

В. В. Бойко,  
Д. А. Мирошниченко,  
А. Н. Шевченко,  
И. И. Арсений, В. А. Бабич

*Харьковский национальный  
медицинский университет*

*ГУ «Институт общей  
и неотложной хирургии  
им. В. Т. Зайцева НАМН  
Украины», г. Харьков*

*Ахтырская ЦРБ*

© Коллектив авторов

## РОЛЬ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА В ВОЗНИКНОВЕНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ПОРТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

**Резюме.** В работе представлены результаты морфометрического и иммуногистохимического исследований биоптатов слизистой оболочки желудка у больных портальной гипертонией, различных уровней блоков с целью изучения основных показателей активаторов плазминогена и их роли в возникновении кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка. Показано, что преобладание uPA над PAI-1 приводит к усиленной деградации фибрина под действием плазмина и, в свою очередь, может играть определенную роль в развитии кровотечений.

**Ключевые слова:** портальная гипертензия, активаторы плазминогена, кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода, дилатация сосудов.

### Введение

Высокая летальность при кровотечениях из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка обусловлена большим числом больных с декомпенсированной стадией заболевания и малой эффективностью существующих методов лечения. Для коррекции этого осложнения предложены различные варианты оперативного лечения начиная от спленектомии и заканчивая эндоваскулярными технологиями, однако на сегодня проблема лечения этого осложнения остается актуальной [1].

Портальная гипертензия – это повышение давления в системе воротной вены (ВВ) (нормальное давление – 7 мм рт. ст.), развивающееся в результате затруднения кровотока на любом участке этой вены. Давление свыше 12–20 мм рт. ст. приводит к варикозному расширению вен пищевода и желудка (ВРВПЖ) [2, 4, 5] и портальной гипертензивной васкулопатии с поражением слизистой оболочки желудка (СОЖ) и кишечника, как следствие развитие клинко-морфологической картины портальной гипертензионной гастропатии (ПГГ).

У больных внутривенной ПГ, было выявлено увеличение числа артерио-венозных шунтов в подслизистом слое желудка, но не в СОЖ. Как было установлено при морфометрическом исследовании, изменения капиллярного русла СОЖ при ПГ имеют много общего с изменениями его при хеликобактерном гастрите, что может свидетельствовать о некоторой общности их патогенетических механизмов [3].

### Цель исследования

Морфометрическим и иммуногистохимическим (ИГХ) методами выявить структурные изменения СОЖ и нарушения системы актива-

тора плазминогена при различных стадиях ПГ и оценить их роль в возникновении геморрагических осложнений.

### Материалы и методы исследований

При проведении фиброгастродуоденоскопии помимо визуального осмотра пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки у 56 пациентов с портальной гипертензией получали биоптаты СОЖ, с целью проведения морфологического исследования.

Перед взятием биопсии слизистой оболочки у больных учитывался протромбиновый индекс. Для гистологического исследования брали 2 кусочка из антрального отдела, 2 кусочка из фундального отдела и один кусочек слизистой оболочки из угла желудка. Биоптаты маркировали и доставляли в патологоанатомическое отделение во флаконах с 10 % нейтральным раствором формалина. Материал фиксировали в течение 24 часов. После фиксации кусочки промывали водопроводной водой, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для верификации сосудистой сети СОЖ и пролиферативной активности эпителиоцитов использовался иммуногистохимический метод исследования.

Иммунофенотипирование проводили с использованием автоматизированной системы иммунного окрашивания Autostainer Link 48 (DAKO, USA). Демаскировка антигенов осуществляли с использованием РТ-модуля (DAKO, Denmark) интегрированного в платформу Link.

Иммуногистохимическое исследование проводили по следующему протоколу.



1. На ротационном микротоме водопадного типа MICROM HM 340E (Germany) изготовляли серийные срезы толщиной 3-4 мкм.

2. Срезы монтировали на полилизиновые стекла и высушивались в течение 16-24 часов при температуре 37 °С в термостате.

3. Для депарафинизации, регидратации и демаскировки антигенов, срезы помещали в РТ-модуль, в раствор (Wash Buffer 20x, EnVision FLEX, DAKO) и обрабатывали в соответствии с инструкцией производителя.

