

Генетичні та морфологічні аспекти розвитку зовнішніх кишкових нориць

О. Ю. Усенко, Я. Ю. Войтів

Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН України, м. Київ

Genetic and morphological aspects of the enterocutaneous fistula development

O. Yu. Usenko, Ya. Yu. Voitiv

Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv

Реферат

Мета. Провести аналіз частоти поліморфних варіантів генів матриксної металопротеїнази 2-го типу (C¹³⁰⁶→T) та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A) у хворих із зовнішніми кишковими норицями та виявити її зв'язок з морфологічними змінами сполучної тканини.

Матеріали і методи. У 24 пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями, які лікувались у Національному інституті хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова впродовж 2016 - 2020 рр, проведені лабораторні, генетичні, гістологічні, імуногістохімічні та статистичні дослідження.

Результати. Генетичний аналіз поліморфізму генів матриксної металопротеїнази 2-го типу (C¹³⁰⁶→T) та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A) дозволив визначити варіанти генотипів, асоційовані з ризиком розвитку зовнішніх кишкових нориць. При імуногістохімічному дослідженні тканин з моноклональними антитілами до α -гладком'язового актину виявлено нерівномірну, вогнищеву експресію в клітинах гладком'язового диференціювання та у фібробластах, а з моноклональними антитілами до колагену IV типу – помірну позитивну експресію в базальній мембрані судин, у гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, у ділянках сполучної тканини.

Висновки. Зовнішні кишкові нориці в 1,5 разу частіше зустрічаються у носіїв гомозиготного GG генотипу гена тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A) та майже вдвічі рідше у носіїв гетерозиготного GA генотипу - відповідно 25 і 40% (p=0,057). Носіїв мінорного гомозиготного AA генотипу серед пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями не було виявлено, тоді як у контрольній групі їх кількість становила 10%. Імуногістохімічне дослідження тканин тонкої і товстої кишок з моноклональними антитілами до колагену IV типу та α -гладком'язового актину виявило ознаки патологічного ремоделювання сполучної тканини.

Ключові слова: зовнішні кишкові нориці; поліморфізм генів матриксної металопротеїнази 2-го типу та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази 2-го типу; імуногістохімічні маркери.

Abstract

Objective. To analyze the frequency of polymorphic variants of matrix metalloproteinase-2 (C-1306→T) and tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) genes in patients with enterocutaneous fistulas and to identify the connection with morphological changes of connective tissue.

Materials and methods. The object of the study comprises 24 patients with enterocutaneous fistula who were treated in the Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology during 2016-2020. Laboratory, genetic, histological studies and statistical analysis were performed.

Results. As a result of genetic and statistical analysis of the matrix metalloproteinase-2 (C¹³⁰⁶→T) and tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G³⁰³→A) gene single nucleotide polymorphisms, genotype variants have been identified that are associated with the risk of enterocutaneous fistula development. Immunohistochemical examination of tissues with monoclonal antibodies to α -smooth muscle actin (α -SMA) revealed uneven, focal expression in smooth muscle differentiation cells and fibroblasts. Examination with monoclonal antibodies to Collagen IV there is a moderate positive expression in the basement membrane of blood vessels, in smooth muscle cells of the muscular layer of the vascular wall, in areas of connective tissue.

Conclusion. Enterocutaneous fistula is 1,5 times more common in carriers of homozygous GG genotype of the tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) gene and twice less common in heterozygotes GA (25% vs. 40%, p=0,057). Carriers of minor homozygotes of AA genotype in the group with enterocutaneous fistula were not detected, while a similar genotype in the control group was found in 10% of cases. Immunohistochemical examination of small and large intestine tissues with monoclonal antibodies to Collagen IV and α -SMA revealed signs of pathological connective tissue remodeling.

Keywords: enterocutaneous fistula, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitors of metalloproteinase-2, gene polymorphism, immunohistochemical markers.

Зовнішні кишкові нориці (ЗКН) є тяжким ускладненням в абдомінальній хірургії, яке несе реальну загрозу для життя пацієнта. До цього часу хірургічна спільнота не має єдиної думки щодо причин розвитку ЗКН, лікувальної тактики у разі розвитку цього ускладнення.

