МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО ХОЛАНГИТА У КРОЛИКОВ

УДК 616.361-002.1-092.9

Аннотация. Описана методика моделирования острого холангита (ОХ) у лабораторных животных, включающая введение в общий желчный проток кроликов взвеси микроорганизмов *E. Coli* с дренированием холедоха катетером с боковым отверстием через желудок и двенадцатиперстную кишку. Предложенный способ позволяет изучать патогенез заболевания на разных стадиях развития, восстанавливать нормальный пассаж желчи в кишечник, а также вводить в просвет общего желчного протока лекарственные вещества и световоды лазерных аппаратов для антимикробной фотодинамической и лазерной терапии.

Ключевые слова: острый холангит, желчный проток, моделирование острого холангита, экспериментальные животные, фотодинамическая терапия.

Для цитирования: Шило Р., Могилевец Э., Батвинков Н., Прокопчик Н. Моделирование острого холангита у кроликов // Наука и инновации. 2019. №8. С. 79–84. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-8-79-84>

Руслан Шило,

ассистент 1-й кафедры хирургических болезней Гродненского государственного медицинского университета; shilo.ruslan@yandex.ru

Эдуард Могилевец,

заведующий 1-й кафедрой хирургических болезней ГрГМУ, кандидат медицинских наук, доцент; emogilevec@yandex.ru

Николай Батвинков,

профессор 1-й кафедры хирургических болезней ГрГМУ, член-корреспондент; hir1@grsmu.by

Николай Прокопчик,

доцент кафедры патологической анатомии ГрГМУ; prokopni@mail.ru

Нарушение проходимости желчевыводящих протоков может привести к острому холангиту (ОХ). Это одно из тяжелейших осложнений доброкачественных заболеваний желчевыводящих путей, в том числе желчнокаменной болезни (ЖКБ). Каждый десятый житель планеты страдает ЖКБ, а холедохолитиаз (ее осложнение), встречается в 20–30% случаев [4, 5]. Количество пациентов с ЖКБ удваивается каждое десятилетие [11], соответственно увеличивается и частота ОХ [2]. Острый холангит диагностируется у 11–60% пациентов

с осложненной ЖКБ и сопровождается высокой летальностью – от 4,7 до 28,5% [7, 8].

Длительная механическая желтуха (МЖ) доброкачественного генеза вызывает желчную гипертензию, которая является причиной повреждения гепатоцитов и клеток Купфера, а также нарушения иммунитета и развития эндотоксемии. Ахолия, сопутствующая МЖ, способствует повышению проницаемости кишечной стенки для бактерий и эндотоксина (колонизации энтеробактериями), снижению эмульгирования и нейтрализации бактериально-го липополисахарида (эндотоксина). Все эти факторы провоцируют

Рис. 1. Способ моделирования острого холангита

А. Проведение катетера Fogarty через желудок по Штамму в общий желчный проток и фиксация его узловым швом.

Б. Дренаж холедоха закрыт проводником, микробная взвесь *E. Coli* находится в желчных протоках, сформировано боковое отверстие дренажа в полости 12-перстной кишки, соответствующее диаметру холедоха.

В. Проводник катетера Fogarty подтянут выше его бокового отверстия.

Восстановлен нормальный пассаж желчи в кишечник после смоделированной ранее механической желтухи и острого холангита

ОХ, а в дальнейшем – септический процесс и прорыв в кровь энтеробактериального эндотоксина, что редко встречается при опухолевых желтухах [1].

Острый холангит в современной медицине приобрел статус самостоятельного заболевания [10]. В большой степени это обусловлено увеличением числа пациентов с осложненными формами ЖКБ, снижением эффективности антибактериальных препаратов в лечении гнойных заболеваний, склонностью ОХ к генерализации с образованием множественных абсцессов печени, развитием билиарного сепсиса, полиорганной недостаточности [6, 9]. Даже при своевременно выполненных хирургических операциях летальность при ОХ разного генеза достигает 15–60%, что связано с изначально поздней диагностикой, сопутствующими заболеваниями, лечением в непрофильных учреждениях здравоохранения, общей тяжестью состояния пациентов при поступлении в хирургический стационар [3, 14].

Таким образом, вопросы патогенеза и комплексного лечения

МЖ и ОХ остаются актуальными и требуют дальнейшего углубленного изучения как клинического, так и экспериментального – с моделированием патологии на лабораторных животных. Каждая описанная в литературе модель ОХ имеет свои особенности, исходя из конкретных задач, может быть использована для изучения определенных аспектов патогенеза и лечения данного заболевания, но заменить одна другую в каждом индивидуальном случае не может. До сих пор не предлагались методики моделирования ОХ, дающие возможность одновременно вводить в просвет холедоха лекарственные вещества, фотосенсибилизаторы и световоды для контроля течения патологии, а также восстанавливать естественный пассаж желчи в кишечник, что важно после оперативного вмешательства [13].

