

ПРОБЛЕМИ ЗАГАЛЬНОЇ ХІРУРГІЇ

Klinichna khirurgiia. 2022 March/April; 89(3-4):3-7.
DOI: 10.26779/2522-1396.2022.3-4.03

Неспроможність швів кишкових анастомозів: фактори ризику та прогнозування на основі генетичних досліджень

О. Ю. Усенко, Я. Ю. Войтів

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

The intestinal sutures insufficiency: factors of risk and prognostication, based on genetic investigations

O. Yu. Usenko, Ya. Yu. Voitiv

Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv

Реферат

Мета. Покращити результати лікування хворих із неспроможністю швів кишкових анастомозів, використавши аналіз частоти поліморфних варіантів генів матричної металопротеїнази 2-го типу (C¹³⁰⁶→T) і тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A) та напрацювавши методи генетичної діагностики і прогнозування такого ускладнення.

Матеріали і методи. У 32 пацієнтів із неспроможністю кишкових швів, які отримували лікування у Національному інституті хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова впродовж 2016 - 2021 рр., проведені лабораторні, генетичні, імуногістохімічні та статистичні дослідження.

Результати. Генетичний і статистичний аналіз поліморфізму генів матричної металопротеїнази 2-го типу (C¹³⁰⁶→T) і тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A) дав змогу визначити варіанти генотипів, асоційовані з ризиком розвитку неспроможності швів анастомозів порожнистих органів травлення. На основі отриманих даних напрацьовано спосіб прогнозування неспроможності швів кишкових анастомозів. Таке ускладнення в 1,36 рази частіше зустрічається у носіїв гомозиготного CC генотипу гена матричної металопротеїнази 2-го типу та вдвічі рідше (5,9%) у носіїв мінорних гомозигот TT, ніж у контролі - 10% (p<0,05). Серед пацієнтів із неспроможністю швів анастомозів статистично значуще в 1,6 рази більше виявлено носіїв гомозиготного GG варіанта гена тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу. Носіїв мінорних гомозигот AA серед пацієнтів із неспроможністю кишкових швів не виявлено, тоді як аналогічний генотип у контролі зустрічався з частотою 10% (p<0,05). З метою вивчення ризику можливого виникнення неспроможності швів кишкових анастомозів за наявності асоціації вивчених упродовж дослідження генотипів ми проаналізували низку клініко-лабораторних показників. Виявлено патогенетичне значення ризикових щодо виникнення неспроможності кишкових швів алелей поліморфних варіантів генів матричної металопротеїнази 2-го типу та тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу, які супроводжувалися гіпопротеїнемією, високими показниками біохімічних маркерів біодеградації колагену та зниженою експресією моноклональних антитіл до α -гладком'язового актину і колагену IV.

Висновки. Запропонований спосіб, який передбачає генетичне дослідження поліморфізму генів матричної металопротеїнази 2-го типу (C¹³⁰⁶→T) та тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу (G³⁰³→A), дає змогу прогнозувати ймовірність розвитку неспроможності швів кишкових анастомозів і на підставі цього в подальшому покращити вибір тактики лікування таких хворих.

Ключові слова: неспроможність кишкових швів; гени матричної металопротеїнази 2-го типу; гени тканинного інгібітора матричної металопротеїнази 2-го типу; спосіб генетичного прогнозування.

Abstract

Objective. To improve the results of treatment in patients, suffering insufficiency of sutures of intestinal anastomoses, using analysis of rate in the genes polymorphous variants of the matrix metalloproteinase Type 2 (C¹³⁰⁶→T) and the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2 (G³⁰³→A), as well as the result of elaboration of genetic diagnosis and prognostication of such complication.

Materials and methods. In 32 patients, suffering insufficiency of intestinal sutures, which were treated in Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology during 2016 - 2021 yrs, there were conducted the laboratory, genetic, immunohistochemical and statistical investigations.