Кишкові нориці виникають у 1 – 2% пацієнтів, які перенесли операції на органах черевної порожнини, але вони створюють багато проблем як з хірургічної точки зору, так і з точки зору лікування самого хворого [1]. В англomовній літературі найчастіше зустрічається проста та зруч-

на класифікація, яка базується на анатомічних, функціональних (дебіт у мл/добу) та етіологічних характеристиках кишкової нориці [2]. Існує класифікація, яка базується на етіології нориці: тип I (стравохідна, гастродуоденальна), тип II (тонкокишкова), тип III (товстокишкова), тип IV (зовнішня нориця незалежно від походження) [3].

Післяопераційні кишкові нориці становлять 75 – 85% усіх кишкових нориць. Післяопераційне ускладнення у вигляді нориці найчастіше розвивається після онкологічних операцій, втручань з приводу запальних захворювань кишок та гострої кишкової непрохідності [4].

Смертність у разі розвитку кишкових нориць у ранньому післяопераційному періоді становить 16,5 – 57,5%, у гострому (несформовані кишкові нориці) – 20,0 – 80,0%, при високих тонкокишкових норицях – 82 – 90% [5]. Незважаючи на вдосконалення харчової та метаболічної підтримки, антимікробної терапії, поліпшення догляду за ранами та вдосконалення операційної техніки, рівень смертності при цьому ускладненні залишається вкрай високим [3, 5].

У літературних джерелах практично немає публікацій про роль недиференційованої дисплазії сполучної тканини в розвитку кишкових нориць.

З огляду на майже не досліджену роль генетичної схильності у розвитку післяопераційних ускладнень, а саме ЗКН, ми поставили мету вивчити поліморфізм генів, що кодують матриксну металопротеїназу 2-го типу (ММР-2) та тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ 2-го типу (ТІМР-2) у даної групи хворих. Саме ці гени були вибрані не випадково – ми керувалися основними відомими патофізіологічними механізмами, які беруть участь у формуванні міжкишкових анастомозів [7], процесах загоювання кишки після ятрогенних пошкоджень [8], формуванні нориць при запальних захворюваннях кишок [9].

Проаналізувавши літературу, ми знайшли публікації про дослідження експресії матриксних металопротеїназ (ММР) та їх участь у ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу при неспроможності швів анастомозів [10], запальних захворюваннях кишок [11]. Є публікації про зв'язок алейного поліморфізму гена теплового шоку HSP70-2 та розвитку ЗКН [12]. Опубліковано дані про те, що тяжкий ступінь дисплазії сполучної тканини у хворих із кишковими норицями є несприятливою прогностичною ознакою та у 1,6 разу збільшує смертність [13]. Проте публікацій про дослідження генетичного поліморфізму ММР та їх регуляторів в аспекті розвитку ЗКН ми не знайшли.

Мета дослідження: провести аналіз частоти поліморфних варіантів генів ММР-2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та ТІМР-2 (G³⁰³→A) у хворих із ЗКН та виявити зв'язок з морфологічними змінами сполучної тканини.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом проспективного дослідження були 24 пацієнти із ЗКН (основна група), які лікувались у Національному інституті хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова впродовж 2016 – 2020 рр. Для оцінки поліморфізму ге-

нів у популяції обстежено 80 практично здорових людей (контрольна група). Досліджувані групи були порівнянні за віком і статтю пацієнтів.

Генетичні дослідження проводили в лабораторії відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Букальний епітелій забирали з використанням булакних щіток та наступним заморожуванням зразків і їх зберіганням при температурі –20 °С. ДНК для генотипування екстрагували із зразків, використовуючи набори Diatom™ Prep 200 (Лабораторія Ізоген, Москва, Росія) відповідно до протоколу виробника.

Методом ПЛР у режимі реального часу досліджували поліморфізм таких генів: C⁻¹³⁰⁶→T (ММР2), rs243865 та G³⁰³→A (ТІМР2), rs9900972. Реакції ампліфікації проводили з використанням 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США), у кінцевій реакції об'ємом 20 мкл містилися 2-кратний TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, США), TaqMan Assay C_1792560_10 і матрична ДНК. Ампліфікація фрагментів генів складалася із стадії денатурації при 95 °С протягом 20 с і 40 циклів ампліфікації при 95 °С протягом 3 с і при 60 °С протягом 30 с. Аналіз даних проводився із застосуванням програмного забезпечення 7500 Fast Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, США).

