

RISK FACTORS FOR NEOPLASIA IN PATIENS WITH ULCERATIVE COLITIS

Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

hel_kirjan@i.ua

Non-specific ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease with complex pathogenetic mechanisms of disease development and, with a long course of the inflammatory process, increases the risk of colon cancer. Sporadic forms of intestinal cancer more often occur due to the adenoma-carcinoma sequence when inflammation is excluded. However, changes in the functioning of matrix metalloproteinases play an essential role both in the initiation of inflammation and in the formation of neoplasias. The purpose of the work is to assess the influence of MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 on the development and course of ulcerative colitis and adenomatous polyps of the colon in patients of the Poltava region, to analyze the hereditary predisposition depending on single nucleotide polymorphisms of the TIMP-1 C536T genes (rs11551797), MMP-9 -8202A/G (rs11697325). The study included 89 patients: 53 (59.6%) with nonspecific ulcerative colitis, 36 (40.4%) with adenomatous polyps, and 49 healthy individuals. Quantitative determination of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and their TIMP-1 in blood serum was carried out by ELISA, and single-nucleotide polymorphisms of the MMP-9 A-8202G (rs11697325) and TIMP-1 C536T (rs11551797) genes were evaluated using whole DNA samples of venous blood by the PCR method. Patients with adenomatous polyps had a correlation with the G/G genotype in the SNP of the MMP-9 gene -8202A/G (rs1169732) ($\chi^2=9.82$, $p<0.007$), a significant increase in the content of MMP-1 in the blood ($p<0.05$) and the MMP-1/TIMP-1 ratio ($p<0.05$) compared to the control group. Patients with non-specific ulcerative colitis had an increase in both the quantitative content of MMP-9 ($p<0.01$)($r=0.79$), most pronounced in severe disease activity, and MMP-1 ($p<0.02$). There was also a difference in the ratio of MMP-1/TIMP-1 ($p<0.001$), and the ratio of MMP-9/TIMP-1 increased, most pronounced with high disease activity ($p<0.01$)($r=0.82$). Therefore, the detection of increased expression of MMP-1 in blood serum can be considered as one of the markers of the possible appearance of colon adenoma, and the G/G genotype of the MMP-9 gene (-8202A/G) as a predictor of the appearance of adenoma in healthy individuals and a biomarker of neoplasia in patients on ulcerative colitis. Increased expression of MMP-9 and imbalance in the ratio of MMP-9/TIMP-1 in the blood serum of patients with non-specific ulcerative colitis has a negative prognostic sign regarding the progression of the disease.

Key words: matrix metalloproteinases, adenomatous polyps, inflammation, ulcerative colitis.

Connection of the publication with planned research works.

The work is a fragment of the research "Peculiarities of the course, prognosis, and treatment of comorbid conditions in internal organs, taking into account genetic, age and gender aspects" (state registration number: 0118U004461).

Introduction.

Nonspecific ulcerative colitis (NUC), which refers to inflammatory bowel diseases, usually bothers the patient for a long time, sometimes throughout life, and is resistant to treatment. In addition, in recent years, there has been a trend of increasing morbidity and prevalence worldwide [1]. This trend is due to the complexity of pathogenetic mechanisms of disease development and the influence of multiple etiological factors [2].

Long-term non-specific inflammation of the intestinal epithelium in NVC, its recurrent nature can cause restructuring of the structure of the intestinal mucosa (SIM) [3], disrupt regenerative functions, under the influence of proliferative changes in the epithelium lead to the appearance of neoplasia, sometimes accelerating the appearance of mutagenesis [4]. The works of scientists confirm an increase in the risk of developing colon cancer (CC) with a long course of NUC, compared to healthy individuals [1, 5, 6]. CC, which is formed on the background of NUC due to dysplasia, is due to the influence of an inflammatory genetically altered mechanism [2, 7], unlike most sporadic cases of intestinal cancer, which develop due to the sequence of adenoma-carcinoma without the involvement of inflammation

[8, 9]. However, some studies confirm the similarity of the impact of genetic mutations in patients with NUC and sporadic CC using specific processes of mutation accumulation [7]. Therefore, identifying possible similar mechanisms of neoplasia in patients with NUC and adenomatous polyps of the colon (APC), which lead to CC, can help in the future with effective prevention of disease progression and appropriate correction of therapy.