4. В последующем производили иммунное окрашивание в Autostainer Link 48.

5. Результаты иммунных реакций выявляли с использованием DAB (3,3 г -диаминобензидин, DAKO).

6. Докрашивание ядер гематоксилином Майера – 15 секунд, с последующей промывкой в проточной водопроводной воде.

7. Обезвоживание и заключение под покровное стекло с использованием синтетической смолы Biomount (BioOptica, Italy). Для контроля реакции с антителами к Ki-67 (Clone MIB-1, 0,2 ml/1 ml, DAKO) использовали внутренний позитивный контроль – зародышевые центры реактивных лимфоидных фолликулов слизистой оболочки желудка. В качестве внешнего позитивного контроля в каждой постановке реакции использовались срезы лимфатических узлов с реактивной фолликулярной гиперплазией. Интенсивность пероксидазной метки оценивали по числу позитивных клеток в пересчете на 100 клеток эпителия СОЖ.

Для контроля реакции с антителами к CD34 (Clone QBEnd 10, 0,2 ml/1 ml, DAKO) использовали внешний позитивный контроль – срезы капиллярной гемангиомы кожи. Препараты изучали в световом микроскопе LEITZ DM RBE (Leica, Германия) на увеличениях.

Оценку морфологического состояния СОЖ проводили, используя визуально-аналоговую шкалу полуколичественной оценки, предложенную Сиднейской Системой. Также использовали современную комплексную систему OLGA – (Operative Link for Gastritis Assessment) с выделением степени и стадии хронического гастрита. Для морфометрического исследования на продольно ориентированных срезах и при стандартном увеличении  $\times 300$  снимали цифровые изображения СОЖ камерой Nikon D 3100. Получали полноцветные оцифрованные изображения с расширением «jpg». Высокое качество изображений позволяло использовать их как в качестве иллюстративного материала, так и для проведения автоматизированного морфометрического анализа.

Морфометрическое исследование проводили с использованием компьютерной системы анализа изображений DMI-1 (ДиаМорф Cito-

W, Россия). Измерение площадей выполняли с использованием приемов формирования выборки или с выделением области интереса на изображении. Для абсолютного значения измеряемого параметра, предварительно выполняли калибровку, отсняв объект-микрометр при том же увеличении, что и исследуемый препарат. Для количественной оценки выделенных объектов определяли интенсивность окрашивания препаратов, оцениваемую как яркость изображения в уровнях серого от 0 до 255. Таким же образом оценивали яркость фоновое окрашивания препарата.

**Результаты исследований и их обсуждение**

Влияние ПГ на морфометрические показатели капиллярного русла СОЖ оценивали в группе, состоявшей из 40 больных с диффузными заболеваниями печени, имевшими клинико-лабораторные признаки повышенного давления в системе воротной вены (71,4 %). Группу сравнения составили 16 больных без признаков ПГ (таб. 1). Средний размер сосудов в СОЖ у больных с ПГ существенно уменьшался в антральном отделе, но оставался неизменным в теле желудка. Хотя при этом в теле желудка наблюдалось достоверное увеличение количества сосудов, но относительный объем сосудистого компонента в СОЖ у больных с ПГ оставался неизменным. Дилатация сосудов в СОЖ часто выявляется у больных с ПГ, однако топография и степень дилатированности сосудов не коррелирует с эндоскопическими проявлениями ПГГ.

Таблица 1

**Морфометрическая характеристика сосудов гемомикроциркуляторного русла слизистой оболочки желудка у больных с портальной гипертензией**

	Исследуемые морфометрические параметры	Группы пациентов	
		ПГ (-) n-16	ПГ (+) n-40
Антральный отдел	Количество сосудов (N) на 1 мм <sup>2</sup> среза	195±11	220±21
	Средняя площадь сосудов (S) μм <sup>2</sup>	282±11	223±18*
	Относительный объем сосудов (V) (%)	5,15±0,43	4,7±0,31
Тело желудка	Количество сосудов (N) на 1 мм <sup>2</sup> среза	233±12	279 ±13*
	Средняя площадь сосудов (S) μм <sup>2</sup>	198±9	194±15
	Относительный объем сосудов (V) (%)	4,4±0,21	4,96±0,33

Примечание. \* p<0,05 по сравнению с ПГ(-)

Таким образом, капиллярное русло различных отделов СОЖ при ПГ претерпевает морфологические изменения. При этих патологических состояниях наблюдается увеличение объемной доли сосудистого компонента в СОЖ. Однако если в слизистой оболочке антрального

отдела желудка это достигается главным образом за счет дилатации сосудов, то в слизистой оболочке тела желудка наблюдается усиление ангиогенеза с увеличением количества сосудов мелкого калибра.

