мл на стерильном растворе 0,9% натрия хлорида в объеме 1 мл (0,2 мл/кг массы) (рис. 2).

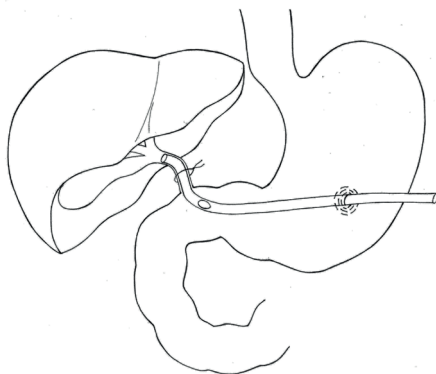


Рисунок 1. - Схема операции. Дренаж проведен через желудок и двенадцатиперстную кишку в общий желчный проток, наложена лигатура на его дистальную часть вместе с дренажем для фиксации и предотвращения протекания желчи в кишку

Figure 1. - The scheme of the operation. Drainage is carried out through the stomach and duodenum into the common bile duct, a ligature is applied to its distal part along with drainage to fix and prevent the flow of bile into the intestine

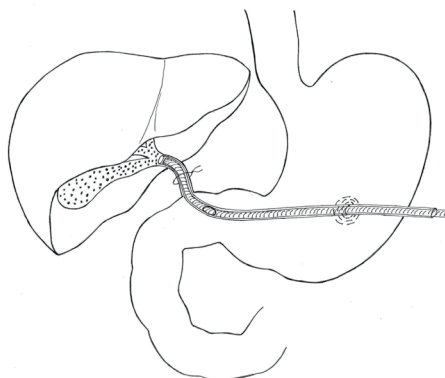


Рисунок 2. - Схема операции. Моделирование острого холангита. В желчевыводящее дерево введена микробная взвесь *E. Coli*, в дренаж вставлен катетер для предотвращения протекания взвеси в кишку

Figure 2. - The scheme of the operation. Modeling of acute cholangitis. A microbial suspension of *E. Coli* was introduced into the bile tree, and a catheter was inserted into the drainage to prevent the suspension from flowing into the intestine

Операционная рана послойно ушивалась. В качестве дренажа использовался катетер Fogarty 4F, так как его внутренний диаметр при извлечении проводника позволяет провести световод от лазерного аппарата. При наличии в катетере проводника достигался механический блок для оттока желчи, при частичном извлечении проводника освобождалось боковое отверстие дренажа и обеспечивался ток желчи в двенадцатиперстную кишку. Причем диаметр отверстия соответствовал диаметру ОЖП (1-2 мм), тем самым моделировалась естественная скорость движения желчи у животного. Для введения микробной взвеси в желчевыводящую систему, а также для забора желчи из ОЖП на исследование в дренаж с боковым отверстием после извлечения проводника вводился более тонкий катетер Fogarty 3F, внешний диаметр которого соответствует внутреннему диаметру дренажа, фиксированного в протоке.

Выбор возбудителя и его концентрации был обусловлен данными литературы, по которым *E. Coli* при ОХ высевается в 50-60% случаев [6].

Всем кроликам после моделирования ОХ на вторые сутки эксперимента выполнялись повторная лапаротомия, снятие механического блока для оттока желчи, эвакуация инфицированной желчи.

В зависимости от метода лечения животные были разделены на 3 опытные группы, по 6 в каждой. Животным 1 группы в желчевыводящее дерево через дренаж вводился физиологический раствор на 3 минуты под давлением 220 мм водного столба. Для этого использовался трехпросветный переходник, соединенный с аппаратом Вальдмана для измерения давления. Во 2 группе проводился сеанс фотодинамической терапии с эндохоледохеальным лазерным облучением общего желчного, печёночного и долевых протоков. С помощью трехпросветного переходника в ОЖП вводили 10 мг «Фотолон», разведенного в 10 мл 0,9% раствора натрия хлорида (согласно инструкции по применению – 2,0-2,5 мг/кг массы тела). Такая концентрация фотосенсибилизатора при введении в ОЖП под давлением 220 мм водн. ст. в течение трех минут не вызывает холангиовенозного рефлюкса, морфологических изменений в тканях печени и не обладает токсическим воздействием на организм экспериментального животного [7, 8].

Эндохоледохеальное лазерное облучение проводили лазерным аппаратом «СНАГ-СЭНС-К» с длиной волны 670 нм на основе полупроводникового лазера. Аппарат разработан для проведения внутрисполостной фотодинамической терапии с использованием «Фотолон», характеризуется повышенной интенсивностью лазерного излучения «красной» области спектра, что обеспечивает проведение фоторегуляторной терапии с максимально глубоким проникновением излучения в ткань. Моноволокнистый световод длиной 30 см через дренаж проводили в ОЖП, общий печёночный и долевые протоки (рис. 3).