Морфологічні дослідження були проведені на кафедрі патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Для оцінки особливостей і властивостей сполучної тканини було проведено гістологічне та імуногістохімічне (ІГХД) дослідження тканини тонкої та товстої кишок. Гістологічні зрізи товщиною 3 – 4 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за Ван Гізоном, за Массоном (Masson Trichrome Kit 87019), проводилася ШИК-реакція.

Використано систему детекції Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase), хромоген ДАБ (Masterdiagnostica, Гранада, Іспанія). Для проведення ІГХД використано такі маркери (Thermo Scientific, США): моноклональні антитіла (МАТ) до кологену IV типу (clone CIV22), α-гладком'язового актину – α-SMA (clone CIV22). Експресію маркерів оцінювали за наявністю характерного коричневого забарвлення клітин різного ступеня інтенсивності згідно з візуально-аналоговою шкалою. Інтенсивність експресії оцінювали від 0 (відсутня) до +++ (виражена) [14].

Мікроскопічне дослідження та фотографування проводили з використанням світлооптичних мікроскопів ZEISS (Німеччина) з системою обробки даних «AxioImager. A2» при збільшенні об'єктивів ×5, ×10, ×20, ×40, бінокулярної насадки 1,5 та окулярів 10 з камерою ERc 5s. та з системою обробки даних PrimoStar з камерою AxioCam 105color.

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програм Statistica 7.0 та Excel 2000. Номінальні дані подано у вигляді кількісних та відсоткових значень. Достовірність відмінностей середніх вели-

чин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного статистичного аналізу (URL: <http://www.dgmp.kyiv.ua/index.php/snip-ka>). Відповідність розподілу генотипів перевіряли за допомогою тесту Харді – Вайнберга. Для порівняння розподілу генотипів в основній і контрольній групах застосовували критерій Пірсона χ^2 .

Результати

В основній групі переважали пацієнти із ЗКН після ургентних операцій з приводу гострої кишкової непрохідності, розповсюдженого перитоніту, деструктивного панкреатиту, гострого деструктивного апендициту. У 9 (37,5%) із 24 пацієнтів причиною розвитку нориць була неспроможність швів міжкишкових анастомозів. Нориці виникли у 2 пацієнтів із гігантськими рецидивними вентральними грижами (защемлення кишки в гризовому мішку – 1, фіксація кишки до сітчастого трансплантата – 1). У хворих з деструктивним панкреатитом були товстокишкові нориці (пролежень від дренажа – 1, парапанкреатичний абсцес – 3). При ятрогенному пошкодженні ободової кишки під час

вісцеролізу нориці відмічені у 2 хворих, при пошкодженні дванадцятипалої кишки під час правобічної нефректомії – у 1, при перфорації дивертикула товстої кишки – у 2, при перфорації сліпої та висхідної ободової кишок внаслідок абсцесів черевної порожнини – у 2. У 2 хворих переконливих причин формування нориць не було встановлено.

Критерієм виключення пацієнтів із дослідження була наявність нориць при неспецифічному виразковому коліті, хворобі Крона та кишкових нориць, що виникли на фоні променевої терапії.

З метою виявлення можливої асоціації поліморфних варіантів генів MMP-2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та TIMP-2 (G³⁰³→A) із ризиком розвитку ЗКН був проведений однофакторний статистичний аналіз частоти генотипів у досліджуваних групах (див. таблицю).

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування гена MMP-2 (C⁻¹³⁰⁶→T) при порівнянні контрольної групи (n=80) та основної групи пацієнтів з ЗКН (n=24) засвідчив відповідність розподілу генотипів закону Харді–Вайнберга (p>0,05), яка у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту χ^2 з одним ступенем свободи без використання корекції безперевності Йетса. Використавши тест χ^2 з двома ступенями свободи, ми не знайшли статистично значущих відмінностей у розподілі генотипів у групі хворих і у групі практично здорових людей (p>0,05).