Results. Genetic and statistical analysis for the genes polymorphism of the matrix metalloproteinase Type 2 (C¹³⁰⁶→T) and the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2 (G³⁰³→A) have permitted to determine the genotypes variants, associated with risk for the sutures insufficiency occurrence in the hollow gut organs anastomoses. Basing on the data obtained, the prognostication method was elaborated for the sutures insufficiency occurrence in intestinal anastomoses. Such complications are occurred in 1,36 times more frequently in carriers of homozygous CC genotype in gene of the matrix metalloproteinase Type 2 and in two times lesser (5,9%) in carriers the minor homozygotes TT, than in the control - 10% (p>0,05). Among the patients with the sutures insufficiency of intestinal anastomoses a statistically significant in 1,6 times more frequent rate of carriers of the homozygous GG gene variant the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2 was revealed. Carriers of the minor homozygotes AA among the patients with the sutures insufficiency in intestinal anastomoses were absent, while the same genotype was revealed in the control with the 10% (p<0,05) rate. With objective to study the occurrence risk for the sutures insufficiency in intestinal anastomoses in presence of association in the studied genotypes we have analyzed several clinic-laboratory indices. There was revealed the pathogenetic significance of alleles of the genes polymorphic variants of the matrix metalloproteinase Type 2 and the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2, which were accompanied by hypoproteinemia, high indices of biochemical markers of collagen biodegradation and lowered expression of monoclonal antibodies for α -smoothmuscular actin and collagen IV, and, finally, have evolved as the risk factors for development of the sutures insufficiency in intestinal anastomoses.

Conclusion. The method proposed consists of genetic investigation of the genes polymorphism of the matrix metalloproteinase Type 2 (C¹³⁰⁶→T) and of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2 (G³⁰³→A). It permits to prognosticate the probability of the sutures insufficiency development in intestinal anastomoses, and, basing on this, to improve the choice of the patients' treatment tactic.

Keywords: the intestinal sutures insufficiency; genes of the matrix metalloproteinase Type 2; genes of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase Type 2; method of genetic prognostication.

Формування анастомоза для відновлення безперервності порожнистих органів травлення супроводжується складним клітинно-молекулярно опосередкованим процесом [1], у якому беруть участь як класичні процеси запалення: альтерація, ексудація, проліферація, так і специфічні репараційні процеси, зумовлені технікою шва, шовним матеріалом, наявністю інфекції та іншими факторами [2].

Неспроможність швів анастомозів порожнистих органів травлення вважають одним із найтяжчих ускладнень в абдомінальній хірургії. Виникає таке ускладнення за даними різних авторів з частотою від 2,1 до 14,6% [3, 4] і супроводжується високою летальністю, яка становить 14 – 21,7% [5], а у разі розвитку розповсюдженого перитоніту зростає до 82,9% [6]. Досі хірургічна спільнота не виробила єдиної точки зору на причини розвитку неспроможності швів кишкових анастомозів і не має ефективного способу прогнозування цього ускладнення. Згідно з літературними даними до факторів ризику розвитку неспроможності швів кишкових анастомозів включають порушення мікроциркуляції у ділянці анастомоза, порушення регенерації тканини, інфекцію, підвищення внутрішньокишкового тиску, зміни реологічних властивостей крові, грубі розлади гомеостазу тощо [3]. Як окрему групу факторів ризику виділяють тактичні та технічні помилки при формуванні анастомозів [7, 8].

Отже, згідно з думкою більшості авторів є чотири основні групи зазначених факторів: стан анастомозованих тканин і морфологічно-функціональні процеси, що відбуваються в них; несприятливі чинники, за наявності яких накладали шви; технічні особливості накладання швів; несприятливі чинники, що виникли в післяопераційному періоді.

Перша група факторів визначальна і фактично відображає життєздатність тканин і якість репараційних процесів. Незважаючи на те що роль регенераційних процесів у формуванні кишкових анастомозів безсумнівна [1], наукових публікацій та досліджень на сучасному методичному рівні на цю тему бракує.

Нечіткі прогностичні критерії виникнення неспроможності кишкових швів, майже не досліджена роль генетичної схильності у розвитку деяких післяопераційних ускладнень потребують нових наукових досліджень у цьому напрямі.

Мета дослідження: покращити результати лікування хворих із неспроможністю швів кишкових анастомозів, використавши аналіз частоти поліморфних варіантів генів матричної металопротеїнази 2-го типу (ММП2) C⁻¹³⁰⁶→T і тканинного інгібітора ММП2 (ТІММП2) G³⁰³→A та напрацювавши методи генетичної діагностики і прогнозування такого ускладнення.