Наша экспериментальная модель ОХ разработана с учетом опыта, описанного в литературе различными авторами, но имеет отличительные особенности. Она позволяет вводить в просвет желчного протока лекарственные

вещества и световоды лазерных аппаратов, а также создавать механический блок для оттока желчи в 12-перстную кишку или убирать его на разных стадиях течения холангита (патент на изобретение №21306 «Способ моделирования острого гнойного обтурационного холангита» от 09.03.2015).

Все исследования выполнены 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. Кроликов в состоянии наркоза взвешивали, фиксировали к операционному столу и оперировали в стерильных условиях; по окончании эксперимента им вводили летальные дозы тиопентала натрия.

В ходе операции выполняли верхнесрединную лапаротомию, продольную дуоденотомию в проекции большого дуоденального сосочка (БДС) и гастротомию в антральном отделе желудка. Затем

через гастротомическое отверстие погружали катетер Fogarty 4F с обрезанным баллоном в его дистальной части через двенадцатиперстную кишку в общий желчный проток (ОЖП). В желудке катетер фиксировали по Штамму тремя кисетными швами. Далее на дистальную часть холедоха с проведенным в него дренажем накладывалась лигатура для исключения возможности попадания желчи в 12-перстную кишку мимо дренажа. Дуоденотомическое отверстие ушивали поперечно двухрядным швом (рис. 1А).

В катетер, из которого предварительно был извлечен металлический проводник, вводили микробную взвесь *Escherichia Coli* в разведении 1×10^5 КОЕ/мл на стерильном растворе 0,9%-ного натрия хлорида в объеме 1 мл (0,2 мл/кг массы) и вставляли проводник обратно. Культура *E. Coli* была приготовлена по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича, исходя из того, что в 1 мл раствора содержится 1 млрд клеток микроорганизмов. Выбор возбудителя и его концентрации был обусловлен данными литературы, согласно которым *E. Coli* при ОХ высевается в 50–60% случаев [12].

В просвете двенадцатиперстной кишки в катетере формировали боковое отверстие (рис. 1Б).

Металлический проводник в катетере выполняет функцию механического блока для оттока желчи, а частичное подтягивание проводника внутри катетера освобождает боковое отверстие, обеспечивая отток желчи в просвет двенадцатиперстной кишки. Диаметр отверстия должен соответствовать диаметру холедоха (1–2 мм), так моделируется естественная скорость движения желчи (рис. 1Б).

Проксимальный конец катетера помещали в туннель между кожей и мышцами для профилактики его повреждения животным в послеоперационном периоде. Операционная рана послойно ушивалась.

Катетер Fogarty 4F (красный) без проводника имеет минимальный внутренний диаметр для проведения в него световодов от лазерного аппарата и выполнения лазерной и фотодинамической терапии ОХ. Для забора желчи из холедоха в катетер Fogarty 4F с боковым отверстием вводился тонкий катетер Fogarty 3F (зеленый), его внешний диаметр соответствует внутреннему диаметру Fogarty 4F.

Предложенная нами модель холангита отработана на 6 беспородных кроликах (самки) массой тела $4,1 \pm 0,2$ кг ($M \pm \sigma$). После операции

животные находились в отдельных клетках, в течение всего эксперимента за ними проводилось клиническое наблюдение. С помощью полуколичественного метода в баллах оценивались следующие признаки ОХ: активность животного, аппетит, температура, частота сердечных сокращений (ЧСС), желтушность склер (табл. 1).

Перед операцией и на 4-е сутки после нее у кроликов определялись лабораторные показатели крови (общий и биохимический анализы) для оценки динамики признаков воспаления и холестаза: лейкоциты, формула крови, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза, билирубин, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза.