Проаналізувавши всі моделі успадкування, ми вибрали найкращу – рецесивну модель із найнижчим інформаційним критерієм Акайке.

Звертає на себе увагу той факт, що в основній групі розподіл частоти поліморфізму промотору гена MMP-2 загалом відповідав показникам контрольної групи за CC, CT і TT варіантами (рис. 1).

При аналізі алельного поліморфізму промотору (G³⁰³→A) гена TIMP-2 в контрольній і основній групах відмінності частоти розподілу генотипів були на межі статистичної значущості (p=0,057, див. таблицю).

Відповідність розподілу генотипів закону Харді–Вайнберга в основній групі була перевірена за допомогою тесту χ^2 з одним ступенем свободи без використання корекції безперевності Йетса. Проаналізувавши всі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Акайке – рецесивну.

Розподіл поліморфних варіантів генів MMP-2 (C⁻¹³⁰⁶→T), rs243865 та TIMP-2 (G³⁰³→A), rs9900972 у досліджуваних групах

Варіанти генів	Досліджувані групи			
	контрольна (n=80)		основна (n=24)	
	абс.	%	абс.	%
MMP-2 (C ⁻¹³⁰⁶ →T)				
CC	38	47,5	13	54,1
CT	34	42,5	8	33,3
TT	8	10	3	12,5
Тест Харді–Вайнберга (χ^2 , p)	$\chi^2=0,01$, p>0,05		$\chi^2=0,21$, p>0,05	
Тест χ^2 , (χ^2 , p)	-		$\chi^2=0,201$, p>0,05	
TIMP-2 (G ³⁰³ →A)				
GG	40	50	18	75
GA	32	40	6	25
AA	8	10	-	-
Тест Харді–Вайнберга (χ^2 , p)	$\chi^2=0,18$, p>0,05		$\chi^2=0,39$, p>0,05	
Тест χ^2 (χ^2 , p)	-		$\chi^2=3,97$, p=0,057	

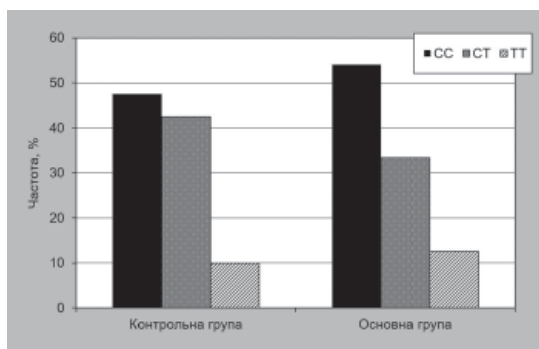


Рис. 1.

Розподіл частоти алельного поліморфізму промотору (C⁻¹³⁰⁶→T) гена MMP-2.

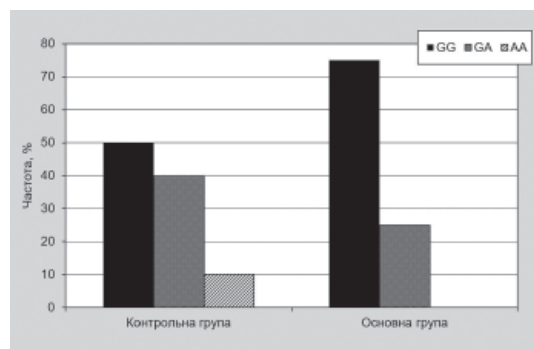
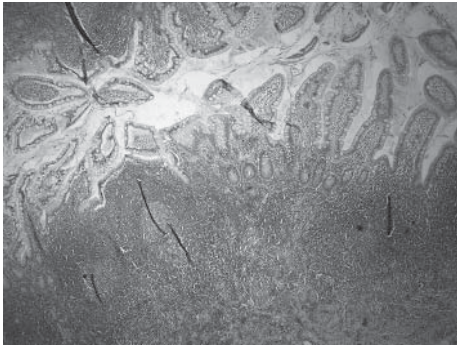


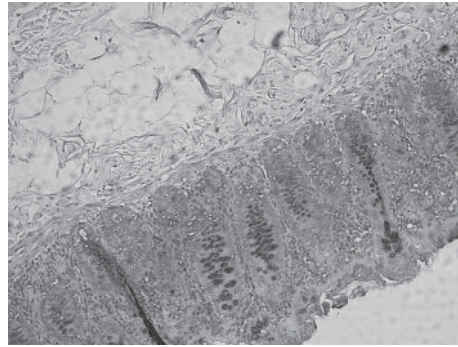
Рис. 2.