Исследование экспрессии компонентов системы активатора плазминогена в слизистой оболочке желудка при ПГГ, проведенное на группах пациентов с ПГГ с кровотечением из СОЖ и без него, показало, что содержание компонентов фибринолитической системы было нарушено, отмечалось повышение продуктов деградации фибрина и снижение – ингибитора плазмина<sup>2</sup> и плазминогена.

В проведенном исследовании экспрессия компонентов системы активатора плазминогена – активатора плазминогена урокиназного типа (uPA, урокиназа) и ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) выявлялась в эндотелии кровеносных сосудов и эпителиальных клетках СОЖ. Для анализа данных типов экспрессии урокиназы были объединены в 2 группы: сниженная и повышенная экспрессия; для PAI-1 применялась градация на подгруппы с отсутствием и наличием экспрессии. ИГХ исследование биоптатов СОЖ пациентов с ПГГ показало, что сниженная экспрессия активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы) в стенках сосудов отмечалась в 19 % случаев, повышенная – в 81 % случаев. В группе с легкой степенью гастропатии сниженное содержание урокиназы выявлено в 15 %, повышенное – в 85 % наблюдений. В группе со средней степенью гастропатии пониженная экспрессия урокиназы в стенках сосудов обнаружена у 23 %, повышенная – у 77 % пациентов.

У больных, имеющих ПГ без признаков ПГГ, отмечалась уменьшенная экспрессия урокиназы в 11 % случаев, увеличенная – в 89 %. В группе контроля уровень экспрессии урокиназы был низким в 9 % случаев и высоким – в 91 % (табл. 2).

Таблица 2  
Экспрессия урокиназы в стенках сосудов СОЖ

Группы больных	Сниженная экспрессия (%)	Повышенная экспрессия (%)
ПГГ	19	81
ПГГ легкой степени тяжести	15	85
ПГГ средней степени тяжести	23	77
Портальная гипертензия без гастропатии	11	89
Контрольная группа	9	91

При сравнении экспрессии уровня урокиназы в стенках сосудов СОЖ в группах пациентов не выявлено достоверных различий при сопоставлении следующих групп: с гастропатией легкой степени и средней степени (p=0,3), контролем и группой с гастропатией легкой сте-

пени и средней степени (суммарно) (p=0,23), контролем и группой с гастропатией легкой степени (p=0,32), контролем и группой с гастропатией средней степени (p=0,19), контролем и группой с ПГ без ПГГ (p=0,44), группой с ПГ без ПГГ и группой с гастропатией легкой степени (p=0,39), группой с ПГ без ПГГ и группой с гастропатией средней степени (p=0,25), группой с ПГ без ПГГ и группой с гастропатией легкой степени и средней степени (суммарно) (p=0,3).

ИГХ исследование экспрессии урокиназы в эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка пациентов с ПГГ показало, что сниженное содержание отмечалось в 31 % случаев, повышенное – в 69 % случаев (табл. 3).

Таблица 3  
Экспрессия урокиназы в эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка

Группы больных	Сниженная экспрессия (%)	Повышенная экспрессия (%)
ПГГ	31	69
ПГГ легкой степени тяжести	38	62
ПГГ средней степени тяжести	23	77
Портальная гипертензия без гастропатии	22	78
Контрольная группа	9	91

В группе с легкой степенью гастропатии сниженное содержание урокиназы выявлено в 38 %, повышенное – в 62 % наблюдений. В группе со средней степенью гастропатии пониженная экспрессия данного маркера в эпителиальных клетках СОЖ обнаружена у 23 %, повышенная – у 77 % пациентов. У пациентов, имеющих ПГ без признаков ПГГ, отмечалось снижение уровня экспрессии урокиназы в 22 % случаев, повышение в 78 %. В группе контроля экспрессия урокиназы была низкой в 9 % и высокой – в 91 % наблюдений.