До введения микробной взвеси *E. Coli* во время операции и во время аутопсии у кроликов

Клинический признак острого холангита	Степень выраженности признака				
	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	4 балла
Снижение двигательной активности	Животные активные	Незначительное снижение двигательной активности	Умеренное снижение двигательной активности, животные вялые. Передвижение по клетке после звукового раздражителя	Выраженное снижение двигательной активности, животные заторможенные. Передвижение по клетке лишь после прикосновения	Животные неподвижные даже после прикосновения
Уменьшение объема питания	Питание обычное, не изменено	Умеренное снижение суточного объема питания	Значительное снижение суточного объема питания, прием только воды	Практически полный отказ от питания, прием незначительного количества воды	Полный отказ от питания
Повышение ЧСС, уд/мин	150–160	160–170	170–180	180–190	190–200
Повышение температуры тела, °С	38,5–39,5	39,5–39,9	40,0–40,4	40,5–40,9	41,0 и выше
Желтушность склер	Обычные	Иктеричные	Незначительно желтушные	Умеренно желтушные	Выраженно желтушные

Таблица 1. Градация клинических признаков острого холангита по баллам в соответствии с полуколичественным методом оценки

Клинический признак	До моделирования ОХ	После моделирования ОХ			
		1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки
Снижение двигательной активности*	0	1 [0,25; 1]	2 [2; 2]	3 [3; 3,75]	4 [3,25; 4]
Уменьшение питания*	0	1,5 [1; 2]	3 [3; 3,75]	4 [4; 4]	4 [4; 4]
Повышение ЧСС*	0	1 [0,25; 1]	2,5 [2; 3]	4 [3,25; 4]	4 [4; 4]
Повышение температуры тела*	0	0 [0; 0,75]	1 [0,25; 1]	2 [1,25; 2]	3 [3; 3,75]
Желтушность склер*	0	0 [0; 0]	1 [1; 1]	2 [2; 2]	3 [3; 3]

Таблица 2. Выраженность клинических признаков острого холангита экспериментальных животных (кроликов) в соответствии с полуколичественным методом оценки, баллов

Примечание: * – различия признака в нескольких сравниваемых зависимых группах на разные сутки эксперимента статистически значимы по критерию Фридмана ($p < 0,05$).

через дренаж холедоха забиралась желчь для микробиологического и микроскопического исследования. После моделирования ОХ животные выводились из эксперимента на 4-е сутки, во время аутопсии производилась морфологическая оценка изменений желчевыводящей системы и собственно стенки ОЖП.

Биологические материалы (венозную кровь и желчь) доставляли в лабораторию в течение получаса после забора для исследований. Для выявления аэробных и факультативно-анаэробных бактерий производили посев желчи в количестве 0,1 мл на чашку

Петри с 1%-ным глюкозным МПА, для выявления анаэробных микроорганизмов – в высокий столбик 1%-ного глюкозного МПА. Микроскопию выполняли после приготовления тонких мазков, окрашенных 1%-ным водным раствором метиленового синего, под микроскопом определяли (количественно) степень микробной обсемененности желчи и наличие в ней лейкоцитов.

ОЖП и ткань печени после аутопсии отправляли на гистологическое исследование. После проводки в спиртах восходящей концентрации материал заливали в парафин. Гистологические

срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Полученные данные обрабатывались при помощи программы «Statistica 10.0» с применением непараметрических методов исследования для двух и нескольких зависимых выборок. При определении наличия сдвига признака использовался критерий знаков и критерий Фридмана, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей.

Динамика наиболее типичных клинических и лабораторных показателей развивающегося за время эксперимента ОХ (желтуха, температура, лейкоциты крови) представлена на рис. 2–4.

Изменения клинических показателей и поведения кроликов по сравнению со здоровыми (замедление двигательной активности, заторможенность, отказ от пищи), а также признаки общей интоксикации были отмечены уже с 1-х суток после моделирования ОХ (табл. 2). На 2-е сутки эксперимента эти признаки усугубились и стали более выраженными. Отмечались тахикардия при пальпации

Рис. 2. Динамика изменения уровня билирубина при моделировании острого холангита

Рис. 3. Динамика изменения температуры тела при моделировании острого холангита

Рис. 4. Динамика изменения лейкоцитов крови при моделировании острого холангита

и повышение температуры тела до субфебрильных цифр при термометрии. К 3-м суткам состояние животных заметно ухудшилось – они передвигались по клетке только после прикосновения к ним, делая при этом лишь несколько шагов, отказывались от пищи и воды, склеры их становились иктеричными. На 4-е сутки кролики были выведены из эксперимента.