Розподіл частоти алельного поліморфізму промотору (G³⁰³→A) гена TIMP-2.



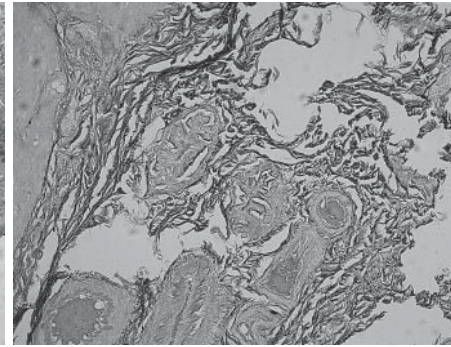
*Рис. 3.
Мікрофото.*

Фрагмент тканини стінки тонкої кишки з вираженою лімфогістоплазмочитарною інфільтрацією, розростанням сполучної тканини в зоні власної пластинки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 40$.



*Рис. 4.
Мікрофото.*

Фрагмент тканини стінки тонкої кишки з нерівномірним збереженням секретії. Забарвлення за допомогою ШИК-реакції. $\times 100$.



*Рис. 5.
Мікрофото.*

Фрагмент тканини стінки товстої кишки з пучками фіброзної тканини, що дифузно проростають між м'язовими волокнами, периваскулярно. Забарвлення за Ван-Гізоном. $\times 100$.

В обстеженій популяції в контрольній групі та в основній групі пацієнтів із ЗКН розподіл носіїв GG, GA та AA генотипів суттєво відрізнявся. Так, частота домінуючого гомозиготного GG варіанта в 1,5 разу перевищувала показники контролю. Гетерозиготний GA генотип в основній групі зустрічався майже вдвічі рідше, ніж у контролі – 25 і 40% відповідно ($p=0,057$). Носіїв гомозиготного AA генотипу серед пацієнтів із ЗКН не було виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній зустрічався з частотою 10% (рис. 2).

При морфологічному дослідженні тканин тонкої та товстої кишок відмічались такі гістологічні зміни: нерівномірно виражене розростання сполучної тканини, дифузна та вогнищева лімфогістоплазмочитарна інфільтрація, зони ангіоматозу, повнокров'я судин та гіаліноз їх стінок (рис. 3, 4).

При забарвленні за Ван-Гізоном візуалізувались пучки фіброзної тканини (червоного кольору), що дифузно проростали між м'язовими волокнами, на окремих ділянках фіброзна тканина вповнювала більшість площі поля зору (рис. 5).

При проведенні ІГХД з МАТ до α -SMA відмічалась незначна, переважно вогнищева експресія у стінках судин, у зоні власної пластинки, зоні склерозу з інтенсивністю переважно до 1 бала в ділянках тканини з кишковими норицями (рис. 6).

При проведенні ІГХД з МАТ до колагену IV типу у фрагментах стінки тонкої кишки (рис. 7) відмічалась переважно слабо виражена позитивна експресія у базальній мембрані судин, гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, ділянках сполучної тканини з інтенсивністю забарвлення до +, вогнищево до ++.

Обговорення

У результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму генів MMP-2 ($C^{-1306} \rightarrow T$) та TIMP-2 ($G^{303} \rightarrow A$) були визначені варіанти генотипів, асоційовані з ризиком розвитку ЗКН.

При аналізі частоти алельного поліморфізму гена MMP-2 у пацієнтів із ЗКН не було виявлено статистично достовірних відмінностей у порівнянні з контролем.

Розподіл частоти поліморфізму промотору гена MMP-2 загалом відповідав показникам контрольної групи за CC, CT і TT варіантами.