В результате ИГХ исследования экспрессии PAI-1 в стенках сосудов СОЖ пациентов с ПГГ выявлено, что его экспрессия отмечалась только в группе контроля, отсутствие PAI-1 выявлено в 55 % случаев, умеренная/выраженная экспрессия – в 45 % наблюдений. Во всех остальных группах экспрессия PAI-1 в сосудах не отмечалась. При сопоставлении результатов экспрессии PAI-1 между контрольной группой и группой пациентов с ПГГ выявлены достоверные различия (p<0,001). При ПГГ экспрессии PAI-1 не выявлено в сосудах ни при легкой степени тяжести, ни при средней, в то время как в норме отмечалась экспрессия в 45 % случаев.

Сравнение экспрессии данного маркера в группах пациентов показало, что его содержание в сосудах желудка достоверно выше в контрольной группе, чем в группе с ПГ без ПГГ (p<0,001). Группы пациентов с гастропатией



тий и с ПГ без ПГГ между собой не сравнивали, так как экспрессия в сосудах отсутствовала во всех случаях.

ИГХ исследование экспрессии PAI-1 в эпителиальных клетках СОЖ пациентов с ПГГ показало, что его сниженная и повышенная экспрессия встречались в одинаковом количестве случаев (по 50 %). В группе с легкой степенью гастропатии сниженное содержание PAI-1 выявлено в 54 %, повышенное – в 46 % наблюдений (табл.3). В группе со средней степенью гастропатии, наоборот, пониженная экспрессия PAI-1 в эпителиальных клетках СОЖ обнаружена у 46 %, повышенная – у 54 % пациентов. У пациентов, имеющих ПГ без признаков ПГГ, отмечалось снижение уровня экспрессии PAI-1 в 22 % случаев, повышение – в 78 %. В группе контроля экспрессия PAI-1 была низкой в 9 % и высокой – в 91 % наблюдений. Проведен анализ соотношения уровней экспрессии активатора плазминогена – урокиназы и его ингибитора (PAI-1).

Таблица 4

Экспрессия PAI-1 в эпителиальных клетках СОЖ

Экспрессия PAI-1	ПГГ	ПГГ легкой степени	ПГГ средней степени	ПГ без ПГГ	Контрольная группа
Отсутствие экспрессии (%)	50*	54*	46*	22	9
Наличие экспрессии (%)	50	46	54	78	91

Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

Для оценки их соотношений в стенках сосудов СОЖ типы экспрессии были разделены на 3 группы: повышенная экспрессия uPA при отсутствии экспрессии PAI-1, пониженная экспрессия uPA при отсутствии экспрессии PAI-1 и повышенная экспрессия uPA при наличии экспрессии PAI-1, которая встречалась только в группе контроля. Случаев пониженной экспрессии uPA при наличии экспрессии PAI-1 выявлено не было. В контрольной группе отмечено повышенное содержание uPA в стенках сосудов СОЖ при наличии экспрессии PAI-1 примерно в половине наблюдений. У пациентов с ПГ без ПГГ, а также при развитии ПГГ

выявлено исчезновение экспрессии PAI-1 при незначительном снижении uPA по сравнению с контролем ( $p=0,001$  и  $p=0,04$ , соответственно).

Преобладание активаторов плазминогена над ингибиторами активатора плазминогена приводит к усилению фибринолиза. Развивающаяся при ПГГ гипоксия может вызывать повреждение эндотелиальных клеток сосудов СОЖ и массивный выброс активаторов плазминогена, что приводит к усиленной деградации фибрина под действием плазмина и, в свою очередь, к кровотечениям. Преобладание uPA над PAI-1 не только в группе ПГГ, но и у пациентов с ПГ без признаков ПГГ свидетельствует о том, что у них также присутствует риск развития желудочных кровотечений. Таким образом, в нашем исследовании при изучении экспрессии PAI-1 выявлено, что его содержание в сосудах СОЖ статистически достоверно выше в контрольной группе, чем в группе пациентов с ПГГ и с ПГ без ПГГ. Сравнение экспрессии PAI-1 в эпителиальных клетках СОЖ в группах пациентов показало, что его экспрессия достоверно чаще отсутствовала в группе с ПГГ, чем в норме.