Matrix metalloproteinases (MMPs) play an essential role in developing SIM inflammation, a characteristic morphological feature of NUC, and in the appearance of neoplastic changes. MMPs belong to the family of proteolytic enzymes, zinc-containing endopeptidases, which modulate immune responses and cellular homeostasis in the human body. Disturbances in the functioning of MMPs can initiate inflammation, change the signaling cascade and tissue architecture, provoke the degradation of the extracellular matrix, which is responsible for tissue remodeling, and lead to the formation of organic intestinal disease [10, 11]. Playing an essential role in many pathophysiological processes in NUC, MMPs alter SIM permeability and intestinal barrier function [12]. MMPs are also important in the progression and metastasis of CC due to their influence on the destruction of the extracellular matrix [13], which also affects the appearance of non-plastic formations in NUC. MMP-9 activity increases in tissue areas where enhanced repair and angiogenesis processes occur, such as inflammation zones, tumor tissues [14]. In NUC, the expression of MMP-9 is associated with the initiation and continuation of the inflammatory process due to

the induction of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL1- α [15]. The expression of MMP-1 is a key marker of the transition of NUC to RTC [6], as well as the chronic expression of MMP-9, according to other scientists' data [15].

Such MMPs as MMP-1,-8,-9,-10,-12,-13 are not detected in healthy SIM, and their expression affects reparative processes. Other MMP-2,-3,-7 perform protective functions, regulate cellular homeostasis, and are constantly expressed in NUC [11]. The protective role of MMP-9 on SIM in preventing the development of neoplasias has been proven. In addition, the expression of MMP-9 in SI epithelium preserves the stability of the intestinal microbiota, which is confirmed by the increased level of mRNA for 16SrRNA, and contributes to the normalization of the levels of Bacteroidetes and Firmicutes, which make up the main part of the healthy bacterial population of the intestine. Overexpression of MMP9 is also associated with a decrease in paracellular permeability [6].

In physiological conditions, the activity of MMP is regulated by tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP), and the ratio of MMP to TIMP is 1:1 [14, 16]. In the progression of NUC, the imbalance between MMPs and their inhibitors is important. Under the influence of genetic polymorphism, immune imbalance, and the external environment, it changes tissue recovery and determines the degree of protein degradation, disrupting the protective functions of SIM [11]. In the development of APC, MMPs also play an essential role due to their influence on tissue remodeling [17]. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of genes responsible for the functioning of MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-16 have predictive value as factors of CC development [16, 18], which is essential for timely detection of neoplasia. Other authors also confirmed the significance of SNPs of the MMP1-1607 ins/del G and MMP-3-1612 ins/delAe genes in the development of APC [19].

Thus, MMP, TIMP, and the genes responsible for their functioning play an essential role in the development of inflammation and cellular stability and significantly impact the appearance and progression of NUC and neoplastic processes in the intestine. Therefore, determining the role of MMP in the course of these diseases, identifying their relationship with genetic polymorphisms of MMP is an urgent task, the solution of which will help in identifying new links in the formation of dysplastic changes and in the further search for ways to prevent the progression of diseases.

The aim of the study.

To evaluate the activity, features of the influence of MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 on the development and course of NUC and APC, to analyze the frequency and hereditary predisposition depending on the single-nucleotide polymorphisms of the TIMP-1 C536T (rs11551797), MMP-9 genes -8202A/G (rs11697325) in patients from the Poltava region.

Object and research methods.

The study included 89 patients who were treated from January 2018 to May 2021 at the Municipal Enterprise "Poltava Regional Clinical Hospital, named after M.V.Sklifosovskyy of Poltava regional Council". The study was conducted by the principles of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association, "Ethical Principles of Medical Research Involving Human Subjects"

(amended in October 2013). Written informed consent was obtained from all patients participating in the study. To achieve the goal, the patients were divided into 2 groups. The first group consisted of 53 (59.6%) patients with NUC, in whom intestinal cancer can potentially develop during the long course of the disease under the influence of multiple risk factors, including hereditary factors, due to the inflammatory nature of mutagenesis [1, 5]. The second group is 36 (40.4%) patients with APC, which can also transform into colorectal cancer, but according to Aceto G.M. et al. [9], inflammation does not participate in non-plastic changes of adenoma.

The average age of the patients was 46.9 \pm 8.4 years, the ratio of men to women was 1:1.8, the differences between the groups were unreliable ($p>0.05$). To compare the obtained data, the control group was examined – 49 healthy people (average age 33.4 \pm 6.1 years), the ratio of men and women – 1:1.6. The diagnosis of NUC was established according to the Montreal classification, which was adapted by Silverberg M.S. and Satsangi J. et al., 2005 [20]. To verify the diagnosis of APC, the recommendations of the endoscopic Paris classification of 2002 were used [21].