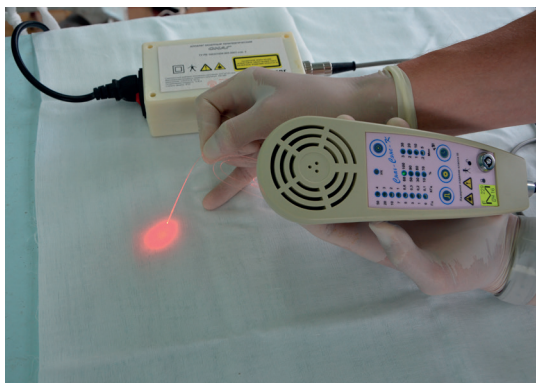


Рисунок 3. - Лазерный аппарат «Снаг-Сэнс-К» со световодом для эндохоледохолеального облучения
Figure 3. - Laser device "Снаг-Сэнс-К" with a light guide for endocholechoeal irradiation

Проведение световода в желчных протоках контролировали визуально таким образом, чтобы на каждые 5 мм длины желчных протоков экспозиция лазерного света была длительностью 30 секунд. Длина волны при этом составила 670 нм (0,67±0,02 мкм), мощность излучения на дистальном конце световода – 30 мВт, плотность дозы – 25-30 Дж/см². Выбор таких параметров лазерного облучения связан с обзором клинических исследований «Фотолона» в хирургии, в которых доза светового воздействия при фотодинамической терапии гнойно-воспалительных заболеваний варьирует от 20 до 70 Дж/см² в зависимости от локализации, размера и гистопатологического типа очага [1, 2, 9, 10]. Во избежание гипертермии использовали расход потока энергии ниже 100 мВт/см².

Длительность светового воздействия (дозу) рассчитывали по формуле:

$$D = \frac{P}{S} \times t,$$

где D – плотность дозы, Дж/см²; P – мощность излучения, Вт; S – площадь поверхности (сечения протока), см²; t – время экспозиции (сек.).

Кроликам 3 группы после введения «Фотолона» в ОЖП на 3 минуты под давлением 220 мм водн. ст. проводили комбинированное лазерное облучение печени – эндохоледохолеальное (аналогичным во 2 группе способом) и поверхностное (непосредственно висцеральной и диафрагмальной поверхностями печени, согласно ее сегментарному строению). Такой способ позволяет лазерному излучению проникнуть до 2 см в глубину органа [4]. При этом происходит активация «Фотолона» и фотодинамическая реакция во внутрипечёночных протоках. Оказывается также и стимулирующее действие низкоинтенсивного лазерного излучения на ткань печени для ее регенерации [11]. Для этого использовали аппарат «СНАГ-СЭНС-К» в непрерывном режиме, с длиной волны 670 нм (0,67±0,02 мкм), мощностью излучения 300 мВт, плотностью мощности воздействующего излучения 1000 мВт/см², доза светового воздействия – 30 Дж/см² (рис. 4).



Рисунок 4. - Лазерный аппарат «Снаг-Сэнс-К» с включенным лучом для облучения печени
Figure 4. - Laser device "Снаг-Сэнс-К" with the included beam for irradiation of the liver

Длительность экспозиции составила 30 секунд на каждое поле (всего 5,5 минуты), места облучения печени лазером представлены на рисунках 5-6.

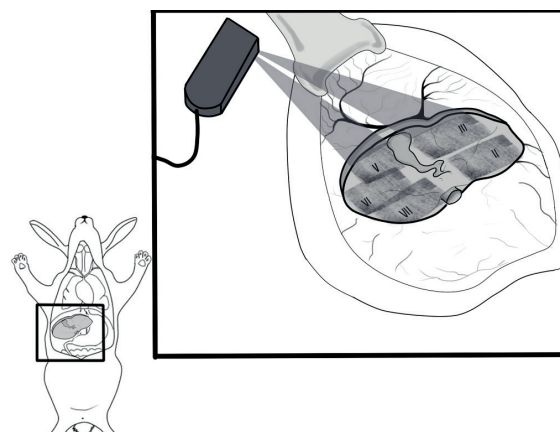


Рисунок 5. - Лазерное облучение висцеральной поверхности печени согласно сегментарному ее строению
Figure 5. - Laser irradiation of the visceral surface of the liver according to its segmental structure

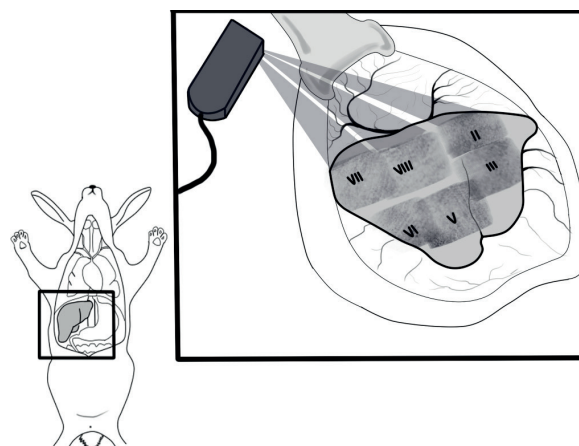


Рисунок 6. - Лазерное облучение диафрагмальной поверхности печени согласно сегментарному ее строению
Figure 6. - Laser irradiation of the diaphragmatic surface of the liver according to its segmental structure

Во всех группах операция завершалась освобождением бокового отверстия дренажа в двенадцатиперстной кишке для свободного оттока желчи (рис. 7). Рана послойно зашивалась.

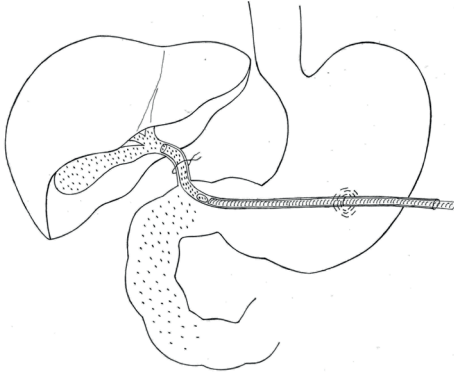


Рисунок 7. – Схема операции. Снятие механического блока для оттока желчи – проводник подтянут проксимальнее бокового отверстия в дренаже

Figure 7. – The scheme of the operation. Removal of the mechanical block for the outflow of bile-the conductor is pulled up proximal to the side hole in the drainage

Лапаротомия требовалась для лечения холангита лишь в 3 группе, так как в первых двух запланированный объем лечебных мероприятий позволяла выполнить (без операции) разработанная модель холангита. Однако для чистоты эксперимента лапаротомия была выполнена всем кроликам.