Анализ соотношения уровней экспрессии uPA и PAI-1 показал статистически значимое преобладание экспрессии активатора плазминогена урокиназного типа над его ингибитором в стенках сосудов СОЖ у пациентов с ПГГ и с ПГ без признаков ПГГ по сравнению с контролем. Различные аспекты патогенеза, выявленные при ИГХ, позволят сформировать различные группы больных в зависимости от выбранной лечебной тактики и проследить в них результаты для определения наиболее оптимального метода лечения.

### Выводы

ИГХ исследование убедительно доказало, что ПГГ является потенциальным источником кровотечения в связи с чем нуждается в обязательном лечении с целью профилактики ЖКК.

Преобладание uPA над PAI-1 приводит к усиленной деградации фибрина под действием плазмина и, в свою очередь, может играть определенную роль в развитии кровотечений.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Декомпенсований цироз печінки / В. І. Русин, В. О. Сипливий, А. В. Русин и [и др.] – Ужгород : ВЕТА-Закарпаття, 2006. – 232 с.
2. Кушнир И. Э. Портальная гипертензия: от патофизиологии к лечению / И. Э. Кушнир // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 86–92.
3. Ackerman Z. Guidelines for diagnosis and management of cirrhotic ascites and its complications / Z. Ackerman, E. Sikuler, M. Braun // The Israeli Association for the Study of the Liver. – 2012. – Vol. 151, № 12. – P. 705–719.
4. Albrades J. G. Hemodynamic effects and safety of one month simvastatin treatment in patients with cirrhosis and portal hypertension. A double blind randomized, placebo controlled multicenter trial / J. G. Albrades, A. Albillos, J. Turnes [et al.] // J. Hepatol. – 2008. – № 48. – P. 25 A.
5. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the management of portal hypertension / T. D. Boyer, Z. J. Haskal // Hepatology. – 2010. – Vol. 51, № 1. – P. 306.

РОЛЬ АКТИВАТОРІВ  
ПЛАЗМІНОГЕНУ  
У ВИНИКНЕННІ  
ГЕМОРАГІЧНИХ  
УСКЛАДНЕНЬ ПРИ РІЗНИХ  
СТАДІЯХ ПОРТАЛЬНОЇ  
ГІПЕРТЕНЗІЇ

*В. В. Бойко,  
Д. О. Мирошниченко,  
А. М. Шевченко,  
І. І. Арсеній, В. О. Бабіч*

THE ROLE OF  
PLASMINOGEN ACTIVATORS  
IN THE OCCURRENCE  
OF HEMORRHAGIC  
COMPLICATIONS DURING  
DIFFERENT STAGES OF  
PORTAL HYPERTENSION

*V. V. Boyko,  
D. A. Myroshnychenko,  
A. N. Shevchenko, I. I. Arseniy,  
V. A. Babich*

**Резюме.** У роботі представлено результати морфометричного та імуногістохімічного досліджень біоптатів слизової оболонки шлунка у хворих на портальну гіпертензію при різних рівнях блоку з метою вивчення основних показників активаторів плазміногену та їх роль у виникненні кровотеч з варикозно-розширених вен стравоходу і шлунку. Показано, що переважання uPA над PAI-1 призводить до посиленої деградації фібрину під дією плазміну і, в свою чергу, може відігравати певну роль у розвитку кровотеч.

**Ключові слова:** портальна гіпертензія, активатори плазміногену, кровотеча з варикозно-розширених вен стравоходу, дилатація судин.

**Summary.** In this article are presents the results of morphometric and immunohistochemical studies of biopsies of the gastric mucosa in patients with portal hypertension, different levels of blocks for the purpose of studying the main indicators of plasminogen activators and their role in occurrence bleeding from varicose veins of oesophagus and stomach. It is shown that the prevalence of over uPA PAI-1 leads to enhanced degradation of fibrin by the action of plasmin and, in turn, may play a role in the development of bleeding.

**Key words:** portal hypertension, plasminogen activators, bleeding from varices of the esophagus, dilation of blood vessels.