Матеріали і методи дослідження

Проведено проспективне дослідження щодо 32 хворих із неспроможністю швів анастомозів порожнистих органів травлення, які отримували лікування у Національному інституті хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова впродовж 2016 – 2021 рр. Для оцінки поліморфізму генів у популяції обстежено 80 практично здорових людей

(контроль), порівнянних за віком і статтю з досліджуваними пацієнтами. Генетичні дослідження проводили в лабораторії відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця. Букальний епітелій забирали з використанням булакних щіток, далі зразки заморожували та зберігали при температурі –20 °С. Методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі досліджували такі поліморфні варіанти генів: C⁻¹³⁰⁶→T (ММП2), rs243865 та G³⁰³→A (ТІММП2), rs9900972.

Для оцінки стану метаболізму сполучної тканини визначали вміст вільного оксипроліну в сироватці крові та рівень глікозаміногліканів (ГАГ) у сечі.

Морфологічні дослідження проведені на кафедрі патологічної та топографічної анатомії Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика. За допомогою імуногістохімічного дослідження оцінювали особливості та властивості сполучної тканини. Використано систему детекції Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase), хромоген ДАБ – діамінобензидин (Masterdiagnostica, Гранада, Іспанія). Імуногістохімічне дослідження проведено з такими маркерами (Thermo Scientific, США): моноклональними антитілами (МАТ) до колагену IV – clone CIV22, α-гладком'язового актину (α-ГМА) – clone CIV22. Експресію маркерів оцінювали за наявністю характерного коричневого забарвлення клітин різного ступеня інтенсивності згідно з візуальною аналоговою шкалою. Для оцінки інтенсивності експресії використовували шкалу від 0 (відсутня) до +++ (виражена) [9].

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програм «Statistica 7.0» і «Excel 2000». Номінальні дані подано у вигляді кількісних та відсоткових значень. Статистичну значущість відмінностей середніх величин 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 у досліджуваній та контрольній групах застосовували критерій χ^2 Пірсона.

Результати

Переважає більшість (66,7%) пацієнтів із неспроможністю швів кишкових анастомозів, які отримували лікування у клініці, була оперована в інших лікувальних закладах України та звернулася у Національний інститут хірургії та трансплантології з метою визначення тактики подальшого лікування та його проведення. Здебільшого реконструктивні оперативні втручання на органах травлення були виконані у відділенні торакоабдомінальної хірургії. Звертає на себе увагу така цифра: 60,2% ускладнень виникли після планових втручань, що можна пояснити переважанням серед хворих планового контингенту.

На нашу думку, необхідно виділити три принципово різні групи факторів ризику розвитку неспроможності швів кишкових анастомозів:

перша – фактори, на які не можна вплинути на даному етапі розвитку медичної науки, а саме генетично зумовлені особливості репараційних процесів;

друга – фактори, на які можна вплинути (наявність запального процесу, підвищення внутрішньокішкового тиску, гіпопротеїнемія, локальне інфікування в зоні анастомоза, інтрамуральне і загальне порушення кровопостачання, зміни мікроциркуляції, крововтрата, анемія, тривалість операції);

третья – ятрогенні фактори, включаючи технічні помилки при формуванні анастомоза (непрецизійне, грубе накладання швів, надмірна чи недостатня мобілізація стінки органа), неправильний вибір методу анастомозування та шовного матеріалу, натяг у ділянці анастомоза, радіо- та хіміотерапія).

З метою виявлення можливої асоціації поліморфних варіантів генів ММП2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та ТІММП2 (G³⁰³→A) із ризиком розвитку неспроможності кишкових швів нами проведено однофакторний статистичний аналіз частоти генотипів у досліджуваних пацієнтів [10].

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування гена ММП2 (C⁻¹³⁰⁶→T) при порівнянні контрольної групи (n=80) та досліджуваної групи з неспроможністю швів (n=17) засвідчив розподіл генотипів відповідно до закону Харді–Вайнберга (p>0,05), що в контрольній групі було перевірено за допомогою критерію χ^2 з одним ступенем свободи без використання корекції Йетса. Використавши критерій χ^2 із двома ступенями свободи, ми не знайшли статистично значущих відмінностей у розподілі генотипів у групі хворих та у групі практично здорових людей (p>0,05).