При макроскопическом исследовании во время вскрытия животных в свободной брюшной полости в подпеченочном пространстве обнаруживался спаечный процесс. После проведения висцеролиза при ревизии: желчный пузырь был увеличен, напряжен, имел тусклую серозную оболочку с просвечивающимися, инъецированными кровеносными сосудами, в подпеченочном пространстве определялся абсцесс – осложнение ОХ. Во всех случаях выявлена

Показатель развития холангита	До моделирования ОХ	4-е сутки после моделирования ОХ
Количественный анализ роста на 1% глюкозном МПА, КОЕ ($\times 10^5$)	0 (роста нет)	180,5 [173,25; 185,5]*
Полуколичественный анализ роста на высоком столбике 1% глюкозного МПА	0 (роста нет)	6+
Микробные тела в поле зрения, Ед	0	232,5 [224; 240,25]*
Количество лейкоцитов в поле зрения, Ед	0	113,5 [104; 123]*

Таблица 3. Результаты бактериологического и микроскопического исследования желчи у экспериментальных животных

* Здесь и в табл. 4 различия в двух сравниваемых зависимых группах статистически значимы по критерию знаков ($p < 0,05$)

дилатация общего желчного протока до 0,4 см, увеличение печени и изменение ее окраски (серая, бледная). После выполнения продольной холедохотомии желчь из ОЖП поступала под давлением, была темно-зеленая, мутная, с примесью гноя и взвешенными фрагментами тканевого детрита. Стенка холедоха во всех случаях гипертрофировалась, серозная оболочка была гиперемирована, сосуды инъецированы.

Рис. 5. Острый гнойный холангит: некроз и десквамация эпителия (черная стрелка), колонии микроорганизмов (желтая стрелка), лейкоцитарная инфильтрация (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 50$

Показатель развития холангита	До моделирования ОХ	4-е сутки после моделирования ОХ
Общий анализ крови		
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	4,45 [3,9; 5,15]*	15,65 [14,87; 16,42]*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2 [1,25; 2,75]*	17 [16,25; 18,75]*
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	6 [5,65; 6,35]*	6,9 [6,65; 7,15]*
Гемоглобин, г/л	139,5 [131,75; 145,75]*	169 [165; 170]*
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	251 [190,25; 310,25]*	370 [365; 378]*
СОЭ, мм/час	6,5 [5,25; 7,75]*	49 [46,5; 53]*
Биохимический анализ крови		
АЛАТ, Ед	4,45 [3,9; 5,15]*	15,65 [14,87; 16,42]*
АСАТ, Ед	2 [1,25; 2,75]*	17 [16,25; 18,75]*
Билирубин, мкмоль/л	6 [5,65; 6,35]*	6,9 [6,65; 7,15]*
Щелочная фосфатаза, Ед/л	139,5 [131,75; 145,75]*	169 [165; 170]*
ГГТП, Ед/л	251 [190,25; 310,25]*	370 [365; 378]*
Общий белок, г/л	6,5 [5,25; 7,75]*	49 [46,5; 53]*
Мочевина, ммоль/л	5,1 [4,5; 6,3]*	9,7 [9,45; 10,1]*
Креатинин, мкмоль/л	72,5 [69; 76,75]*	118,5 [113; 121,75]*
Глюкоза, ммоль/л	7 [6,5; 7,35]*	8,7 [8,3; 8,95]*

Таблица 4. Показатели общего и биохимического анализов крови у экспериментальных животных (Me; 25–75%). * – $p < 0,05$

Рис. 6. Острый гнойный холангиолит (черная стрелка) с перифокальным абсцессом (желтая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Гистологическое исследование общего желчного протока и печени выявило гнойное воспаление с деструкцией эпителия и скопление в просвете протоков гнойного экссудата. Воспалительный процесс распространялся на окружающие ткани. Вокруг некоторых внутрипеченочных желчных протоков обнаружены микроабсцессы, в стенке этих протоков отмечалась деструкция (рис. 5, 6).

У всех кроликов наблюдался отчетливый динамический рост анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий на 1%-ном глюкозном МПА и высоком столбике 1%-ного глюкозного МПА – высокая обсемененность желчи характерна для ОХ. Микроскопическое исследование показало увеличение количества микробных тел и лейкоцитов в желчи, что также подтверждает развитие воспалительного процесса и выраженного инфекционного процесса в желчевыводящих протоках (табл. 3).

У всех животных в крови отмечены признаки общего воспаления в организме (табл. 4). Так, уровень лейкоцитов повысился более чем в 3 раза, палочкоядерных нейтрофилов – в 8,5.

Показатели общего билирубина, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы во много раз превышали нормы, что подчеркивает развитие обязательного для ОХ фактора – холестаза. Нарушение функции печени подтверждает существенный рост показателей аланина и аспарагинаминотрансферазы по сравнению с изначальными уровнями.

Таким образом, у экспериментальных кроликов было доказано развитие острого гнойного холангита по клиническим данным,

а также по результатам лабораторных, гистологических, микроскопических и бактериологических исследований. У животных констатированы холестаз, бактериальное обсеменение желчи и повреждения внутренней оболочки ОЖП, являющиеся обязательными факторами развития ОХ. Это дает нам основание подтвердить патогенетическую обоснованность описанного способа моделирования заболевания.