Для оценки эффективности лечения ОХ проводилось наблюдение за животными (активность, наличие аппетита, ректальная температура, частота сердечных сокращений). Определялись общий и биохимический анализы крови – исследовались показатели воспаления и холестаза (лейкоциты, формула крови, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза, билирубин, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза). У 6 случайных кроликов кровь на исследование была взята до начала эксперимента для определения показателей «здоровых» животных (группа «Контроль»). Кровь забиралась также на вторые и четвертые сутки эксперимента. Через дренаж ОЖП забиралась желчь для микробиологического и микроскопического исследования до введения микробной взвеси, на вторые и четвертые сутки эксперимента. Биологические материалы доставляли в лабораторию в течение получаса после забора. Для выявления в желчи аэробных и факультативно-анаэробных бактерий производили ее посев в количестве 0,1 мл на чашку Петри с неселективной питательной средой – 1% глюкозный МПА. Микроскопию желчи выполняли после приготовления из нее тонких мазков, окрашенных 1% водным раствором метиленового синего, при этом под микроскопом определяли количество лейкоцитов в полях зрения.

Кролики во всех группах выводились из эксперимента на пятые сутки. У животных во время аутопсии производилась морфологическая оценка изменений желчевыводящей системы, стен-

ки ОЖП и ткани печени. Участок ОЖП и ткань печени отправлялись на гистологическое исследование, после проводки в спиртах восходящей концентрации материал заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Полученные данные обрабатывались при помощи программы «Statistica 10.0» с применением непараметрических методов исследования для двух и нескольких независимых выборок. Полученные данные представлены в виде медианы и межквартильных размахов Ме [25%, 75%]. Статистическая значимость различий в уровнях признака между двумя независимыми группами определялась с помощью критерия Манна-Уитни, между несколькими – с помощью критерия Краскела-Уолисса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На вторые сутки эксперимента у кроликов всех групп отчетливо были выражены клинические и лабораторные признаки ОХ. Отмечались снижение их двигательной активности, отказ от пищи, тахикардия и повышение температуры тела до 40°C.

Лабораторно во всех группах отмечены признаки общего воспаления в организме: лейкоцитоз до $16 \times 10^9/\text{л}$ со сдвигом формулы влево (палочкоядерных нейтрофилов до 17%), повышение СОЭ до 50 мм/ч. Уровень общего билирубина, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы у всех животных во много раз превышал показатели в группе «Контроль», что подчеркивает развитие обязательного для ОХ фактора – холестаза. Нарушение функции печени подтверждали путем определения аланинаминотрансферазы и аспарагинаминотрансферазы, показатели которых во много раз превышали свои изначальные уровни. Причем статистически значимых различий в показателях крови опытных групп между собой не выявлено, а при попарном сравнении все они статистически отличались от группы «Контроль» (табл. 1).

Во всех опытных группах до моделирования ОХ роста на питательных средах микроорганизмов не было, что свидетельствует о том, что в норме желчь стерильная. После моделирования ОХ во всех группах выявлен отчетливый динамический рост анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий на 1% глюкозном МПА, характерный для ОХ. Микроскопия выявила наличие в желчи лейкоцитов (при их отсутствии в контрольной группе), что также подчеркивает развитие воспалительного процесса в желчевыводящих протоках (табл. 2).

Состояние животных менялось с первых суток эксперимента. Кролики становились вялыми, малоподвижными, отказывались от воды и пищи (в сравнении с неоперированными животными). Ко вторым суткам эти симптомы были более выраженными. В 1 группе отмечалась тахикардия до 180 ударов в минуту и гипертермия до 40,5°C. Четверо животных (67%) этой группы погибли на четвертые сутки эксперимента, двое

Таблица 1. – Лабораторные показатели крови кроликов разных групп на вторые сутки эксперимента после моделирования острого холангита

Table 1. – Laboratory blood parameters of rabbits of different groups on the 2nd day of the experiment after modeling acute cholangitis

Показатели, ед. измерения	Группа «Контроль»	Группа «Опыт 1»	Группа «Опыт 2»	Группа «Опыт 3»
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	4,45 [3,9; 5,15] * \square \circ	15,65 [14,8; 16,5]	15,9 [15,4; 17,1]	16 [15,8; 17,6]
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2 [1,2; 2,7] * \square \circ	17 [15; 19]	17,5 [17; 19]	17,5 [16; 18]
СОЭ, мм/ч	6,5 [5,2; 7,7] * \square \circ	49 [46; 54]	48 [46; 50]	48 [43; 53]
АЛАТ, Ед/л	31 [28,5; 34,2] * \square \circ	76 [72; 80]	77 [74; 79]	74 [72; 78]
АСАТ, Ед/л	21 [19,2; 22,7] * \square \circ	46 [44; 48]	45 [43; 52]	46 [40; 49]
Общий билирубин, мкмоль/л	6,3 [5,8; 7,1] * \square \circ	61,7 [58,5; 68,5]	60,25 [58,8; 66,2]	65 [62; 68]
Щелочная фосфатаза, Ед/л	77,2 [74,5; 79,8] * \square \circ	172,95 [168,4; 178,8]	173,65 [169; 178,3]	174,25 [165; 177]
ГГТП, Ед/л	58,5 [54; 60,7] * \square \circ	150,1 [147,3; 152,4]	149,65 [147,6; 152,6]	149,75 [148; 152]