Among the examined patients with NUC, patients with left-sided colon lesions (E2 according to the Montreal classification) prevailed – 26 (49.1%) people, patients with a total and subtotal process (E3) – 17 (32.1%) patients were less common and isolated lesions of the rectum (E1) – 10 (18.8%) patients. The majority of patients with NUC had a low activity of the process – 28 (52.8%) (S1 according to the Montreal classification), and medium activity (S2) was found in 19 (35.9%) patients. High activity of NUC (S3) was most rarely determined – 6 (11.3%) persons, in whom endoscopic examination revealed total intestinal damage with manifestations of pseudopolyposis, which confirmed a more pronounced inflammatory process. The examined patients in the study did not receive biological therapy, which can suppress TNF- α , affecting the content of MMP in blood serum.

APC, like intestinal lesions in NUC, were more often localized in the rectum and sigmoid colon – 32 (88.9%) patients, polyps in the ascending and descending part were found in 4 (11.1%) patients. Patients with single polyps prevailed – 30 (83.3%) patients, 2-4 polyps were identified in 6 (16.7%) patients. In terms of size, the absolute majority was up to 1 cm – 34 (94.4%) patients, 2 (5.6%) patients had polyps larger than 1 cm. All patients underwent an endoscopic examination, followed by a study of morphological changes and confirmation of the diagnosis histologically after polyp removal.

In 55 patients with intestinal lesions and 23 healthy volunteers who made up the control group, quantitative determination of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and their TIMP-1 blood serum was carried out by enzyme immunoassay using Human TIMP-1 test systems Platinum ELISA (Austria), Human MMP-1 ELISA kit (Korea), Human MMP-3 ELISA kit (USA), Human MMP-9 Quantikine ELISA (USA&Canada). The study was conducted in the laboratory of the Ukrainian-German Gastroenterology Center "BYK-KYIV", Kyiv.

Genetic changes that could potentially contribute to the development of APC and NUC and determined the possible influence of MMP were evaluated by analyzing the single nucleotide polymorphisms (SNP) of the

genes MMP-9 A-8202G (rs11697325) and TIMP-1 C536T (rs11551797) in 89 patients of groups 1 and 2 and in 49 healthy individuals. DNA samples extracted from whole venous blood and total DNA were used in the study for genotyping individuals. The samples were frozen, then stored at a temperature of -20°C until the study was conducted. The polymerase chain reaction method was used to isolate the necessary polymorphisms. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction, with subsequent washing of the samples in a 70% solution of ethyl alcohol. The sequences were amplified on a Rearch PCR Thermal Cycler (Corbett, Australia). Kits for genotyping were used according to the instructions. Genotyping was performed in the State Institution "Institute of Gerontology epigenetic laboratory named after D.F. Chebotaryov" National Academy of Sciences of Ukraine.

In mathematical processing, to determine the reliability of the difference in the detected results, statistical analysis was carried out using standard analytical programs Microsoft EXCEL (2010), Student's t-test, using Student's tables (differences were considered statistically significant at the probability value ($p < 0.05$)) on a personal computer. The distribution of genotypes based on the study of polymorphic loci was checked for Hardy-Weinberg (X-B) equilibrium using Fisher's exact test. The expected heterozygosity of gene polymorphisms was calculated according to published methods. The relative deviation of the expected heterozygosity from the observed (D) was calculated according to the formula: $D = (h_{obs} - h_{exp}) / h_{exp}$, where h_{obs} is expected, h_{exp} is observed. To analyze the association of the markers of the studied genes, the frequency of alleles and genotypes in groups of patients and healthy individuals were compared using the χ^2 test with Yates's correction for continuity and using the two-sided Fisher's exact test.

Results of the research.

According to the results of our study, deviations in the MMP content of blood serum were detected in patients of both the first and second groups (fig. 1). Indicators of the quantitative content of MMP-1 increased both in patients with APC (n=28) – 74.31±5.28 ng/ml ($p < 0.05$) and in patients with NUC (n=27) – 85.16± 3.6 ng/ml ($p < 0.02$), compared with healthy volunteers (n=23) – 7.52±5.06 ng/ml.