Разработанная модель ОХ предусматривает управление пассажем желчи, что позволяет воспроизводить как внутреннее,

так и наружное дренирование желчного протока после развития холангита и, соответственно, изучать заболевание на разных этапах его лечения, препятствовать появлению острой печеночной недостаточности. Обеспечивается возможность введения в просвет холедоха лекарственных веществ и световодов для лазерного облучения и фотодинамической терапии, а также забора желчи через катетер для исследования. Важно, что при этом сохраняется анатомическая целостность желчевыводящей системы. ■

■ **Summary.** A technique of modeling acute cholangitis (OX) at laboratory animals is described. It includes the introduction of a suspension of *E. Coli* microorganisms into the common bile duct of rabbits with drainage of the common bile duct with a catheter with a lateral opening through the stomach and duodenum. The proposed method allows studying the pathogenesis of the disease at different stages of development AC, to restore the normal passage of bile into the intestine, and also to introduce into the lumen of the common bile duct medicinal substances and optical fibers of laser apparatus for antimicrobial photodynamic and laser therapy.

■ **Keywords:** acute cholangitis, bile duct, modeling of acute cholangitis, experiment, photodynamic therapy.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-8-79-84>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Ахаладзе Г. Г. Клинические стадии острого гнойного холангита / Г. Г. Ахаладзе, Н. Ф. Кузовлев, Г. Р. Сакеварашвили и др. // *Анналы хир. гепатол.* 1997. Т. 2. С. 103–109.
- Ермолов А. С. Диагностика и лечение обструктивного холангита / А. С. Ермолов, Е. Е. Удовский, С. В. Юрченко и др. // *Хирургия.* 1994. №6. С. 3–6.
- Жерлов Г. К. Оперативное лечение холангита / Г. К. Жерлов, И. С. Тарасевич // *Анналы хир. гепатол.* 1999. Т. 4, №2. С. 100.
- Кондратенко П. Г. Лечение больных острым холангитом / П. Г. Кондратенко, А. Ф. Элин, А. А. Васильев и др. // *Анналы хир. гепатол.* 1999. Т. 4, №2. С. 107.
- Мачулин Е. Г. Механическая желтуха неопухового генеза / Е. Г. Мачулин. – Минск, 2000.
- Машинский А. А. Минимально инвазивные технологии в диагностике и лечении гнойного холангита / А. А. Машинский // *Дис. ... канд. мед. наук.* – М., 2003.
- Рыбачков В. В. Причины эндогенной интоксикации при гнойном холангите / В. В. Рыбачков, И. Г. Дряженков, Е. Н. Кабанов // *Анналы хир. гепатол.* 2009. Т. 14, №2. С. 28–32.
- Седов, А. П. Оценка изменений слизистой оболочки желчных протоков и состава желчи при остром холангите / А. П. Седов и др. // *Анналы хир. гепатол.* 2009. Т. 14, №2. С. 22–27.
- Станулис А. И. Применение электрохимически активированного раствора анолита в комплексном лечении больных гнойным холангитом / А. И. Станулис, Б. И. Плюсин, А. А. Друкорт // *Анналы хир. гепатол.* 2003. Т. 8, №2. С. 247–248.
- Старков Ю. Г. Лапароскопическая антеградная папиллосфинктеротомия. Методика и техника / Ю. Г. Старков, В. П. Стрекаловский, Р. С. Григорян и др. // *Эндоскоп. хир.* 2001. №1. С. 34–36.
- Черкасов В. А. Антибиотики в хирургии желчных путей / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева, Э. С. Горовиц // *Вестник хирургии.* 2002. Т. 161, №2. С. 111–114.
- Черкасов В. А. Микробиологические аспекты хирургической патологии билиарной системы / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева // *Вестник хирургии.* 2003. Т. 162, №2. С. 112.
- Шило Р. С. Фотодинамическая терапия заболеваний гепатобилиарной зоны / Р. С. Шило, Н. И. Батвинков // *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та.* 2016. №3. С. 54.
- Adamek H. E. Management of retained bile duct stones: a prospective open trial comparing extracorporeal and intracorporeal lithotripsy / H. E. Adamek, M. Maier, R. Jakobs et al. // *Gastrointest. endoscopy.* 1996. Vol. 44, N1. P. 40–47.

Статья поступила в редакцию 10.02.2019 г.

SEE <http://innosfera.by/2019/08/rabbits>