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 1»; \square – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 2»; \circ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 3». Различий уровня признака в опытных группах не выявлено

Таблица 2. – Результаты бактериологического и микроскопического исследования желчи у экспериментальных животных на вторые сутки эксперимента

Table 2. – Results of bacteriological and microscopic examination of bile in experimental animals on the 2nd day of the experiment

Показатель развития холангита	Группа «Опыт 1»	Группа «Опыт 2»	Группа «Опыт 3»	Критерий Краскела-Уоллиса: $H(2, N=18)$	p
Наличие роста на 1% глюкозном МПА, КОЕ ($\times 10^5$)	177,5 [174; 186]	179 [176; 185]	180,5 [172; 186]	0,0912080	0,9554
Количество лейкоцитов в поле зрения, Ед	52 [48; 55]	53 [48; 56]	57 [49; 59]	0,8309154	0,6600

(33%) – на пятые сутки. Во 2 и 3 группах смертности не было. В группе «Опыт 2» на пятые сутки эксперимента кролики начинали более активно двигаться по клетке, однако у 3 из 6 (50%) отмечался отказ от пищи, сохранялась температура до 40°C и тахикардия до 175 в минуту. Более выраженная динамика наблюдалась в группе «Опыт 3» – к пятым суткам эксперимента все кролики передвигались по клетке, принимали пищу, ЧСС и температура не превышали своих дооперационных значений (ЧСС – до 160 ударов в минуту и температура – до 39°C).

Лабораторные показатели крови, а также результаты бактериологического и микроскопического исследования желчи на четвертые сутки эксперимента приведены в таблицах 3-4. Кровь и желчь в первой опытной группе у всех животных забиралась до их гибели.

Как видно из таблицы 3, в 1 группе воспалительные изменения прогрессивно нарастали, и к четвертым суткам эксперимента лейкоцитоз достигал $14 \times 10^9/\text{л}$, палочкоядерный сдвиг составил 15%. После лечения во 2 группе показатели ОАК и БАК статистически значимо снизились по сравнению с таковыми в 1 группе, однако на пятые сутки сохранялся умеренный лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг держался на уровне 9 [8; 11]. Значения общего билирубина, АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, ГГТП снизились, однако не отличались от аналогичных показателей в 1 группе. Отчетливая статистически значимая динамика снижения показателей холестаза наблюдалась в группе «Опыт 3», к пятым суткам количество лейкоцитов пришло в норму, палочкоядерный сдвиг был незначительным.

Таблица 3. – Лабораторные показатели крови у кроликов разных групп на четвертые сутки эксперимента

Table 3. – Laboratory blood parameters of rabbits of different groups on the 4th day of the experiment

Показатели, д. измерения	Группа «Опыт 1»	Группа «Опыт 2»	Группа «Опыт 3»
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	14,15 [13,9; 14,7]	9,25 [8,9; 9,4]*	5,8 [5,2; 6,3]* \square
Палочкоядерные нейтрофилы, %	15 [12; 17]	9 [8; 11]*	5,5 [5; 6]* \square
СОЭ, мм/ч	42,5 [40; 44]	30,5 [28; 34*]	15 [14; 17]* \square
АЛАТ, Ед/л	65 [60; 66]	53,5 [51; 55]*	39,5 [38; 41]* \square
АСАТ, Ед/л	37,5 [36; 40]	32,5 [29; 34]*	26,5 [24; 27]* \square
Общий билирубин, мкмоль/л	11,95 [10,5; 12,7]	10,7 [9,2; 11,7]	7,45 [7,2; 8,2]* \square
Щелочная фосфатаза, Ед/л	88 [84,2; 90,5]	81,7 [77,6; 84]*	74,7 [72; 76,5]* \square
ГГТП, Ед/л	27,25 [24; 29,3]	22,5 [20; 25]	8,5 [7; 10]* \square

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 1»; \square – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 2»

Таблица 4. – Результаты бактериологического и микроскопического исследования желчи у экспериментальных животных на четвертые сутки эксперимента
Table 4. – Results of bacteriological and microscopic examination of bile in experimental animals on the 4th day of the experiment

Показатель развития холангита	Группа «Опыт 1»	Группа «Опыт 2»	Группа «Опыт 3»
Наличие роста на 1% глюкозном МПА, КОЕ ($\times 10^5$)	125,5 [122; 130]	42,5 [32; 45]*□	13,5 [10; 18]*□
Количество лейкоцитов в поле зрения, Ед	34 [29; 38]	26,5 [22; 28]*□	6,5 [4; 8]*□

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 1»; □ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Опыт 2»

В 1 группе отмечено незначительное снижение роста микроорганизмов – со 177,5 [174; 186] КОЕ ($\times 10^5$) до 125,5 [122; 130] КОЕ ($\times 10^5$). Во 2 группе по сравнению с 1 рост микроорганизмов после лечения был в 3 раза меньше (42,5 [32; 45] КОЕ ($\times 10^5$)). В группе «Опыт 3» по сравнению с 1 группой рост микроорганизмов был практически в 10 раз меньше (13,5 [10; 18] КОЕ ($\times 10^5$)). Динамика роста бактерий в желчи на вторые и пятые сутки эксперимента представлена на диаграмме 1.