У той же час відмінності частоти розподілу генотипів гена TIMP-2 ($G^{303} \rightarrow A$) у контрольній та основній групах були на межі статистичної значущості ($p=0,057$). Так, частота розподілу домінуючого гомозиготного GG варіанта в 1,5 разу перевищувала аналогічний показник контролю ($p=0,057$). Гетерозиготний GA генотип в основній групі зустрічався майже вдвічі рідше, ніж у контрольній: 25 і 40% ($p=0,057$). Носіїв гомозиготного AA генотипу у пацієнтів із ЗКН не було виявлено, тоді як у контрольній групі частота аналогічного варіанта становила 10%.

Ураховуючи роль MMP та їх інгібіторів у процесах синтезу і протеолізу, ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу, обміні білків сполучної тканини, а також здатність впливати на проникність судинної стінки й ангіогенез, актуальність їх вивчення в контексті патогенезу виникнення ЗКН не викликає сумнівів.

На наш погляд, майбутні дослідження тригерних факторів абдомінальних післяопераційних ускладнень повинні більше зміститися на клітинний та молекулярний рівні. Досконале розуміння механізмів розвитку кишкових нориць сприятиме напрацюванню нових діагностичних, прогностичних та лікувальних методик.

Виявлені нами відмінності алельних варіантів генів MMP-2 ($C^{-1306} \rightarrow T$) та TIMP-2 ($G^{303} \rightarrow A$) у пацієнтів із ЗКН та патологією сполучної тканини є підставою для подальшого вивчення і пошуку молекулярно-генетичних маркерів, що кодують основні ланки патогенезу абдомінальних післяопераційних ускладнень.

Висновки

1. ЗКН в 1,5 разу частіше зустрічаються у носіїв гомозиготного GG генотипу гена TIMP-2 ($G^{303} \rightarrow A$) та майже вдвічі рідше у носіїв гетерозиготного GA генотипу ($p=0,057$). Носіїв мінорного гомозиготного AA генотипу у пацієнтів із ЗКН не було виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній групі зустрічався з частотою 10%.

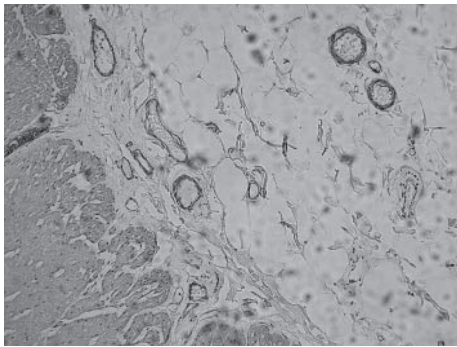


Рис. 6.
Мікрофото.

Тканина стінки товстої кишки з вогнищевою експресією з інтенсивністю до 1 бала. ІГХД з МАТ до α -SMA. $\times 100$.

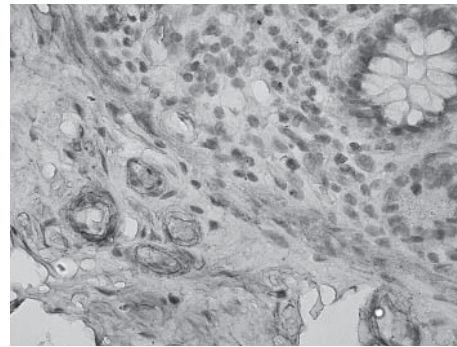


Рис. 7.
Мікрофото.

Нерівномірна слабка позитивна експресія у власній пластинці, зоні розростання сполучної тканини, стінці окремих судин, вогнищева помірна експресія у фрагменті стінки тонкої кишки. ІГХД з МАТ до колагену IV типу. $\times 100$.

2. Алейний поліморфізм промотору (C⁻¹³⁰⁶→T) гена MMP-2 у пацієнтів із ЗКН статистично вірогідно не відрізняється від показників контрольної групи.

3. При ІГХД тканини з МАТ до α -SMA у групі хворих із ЗКН виявлено нерівномірну, вогнищеву експресію в клітинах гладком'язового диференціювання та фібробластах, а з МАТ до колагену IV типу – помірну позитивну експресію в базальній мембрані судин, гладком'язових клітинах м'язового шару стінки судин, ділянках сполучної тканини, що є ознаками її патологічного ремоделювання.