Звертав на себе увагу той факт, що в досліджуваній групі було майже вдвічі менше носіїв гомозиготного ТТ генотипу в порівнянні з контролем: 5,9 і 10% відповідно (p>0,05). Проте носіїв СС генотипу, який домінував в обох групах, було найбільше серед пацієнтів із неспроможністю кишкових швів – 64,7%, натомість 47,5% таких носіїв (p>0,05) було в контролі (рис. 1).

При аналізі моделей успадкування гена ТІММП2 G³⁰³→A у контрольній (n=80) та досліджуваній (n=17) групі нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподі-

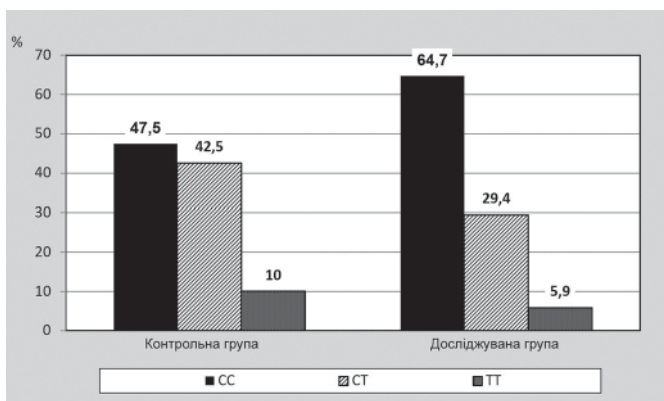


Рис. 1.
Розподіл частоти алельного поліморфізму промотору гена ММП2 (C-1306 →T).

лі носіїв генотипів (p<0,05). Так, серед пацієнтів із неспроможністю швів кишкових анастомозів розподіл носіїв генотипів статистично значущо відрізнявся від їх розподілу в контролі. В обох групах домінував GG варіант, але в досліджуваній групі носіїв цього варіанта було статистично значущо більше, ніж у контрольній групі – 82,4 і 50,0% відповідно (p<0,05). Гетерозиготний GA генотип серед пацієнтів із неспроможністю кишкових швів зустрічався більше ніж удвічі рідше порівняно з контролем – 17,6 і 40,0% відповідно. Носіїв гомозиготного AA генотипу серед пацієнтів із неспроможністю кишкових швів не було виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній зустрічався з частотою 11,4% (рис. 2).

Отже, у результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму генів ММП2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та ТІММП2 (G³⁰³→A) були визначені варіанти генотипів, асоційовані з ризиком розвитку неспроможності швів анастомозів порожнистих органів травлення. Так, серед пацієнтів із неспроможністю кишкових швів носії гомозиготного СС генотипу гена ММП2 зустрічались в 1,36 разу частіше, а носії мінорних гомозигот ТТ – майже вдвічі рідше, ніж у контролі (p>0,05).

При аналізі розподілу носіїв генотипів ТІММП2 ми отримали статистично значущі дані. У досліджуваній групі носіїв GG варіанта було в 1,6 разу більше, ніж у контрольній групі – 82,4 і 50,0% відповідно (p<0,05). Носіїв мінорних гомозигот AA генотипу в досліджуваній групі не було виявлено, тоді як у контрольній групі частка таких носіїв становила 11,4%.

З метою вивчення можливого ризику виникнення неспроможності швів анастомозів порожнистих органів травлення за наявності асоціації вивчених упродовж дослідження генотипів ми проаналізували низку клініко-лабораторних показників (див. таблицю).

Так, у носіїв гомозиготного СС генотипу гена ММП2 з неспроможністю кишкових швів були відмічені достовірно нижчі показники загального білка, показники ГАГ сечі та вільного оксипроліну майже втричі перевищували відповідні показники у носіїв мінорного ТТ генотипу.