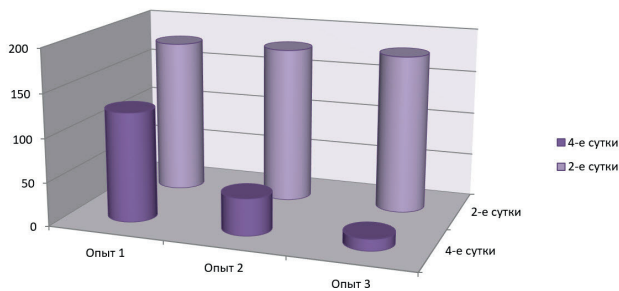


Диаграмма 1. – Рост аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в желчи экспериментальных животных опытных групп на вторые и четвертые сутки эксперимента

Diagram 1. – Growth of aerobic and facultative anaerobic bacteria in the bile of experimental animals of experimental groups on the 2nd and 4th days of the experiment

В результате микроскопического исследования желчи установлено статистически значимое уменьшение лейкоцитов в поле зрения в группе «Опыт 3» – с 57 [49; 59] Ед до 6,5 [4; 8] Ед по сравнению с группами «Опыт 1» и «Опыт 2» (диаграмма 2).

При макроскопическом исследовании животных всех групп во время оперативного лечения на вторые сутки эксперимента в свободной брюшной полости в подпечёночном пространстве обнаруживался спаечный процесс. После проведения висцеролиза при ревизии желчный пузырь был увеличен, напряжен. Во всех случаях выявлены дилатация ОЖП до 0,4 см, увеличение печени и изменение ее окраски (серая, бледная). Желчь из протока была темно-зеленой окраски, мутная, с примесью гноя и взвешенными в ней фрагментами тканевого детрита. Стенка холедоха во всех случаях была утолщена, серозная обо-

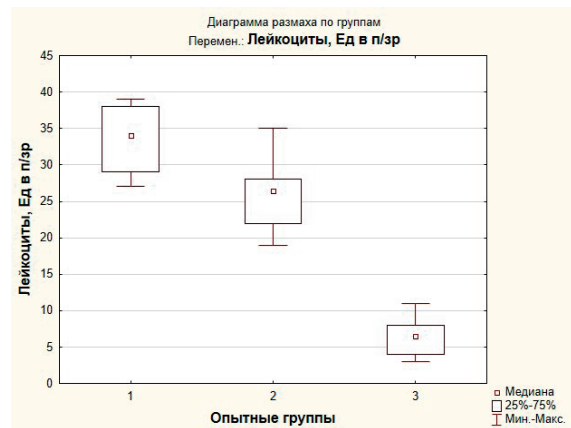


Диаграмма 2. – Количество лейкоцитов в поле зрения при микроскопии желчи кроликов опытных групп на четвертые сутки эксперимента

Diagram 2. – The number of white blood cells in the field of view during bile microscopy of rabbits of the experimental groups on the 4th day of the experiment

лочка гиперемирована, сосуды инъецированы. Эта картина соответствовала ОХ.

При макроскопическом исследовании во время аутопсии на пятые сутки эксперимента в 1 опытной группе в подпечёночном пространстве отмечался выраженный спаечный процесс. После висцеролиза имелись признаки перитонита и мутный выпот в области ОЖП, последний имел утолщенную стенку с инъецированными сосудами. Желчь из холедоха при этом была мутной, с элементами тканевого детрита. При гистологическом исследовании в этой группе установлено, что слизистая ОЖП десквамирована, с резко выраженной лейкоцитарной инфильтрацией стенки, местами распространяющейся на всю толщину с отеком и кровоизлиянием в окружающие ткани (рис. 8). В просвете протока визуализировались колонии микробов. В печени отмечено расширение внутривенных протоков с перидуктальной лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрацией. В 2 наблюдениях отмечено наличие гнойного экссудата в просвете внутривенных протоков с формированием мелкоочаговых абсцессов печени (рис. 9).

В группе «Опыт 2» после висцеролиза установлено, что в подпечёночном пространстве находилось незначительное количество серозного выпота, наложений фибрина не было. Желчь из ОЖП – мутная, стенка протока утолщена. Гисто-

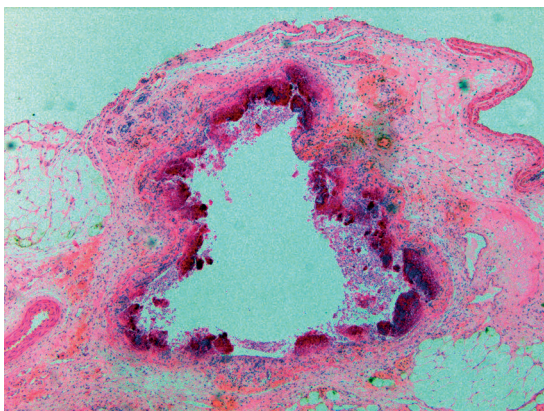


Рисунок 8. – Общий желчный проток: некроз слизистой оболочки, резко выраженная лейкоцитарная инфильтрация стенки протока и окружающих тканей. Окр.: гематоксилином и эозином, ×50

Figure 8. – Common bile duct: necrosis of the mucous membrane, pronounced leukocyte infiltration of the duct wall and surrounding tissues. Environment: hematoxylin and eosin, ×50

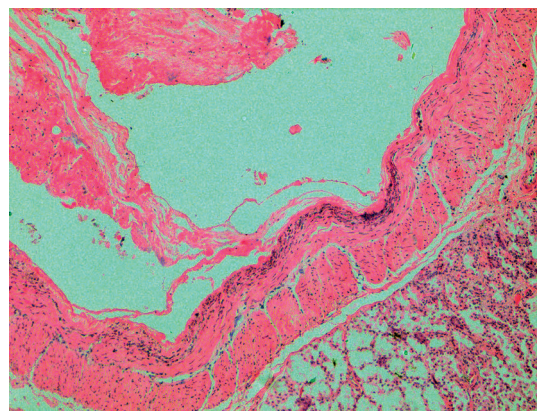


Рисунок 10. – Общий желчный проток: некроз слизистой оболочки, умеренно выраженная лейкоцитарная инфильтрация стенки протока, захватывающая 1/3 толщины стенки. Окр.: гематоксилином и эозином, ×200