The difference in the amount of MMP-1 between the examined groups of patients is not significant ($p > 0.05$). In addition, an increase in MMP-9 indicators was determined in both groups compared to the control group. In the first group, MMP-9 amounted to 944.62±119.24 ng/ml ($p < 0.01$) and correlated with NVC ($r = 0.79$), in the second group, the increase was not reliable – 571.21±175.76 ng/ml ($p > 0.05$), comparing with

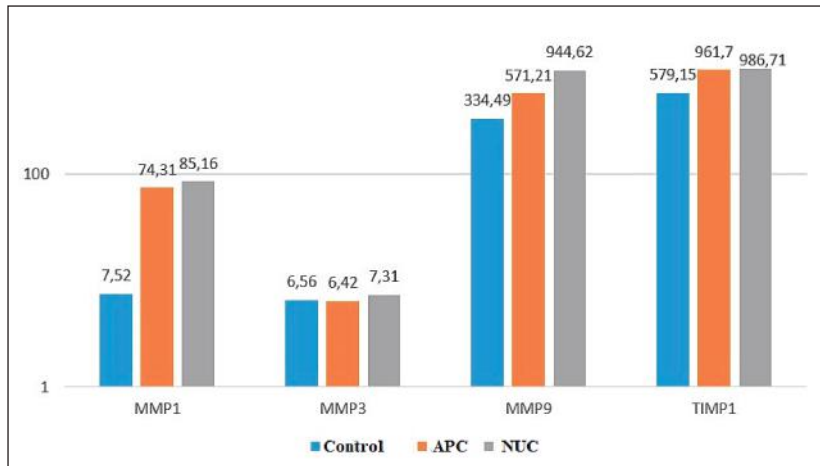


Figure 1 – Features of the quantitative content of MMP-1,-3,-9 and TIMP-1 in the blood serum of patients with NUC and APC in comparison with the control group (ng/ml).

healthy people – 334.49±113.38 ng/ml and between two groups. Indicators of the quantitative content of blood serum TIMP-1 also increased: in APC – 961.70±329.72 ng/ml, NUC – 986.71±358.63 ng/ml, without a significant difference, comparing between themselves and the control group. MMP-3 indicators did not differ in both groups: group 1 -7.31±1.57 ng/ml, group 2 – 6.42±1.97 ng/ml, and did not differ significantly from healthy volunteers. Differences in the quantitative content of MMP and TIMP in different age categories of patients and by gender were not detected.

Taking into account the detected changes in the growth of MMP-9 in the group of patients with NUC, to identify the connection with the progression of the disease, the content of MMP-9 was analyzed separately in 6 patients with NUC who had activity level SIII according to the Montreal classification, total intestinal damage with manifestations of pseudopolyposis, as manifestations of high disease activity and had a negative prognosis regarding the further course of the disease. In the data of patients, the content of MMP-9 had a significant increase – 1431.15±78.67 ng/ml, in comparison with other patients of the NUC group ($p < 0.02$) and patients with APC and healthy individuals ($p < 0.005$) ($r = 0.87$). The content of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 did not have a significant difference with the main group of NUC patients and the corresponding difference was maintained, compared to APC and the control group.

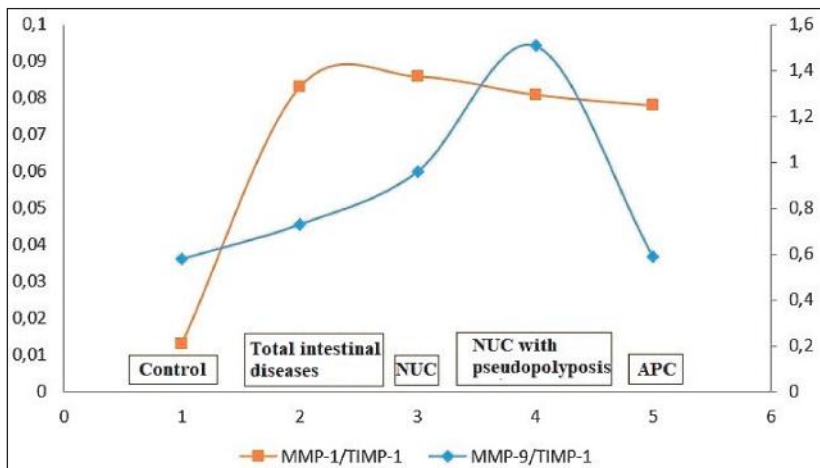


Figure 2 – MMP-9/TIMP-1 and MMP-1/TIMP-1 ratios in the serum of patients with NUC and APC compared to the control group (ng/ml).