Аналогічні дані отримані й у носіїв GG генотипу гена ТІММП2. Крім достовірно нижчих показників білка –

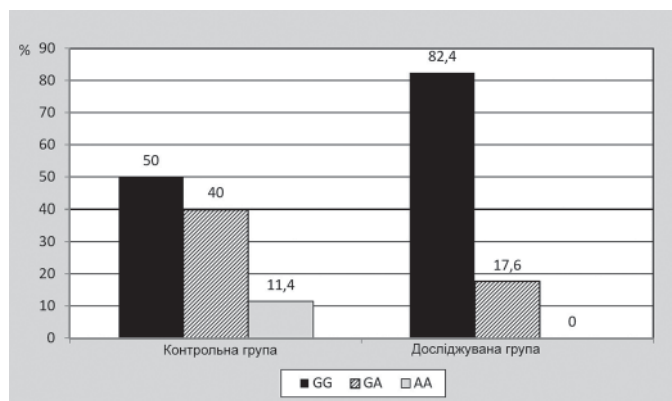


Рис. 2.
Розподіл частоти алельного поліморфізму промотору гену ТІММП2 G303→A.

Залежність деяких клініко–лабораторних показників від вивчених поліморфних генотипів у пацієнтів із неспроможністю швів анастомозів порожнистих органів травлення (n=17)

Показник	Генотипи гена ММП2			F	p
	CC (n=11)	CT (n=5)	TT (n=1)		
Загальний білок, г/л	60,12±2,74	69,44±2,20	72,50	8,193	0,04
Вільний оксипролін, мкмоль/л	145,1±8,6	62,2±5,1	48,60	4,123	0,002
ГАГ сечі, мкмоль/л	140,82±7,8	68,25±4,5	50,94	5,620	0,006
	Генотипи гена ТІММП2				
	GG (n=14)	GA (n=3)	AA		
Загальний білок, г/л	60,24±1,48	68,32±2,16	–	10,965	0,046
Вільний оксипролін, мкмоль/л	187,3±9,8	55,2±3,8*	–	5,071	0,002
ГАГ сечі, мкмоль/л	156,32±7,9**	87,45±8,5*	–	6,597	0,04
Експресія МАТ до α-ГМА	+	++	–	–	–
Експресія МАТ до колагену IV	+	++	–	–	–

Примітка. Відмінності статистично значущі: * – p<0,05; ** – p<0,01.

(60,24 ± 1,48) г/л та високих показників вільного оксипроліну – (187,3 ± 9,8) мкмоль/л, у носіїв GA генотипу аналогічний показник становив (55,2 ± 3,8) мкмоль/л (p<0,05), у них було виявлено знижену експресію МАТ до α-ГМА та колагену IV.

Обговорення

Отже, отримані дані вказують на патогенетичне значення ризикових щодо виникнення неспроможності кишкових швів алелей поліморфних генів ММП2 та ТІММП2, які, на відміну від контролю, супроводжуються гіпопротеїнемією та достовірно високими показниками біохімічних маркерів біодеградації колагену.

Знижена експресія МАТ до α-ГМА корелює з активацією фібрилогенезу, відображає наявність фенотипових міофібробластів. Фенотип міофібробластів у експресії α-ГМА та продукуванні сполучення позаклітинного матриксу регулюється β-трансформуючим фактором росту. Скоротливі властивості міофібробластів пов'язані з експресією α-ГМА та беруть участь у запаленні, загоюванні, фіброзі та канцерогенезі [11].

Усі ці фактори мають патогенетичне значення для розвитку неспроможності кишкових швів та є ознаками дисплазії сполучної тканини.

На нашу думку, досліджені показники можуть слугувати інформаційними діагностично–прогностичними критеріями розвитку неспроможності кишкових швів.

Запропонований нами спосіб прогнозування неспроможності швів порожнистих органів травлення, який включає генетичне дослідження поліморфізму генів ММП2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та ТІММП2 (G³⁰³→A), відрізняється тим, що у разі виявлення GG варіанта гена ТІММП2 (G³⁰³→A) прогнозуємо розвиток неспроможності кишкових швів, а у разі виявлення AA варіанта генотипу розвитку неспроможності кишкових швів не прогнозуємо.

Виявлені нами відмінності алельних варіантів досліджуваних генів у пацієнтів із неспроможністю швів киш-

кових анастомозів є підставою для подальшого вивчення та пошуку молекулярно–генетичних маркерів, що кодують найменш досліджену групу факторів ризику, яка включає основні ланки патогенезу неспроможності кишкових швів та інших післяопераційних ускладнень.

Висновки

1. Запропонований спосіб, який передбачає генетичне дослідження поліморфізму генів ММП2 (C⁻¹³⁰⁶→T) та ТІММП2 (G³⁰³→A), дає змогу прогнозувати ймовірність розвитку неспроможності швів анастомозів і на підставі цього в подальшому покращити вибір тактики лікування таких хворих.