Figure 10. – Common bile duct: mucosal necrosis, moderate leukocyte infiltration of the duct wall, capturing 1/3 of the wall thickness. Environment: hematoxylin and eosin, ×200

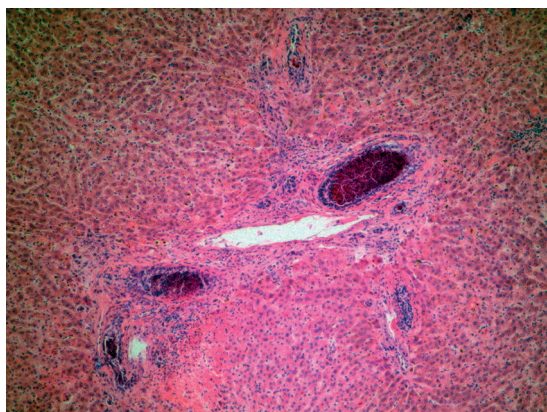


Рисунок 9. – Печень: гнойный холангиолит с деструкцией стенок внутрипечёночных желчных протоков. Окр.: гематоксилином и эозином, ×50

Figure 9. – Liver: purulent cholangiolitis with destruction of the walls of the intrahepatic bile ducts. Environment: hematoxylin and eosin, ×50

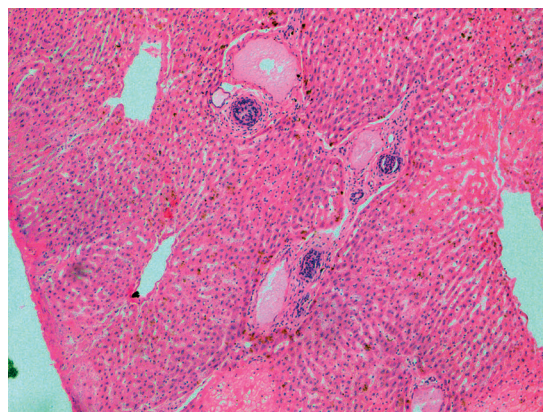


Рисунок 11. – Печень: слабо выраженная лейкоцитарная инфильтрация стенок протоков и окружающих его тканей портальных трактов. Окр.: гематоксилином и эозином, ×100

Figure 11. – Liver: weakly expressed leukocyte infiltration of the walls of the ducts and surrounding tissues of the portal tracts. Environment: hematoxylin and eosin, ×100

логическое исследование показало наличие умеренного выраженного отека и лейкоцитарной инфильтрации стенки ОЖП. Инфильтрат располагался по всей окружности протока и распространялся на 1/3 толщины стенки (рис. 10). При гистологическом исследовании печени обнаружено незначительное расширение внутрипечёночных протоков с сохранением их слизистой. В стенке протоков и перидуктально имелась слабо выраженная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация (рис. 11).

В 3 опытной группе в подпечёночном пространстве отмечался также спаечный процесс, выпота и наложений фибрина на серозных оболочках не было. Стенка ОЖП не утолщена, желчь из него получена светлая, без примеси гноя. Гистологически ОЖП был местами с десквамированным эпителием и скудной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией стенки, колоний

микробов в просвете не было. Патологические изменения локализовались преимущественно в слизистом и подслизистом слоях, в мышечном и серозных слоях их не обнаружено (рис. 12). По сравнению с группой «Опыт 2» изменения стенки ОЖП были менее выраженными, а в слизистой оболочке имелись участки без патологических процессов, что характерно для здоровых животных. При исследовании печени установлены отсутствие холестаза, незначительная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация внутрипечёночных протоков с сохранением их слизистой оболочки (рис. 13).

Таким образом, в результате исследования установлено, что у животных на вторые сутки

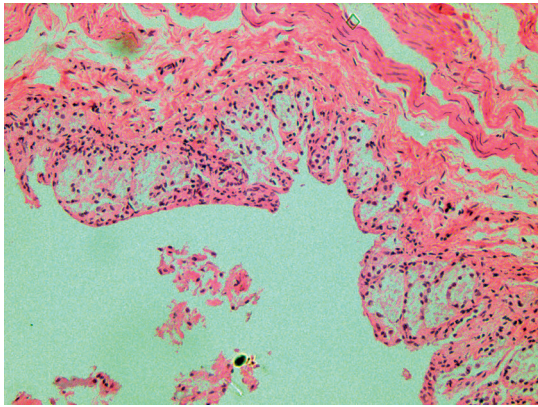


Рисунок 12. – Общий желчный проток: слизистая оболочка сохранена; очаговая слабо выраженная лейкоцитарная инфильтрация его стенки. Окр.: гематоксилином и эозином, ×200

Figure 12. – Common bile duct: the mucous membrane is preserved; focal weakly expressed leukocyte infiltration of its wall. Environment: hematoxylin and eosin, ×200