4. Молекулярно-генетичні дослідження можуть бути новим перспективним напрямом для напрацювання сучасних персоніфікованих діагностичних критеріїв і моделей прогнозування розвитку та перебігу післяопераційних абдомінальних ускладнень, зокрема ЗКН.

Підтвердження

Фінансування. Джерелом фінансування публікації статті є кошти її авторів.

Інформація про внесок кожного учасника. Внесок кожного автора в цю роботу однаковий. Всі автори прочитали і схвалили остаточний варіант рукопису.

Конфлікт інтересів. Автори, які взяли участь у цьому дослідженні, декларують відсутність конфлікту інтересів щодо цього рукопису.

Згода на публікацію. Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

References

1. Schechter WP, Hirshberg A, Chang DS, Harris HW, Napolitano LM, Wexner SD, Dudrick SJ. Enteric fistulas: principles of management. *J Am Coll Surg.* 2009 Oct;209(4):484–91. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.05.025. Epub 2009 Jul 2. PMID: 19801322.
2. Teixeira PG, Inaba K, Dubose J, Salim A, Brown C, Rhee P, et al. Enterocutaneous fistula complicating trauma laparotomy: a major resource burden. *Am Surg.* 2009 Jan;75(1):30–2. doi: 10.1177/000313480907500106. PMID: 19213393.
3. Schein M, Decker GA. Postoperative external alimentary tract fistulas. *Am J Surg.* 1991 Apr;161(4):435–8. doi: 10.1016/0002-9610(91)91107-t. PMID: 1827960.
4. Holzheimer RG, Mannick JA, editors. *Surgical treatment—evidence-based and problem-oriented.* München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2001. 843 p. ISBN-10: 3-88603-714-2.
5. Whelan JF Jr, Ivatury RR. Enterocutaneous fistulas: an overview. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2011 Jun;37(3):251–8. doi: 10.1007/s00068-011-0097-2. Epub 2011 Mar 29. PMID: 26815107.
6. Williams LJ, Zolfaghari S, Boushey RP. Complications of enterocutaneous fistulas and their management. *Clin Colon Rectal Surg.* 2010 Sep;23(3):209–20. doi: 10.1055/s-0030-1263062. PMID: 21886471; PMCID: PMC2967321.
7. Lloyd DA, Gabe SM, Windsor AC. Nutrition and management of enterocutaneous fistula. *Br J Surg.* 2006 Sep;93(9):1045–55. doi: 10.1002/bjs.5396. PMID: 16804873.
8. Berry SM, Fischer JE. Classification and pathophysiology of enterocutaneous fistulas. *Surg Clin North Am.* 1996 Oct;76(5):1009–18. doi: 10.1016/s0039-6109(05)70495-3. PMID: 8841361.
9. van Haaften WT, Mortensen JH, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Dijkstra G, Olinga P. Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Jul;46(1):26–39. doi: 10.1111/apt.14092. Epub 2017 May 8. PMID: 28481042; PMCID: PMC6221070.
10. Stumpf M, Junge K, Wendlandt M, Krones C, Ulmer F, Klinge U, Schumpelick V. Risikofaktoren für das Auftreten postoperativer Anastomoseninsuffizienzen nach kolorektalen Resektionen [Risk factors for anastomotic leakage after colorectal surgery]. *Zentralbl Chir.* 2009 Jun;134(3):242–8. German. doi: 10.1055/s-0028-1098773. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19536719.
11. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007 Jun 7;13(21):2960–6. doi: 10.3748/wjg.v13.i21.2960. PMID: 17589947; PMCID: PMC4171149.
12. Chen J, Ren JA, Han G, Gu GS, Wang GF, Wu XW, et al. Polymorphism of heat shock protein 70-2 and enterocutaneous fistula in Chinese population. *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 21;20(35):12559–65. doi: 10.3748/wjg.v20.i35.12559. PMID: 25253958; PMCID: PMC4168091.
13. Voitiv YaYu, Dzhemiliev A. Connective tissue pathology as a risk factor for intestinal fistula development. *East European Scientific Journal.* 2019;(12):57–61.
14. Dabbs D, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications, 4th Edition.* Saunders Elsevier; 2014: 960 p. ISBN: 978-1455744619.

Надійшла 12.05.20