2. Виявлено патогенетичне значення ризикових щодо виникнення неспроможності кишкових швів алелей поліморфних генів ММП2 та ТІММП2, які супроводжуються гіпопротеїнемією, високими показниками біохімічних маркерів біодеградації колагену та зниженою експресією МАТ до α-ГМА і колагену IV.

3. Молекулярно–генетичні дослідження є новим перспективним напрямом для напрацювання сучасних персоналізованих діагностичних критеріїв і моделей прогнозування розвитку та перебігу післяопераційних абдомінальних ускладнень, зокрема неспроможності швів анастомозів порожнистих органів травлення.

Фінансування. Зовнішні джерела фінансування і підтримки були відсутні. Гонорари або інші компенсації не виплачувалися.

Внесок авторів. Обидва автори зробили однаковий внесок у цю роботу.

Конфлікт інтересів. Автори, які взяли участь в цьому дослідженні, заявили, що у них немає конфлікту інтересів щодо цього рукопису.

Згода на публікацію. Обидва автори прочитали і схвалили остаточний варіант рукопису та дали згоду на публікацію цього рукопису.

References

1. Marjanovic G, Hopt UT. Physiology of anastomotic healing. *Chirurg*. 2011 Jan;82(1):41–7. German. doi: 10.1007/s00104-010-1898-2. PMID: 21076802.
2. Rijcken E, Sachs L, Fuchs T, Spiegel HU, Neumann PA. Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J Surg Res*. 2014 Mar;187(1):202–10. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.013. Epub 2013 Oct 12. PMID: 24290527.
3. Boyko VV, Leonov AV, Taraban IA, Lehachov VK, Leonov VV. Incapacity of intestinal anastomoses. *Kharkiv Surgical School*. 2013;(6):5–8. Ukrainian.
4. Shalkov YL. *Intestinal sutures and anastomoses in surgical practice*. Moscow: Binom; 2013. 208 p. Russian. ISBN: 978-5-9518-0539-3.
5. Pitel S, Lefèvre JH, Turet E, Chafai N, Parc Y. Redo coloanal anastomosis: a retrospective study of 66 patients. *Ann Surg*. 2012 Nov;256(5):806–10; discussion 810–1. doi: 10.1097/SLA.0b013e318272de70. PMID: 23095625.
6. de Zeeuw S, Ahmed Ali U, Donders RA, Huetting WE, Keus F, van Laarhoven CJ. Update of complications and functional outcome of the ileo-pouch anal anastomosis: overview of evidence and meta-analysis of 96 observational studies. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Jul;27(7):843–53. doi: 10.1007/s00384-011-1402-6. Epub 2012 Jan 10. Erratum in: *Int J Colorectal Dis*. 2012 Apr;27(4):553. Ali, Usama Ahmed [corrected to Ahmed Ali, Usama]. PMID: 22228116; PMCID: PMC3378834.
7. Melnyk VM, Poida OI. Surgical tactics in insufficiency of the interintestinal anastomoses sutures. *Klin Khir*. 2016 Jun;(6):8–12. Ukrainian.
8. Kosovan VM. The risk factors of the sutures insufficiency and the choice of the anastomosis formation method during reconstruction–restoration operations on the large bowel. *Klin Khir*. 2012 Dec;(12):9–12. Ukrainian. PMID: 23610811.
9. Dabbs DJ, Thompson LDR. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications, Expert Consult*. 4th Edition. Saunders; 2013. 960 p. ISBN: 978-1455744619.
10. Voitiv Y, Usenko O, Dosenko V, Dyadyk O, Dzhemiliev A. Analysis of polymorphism of matrix metalloproteinase–2 (C–1306 → T) and tissue inhibitors of metalloproteinase–2 (G303 → A) genes in patients with anastomotic leak in hollow digestive organs. *Georgian Med News*. 2020 Oct;(307):7–12. PMID: 33270569.
11. Rao K B, Malathi N, Narashiman S, Rajan ST. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2014 Apr;8(4):ZC14–7. doi: 10.7860/JCDR/2014/7820.4231. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24959509; PMCID: PMC4064839.

Надійшла 23.01.2022