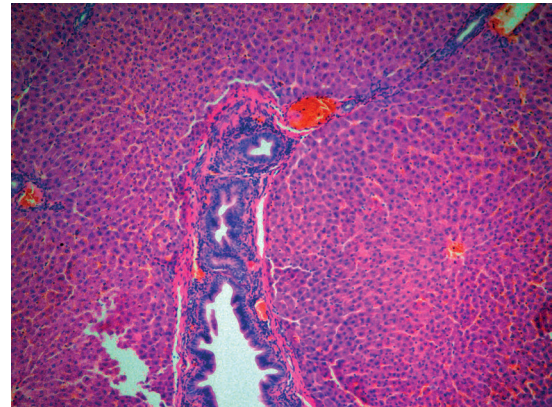


Рисунок 13. – Печень: слизистая оболочка протока сохранена; скудная перидуктальная лимфоидно-густическая инфильтрация. Окр.: гематоксилином и эозином, ×100

Figure 13. – Liver: the mucous membrane of the duct is maintained; scarce periductular lymphoid-gustic infiltration. Environment: hematoxylin and eosin, ×100

после моделирования ОХ развивается тяжелая форма остро гнойного воспаления в ОЖП с дальнейшим формированием абсцессов печени, что стало происходить в 1 опытной группе. Представленные результаты исследований демонстрируют статистически значимое бактерицидное и противовоспалительное действие разработанной методики фотодинамической терапии с введением фотосенсибилизатора под давлением в ОЖП и последующим комбинированным лазерным облучением печени по сравнению с изолированным эндохоледохеальным облучением.

Выводы

1. Введение в общий желчный проток взвеси микроорганизмов с дальнейшим его дренированием катетером с боковым отверстием в двенадцатиперстной кишке позволяет на вторые сутки эксперимента смоделировать острый холангит. Разработанная модель предусматривает восстановление нормального пассажа желчи в

кишечник, позволяет вводить в просвет общего желчного протока лекарственные вещества и световоды лазерных аппаратов и может успешно применяться для изучения антимикробной фотодинамической терапии острого холангита.

2. Фотодинамическая терапия с введением фотосенсибилизатора «Фотолон» под давлением в общий желчный проток и последующим эндохоледохеальным лазерным облучением печени оказывает антимикробное действие при экспериментальном остром холангите.

3. Фотодинамическая терапия экспериментального острого холангита, включающая введение фотосенсибилизатора «Фотолон» под давлением в общий желчный проток и последующее комбинированное (эндохоледохеальное и поверхностное) лазерное облучение печени оказывает статистически значимо более выраженное бактерицидное и противовоспалительное действие по сравнению с фотодинамической терапией с изолированным эндохоледохеальным облучением печени.

Литература

1. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных гнойным холангитом / В. С. Пантелеев [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии.* – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 53-57.
2. Опыт лечения острого холангита с применением антибактериальной фотодинамической терапии / Ю. В. Иванова [и др.] // *Фотобиология и фотомедицина.* – 2019. – № 27. – С. 9-14. – doi: 10.26565/2076-0612-2019-27-01.
3. Шило, Р. С. Фотодинамическая терапия заболеваний гепатобилиарной зоны / Р. С. Шило, Н. И. Батвинков // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2016. – № 3. – С. 52-57.
4. Александров, М. Т. Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика) / М. Т. Александров. – Москва, 2008. – С. 349-373.
5. Шило, Р. С. Моделирование острого холангита у кроликов / Р. С. Шило, Э. В. Могилевец, Н. И. Батвинков // *Наука и инновации.* – 2019. – № 8 (198). – С. 79-84.
6. Микробиологические аспекты хирургической патологии билиарной системы / В. А. Черкасов [и др.] // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.* – 2003. – Т. 162, № 2. – С. 109-113.
7. Шило, Р. С. Влияние эндохоледохеального введения фотосенсибилизатора «Фотолон» на экспериментальных животных / Р. С. Шило // *Гепатология и гастроэнтерология.* – 2020. – Т. 4, № 2. – С. 189-195. – doi: 10.25298/2616-5546-2020-4-2-189-195.
8. Неотложная абдоминальная хирургия : методическое руководство для практикующего врача / под ред. И. И. Затевахиной, А. И. Кириенко, А. В. Сажина. – Москва, 2018. – С. 291-294.

9. Гинок, В. А. Комплексный подход к лечению пациентов с острым парапроктитом с применением фототерапии / В. А. Гинок, Г. П. Рычагов // *Новости хирургии*. – 2011. – Т. 19, № 6. – С. 70-75.
10. Дешук, А. Н. Фотодинамическая терапия экспериментального острого холецистита / А. Н. Дешук, П. В. Гарелик // *Новости хирургии*. – 2012. – Т. 20, № 5. – С. 3-10.
11. Эндохоледохеальное лазерное облучение при холангите / Г. Г. Мелконян [и др.] // *Анналы хирургии*. – 2014. – № 4. – С. 25-29.

References

1. Panteleev VS, Nartajakov MA, Sokolov VP, Gricanenko GA, Bajazitova GR. Fotodinamicheskaja terapija v kompleksnom lechenii bolnyh gnojnym holangitom [Fotodynamic therapy in complex management of purulent cholangitis patients]. *Annaly hirurgicheskoy gepatologii* [Annals of HPB Surgery]. 2010;15(2):53-57. (Russian)
2. Ivanova JuV, Mushenko EV, Avdosev JuV, Korobov AM, Klimova EM. Opyt lechenija ostrogo holangita s primeneniem antibakterialnoj fotodinamicheskoy terapii [Experience of treatment of acute cholangitis with the use of anti-bacterial photodynamic therapy]. *Fotobiologija ta Fotomedycyna* [Photobiology and Photomedicine]. 2019;27:9-14. doi: 10.26565/2076-0612-2019-27-01. (Russian)
3. Shyla RS, Batvinkov NI. Fotodinamicheskaja terapija zabelevanij gepatobiliarnoj zony [Photodynamic therapy of hepatobiliary system diseases]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2016;3:52-57. (Russian)
4. Aleksandrov MT. Lazernaja klinicheskaja biofotometrija (teorija, jeksperiment, praktika). Moskva: Tehnosfera; 2008. p. 349-373. (Russian)
5. Shyla RS, Batvinkov NI, Mahiliavets EV, Procopchik NI. Modelirovanie ostrogo holangita u krolikov [Modeling of acute cholangitis in rabbits]. *Nauka i innovacii* [Science and Innovation]. 2019;(8):79-84. doi: 10.29235/1818-9857-2019-8-79-84. (Russian)
6. Cherkasov VA, Gorovic JeS, Zubareva NA, Sandakov PJa. Mikrobiologicheskie aspekty hirurgicheskoy patologii biliarnoj sistemy. *Vestnik hirurgii imeni I. I. Grekova* [Grekov's Bulletin of Surgery]. 2003;162(2):109-113. (Russian)
7. Shyla RS. Vlijanie jendoholedohealnogo vvedenija fotosensibilizatora "Fotonol" na jeksperimentalnyh zhivotnyh [Influence of introduction of the photosensitizer "Fotonol" into the common bile duct on experimental animals]. *Gepatologija i gastrojenterologija* [Hepatology and Gastroenterology]. 2020;4(2):189-195. doi: 10.25298/2616-5546-2020-4-2-189-195. (Russian)
8. Zatevahin II, Kirienko AI, Sazhin AV, editors. Neotlozhnaja abdominalnaja hirurgija. Moskva: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2018. p. 291-294. (Russian)
9. Ginjuk VA, Rychagov GP. Kompleksnyj podhod k lecheniju pacientov s ostrym paraprotitom s primeneniem fototerapii [The complex approach to the treatment of patients with the acute paraproctitis with the phototherapy application]. *Novosti Khirurgii*. 2011;19(6):70-75. (Russian)
10. Dziashuk AN, Garelik PV. Fotodinamicheskaja terapija jeksperimentalnogo ostrogo holecistita [Photodynamic therapy of experimental acute cholecystitis]. *Novosti Khirurgii*. 2012;20(5):3-10. (Russian)
11. Melkonjan GG, Mumladze RB, Chechenin GM, Olimpjev MJu. Jendoholedohealnoe lazernoe obluchenie pri holangite [Endohologic radiation exposure in cholangitis treatment]. *Annaly hirurgii* [Annals of Surgery]. 2014;4:25-29. (Russian)

PHOTODYNAMIC THERAPY OF EXPERIMENTAL CHOLANGITIS

R. S. Shyla, E. M. Mahiliavets, K. S. Belyuk, N. I. Procopchik, V. V. Vashchanka

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Photodynamic therapy of acute cholangitis involves the introduction of a photosensitizer into the common bile duct and subsequent laser irradiation of the liver. The study of combined laser action on the liver is promising.

Purpose of the study. To evaluate in an experiment the effectiveness of photodynamic therapy of acute cholangitis with the introduction of a photosensitizer into the common bile duct and combined laser irradiation of the liver.

Material and methods. Acute cholangitis was modeled in rabbits. In the first group, a saline solution was introduced into the common bile duct, in the second and third – "Photolon". Then, in the second group, photodynamic therapy with endocholelecheal laser irradiation of the liver was performed, in the third group – with combined irradiation. The general condition of the animals, their laboratory, microscopic and microbiological parameters were evaluated. After the autopsy, a histological examination of the liver and common bile duct was performed.

Results. On the 2nd day of the experiment, all rabbits developed acute cholangitis. After treatment in the group "Experience 3", in comparison with other groups, there was a greater decrease in the indicators of inflammation and cholestasis in the blood, the number of microorganisms and white blood cells in the bile. In the first group, the formation of liver abscesses was histologically noted. Pathological changes in the wall of the common bile duct and liver in the third group were less pronounced than in the second.

Conclusions. 1. The experimental model allows on the second day to reproduce acute cholangitis in rabbits. 2. Photodynamic therapy with Photolon photosensitizer with combined (endocholelecheal and surface) laser irradiation of the liver has a more pronounced bactericidal effect compared to endocholelecheal irradiation.

Keywords: Photolon, photodynamic therapy, photosensitizer, endocholelecheal liver irradiation, combined laser irradiation, common bile duct, choledoch.

For citation: Shyla RS, Mahiliavets EM, Belyuk KS, Procopchik NI, Vashchanka VV. Photodynamic therapy of experimental cholangitis. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2021;19(1):96-105. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-1-96-105>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование проводилось с соблюдением этических норм обращения с животными, а также требований мирового сообщества и правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов.

Conformity with the principles of ethics. The study was carried out in compliance with the ethical standards for the treatment of animals, as well as the requirements of the world community and the rules stipulated by the European Commission for the supervision of laboratory and other experiments with the participation of experimental animals of different species.

Об авторах / About the authors

*Шило Руслан Сергеевич / Shyla Ruslan, e-mail: shilo.ruslan@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-0077-181X

Могилевец Эдуард Владиславович / Mahiliavets Eduard, e-mail: emogilevec@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-7542-0980

Белюк Константин Сергеевич / Belyuk Kanstantsin, e-mail: BelyukKS@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-8861-6835

Прокопчик Николай Иванович / Prokopchik Nikolai, e-mail: prokopni@mail.ru, ORCID: 0000-0001-9319-9896

Вашенко Виталий Вадимович / Vashchanka Vitali, e-mail: studmed09@mail.ru, ORCID: 0000-0002-0382-3219

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 28.12.2020

Принята к публикации / Accepted for publication: 21.01.2021