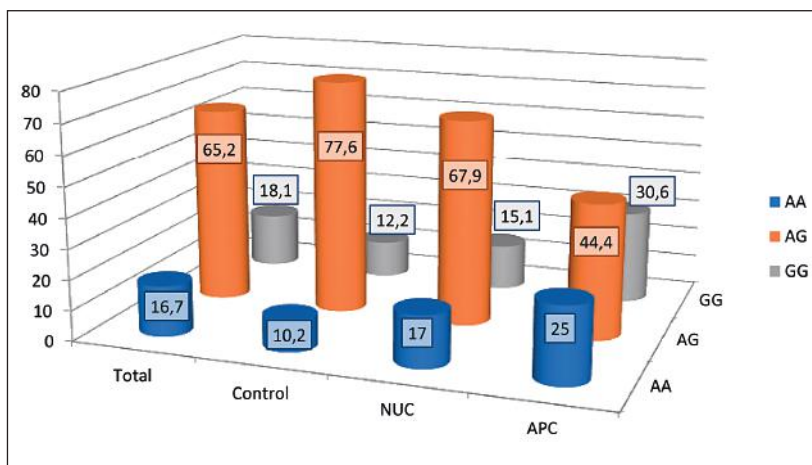


Figure 3 – Frequency of SNP detection of the MMP-9 gene -8202A/G (rs11697325) in patients with NUC and APC.

When analyzing the ratio of MMP-1, MMP-9 to TIMP-1, deviations in the content of indicators were determined in both examined groups (fig. 2).

In patients of all examined groups, an increase in the MMP-1/TIMP-1 ratio was determined in comparison with the control group, reliably in patients with NUC – 0.086±0.009 ng/ml (p<0.001) and APC – 0.078±0.014 ng/ml (p< 0.05). The MMP-9/TIMP-1 ratio significantly increased in patients of group 1 – 0.96±0.18 ng/ml (p<0.05), the most intensive correlation was determined in patients who had total intestinal damage with pseudopolyposis with NUC – 1.51±0.37 ng/ml (p<0.01), (r=0.82).

To identify the possible influence of genetic polymorphism on the change in the functioning of MMPs, their induction of neoplasia formation, the frequency and distribution of SNPs of the MMP-9 A-8202G (rs11697325) and TIMP-1 C536T (rs11551797) genes in the examined patients were analyzed. The T allele of the C536T polymorphic locus of the TIMP-1 gene (rs11551797) was not detected in all studied groups of patients from the Poltava region and healthy volunteers this polymorphism was not analyzed further. When analyzing the frequency of SNP detection of the MMP-9 gene A-8202G (rs11697325), which is responsible for inflammatory and reparative processes in the intestine, homozygous wild A/A genotype of the polymorphism, heterozygous A/G genotype and homozygous mutant G/G genotype of the polymorphism were detected in in all examined groups (fig. 3).

Table 2 – General pattern of inheritance in patients with APC and NUC

Gene SNP: MMP-9 -8202A/G rs1169732	Genotype	Frequency of genotypes		χ ²	p	OR	
		Patients (n=36)	Control			Value	95% CI
The control group – healthy (n=49)							
APC	A/A	0.250	0.102	9.82	0.007	2.93	0.89 – 9.68
	A/G	0.444	0.776			0.23	0.09 – 0.59
	G/G	0.306	0.122			3.15	1.04 – 9.57
NUC	A/A	0.170	0.102	1.33	0.51	1.80	0.56 – 5.80
	A/G	0.679	0.776			0.61	0.25 – 1.49
	G/G	0.151	0.122			1.27	0.41 – 3.98

According to the obtained data, in the group of patients with APC, there was a significant difference in the detection frequency of both heterozygous and homozygous mutant type of the MMP-9 gene (-8202A/G) was found in comparison with both the group of patients with NUC and the control group. SNP polymorphism of one allele A/G was detected less often – 16 (44.4%) patients (p<0.05), mutant polymorphism G/G was detected significantly more often – 11 (30.6%) patients (p<0.02), which possibly determines the more pronounced influence of this polymorphism on the development of polyps due to changes in the regulation of inflammatory and proliferative processes.

Table 1 – Non-observance of Hardy-Weinberg equilibrium in the control group of healthy individuals and patients with NUC

No	Gene	Genotype	Control	HWE	χ ²	p
Control	MMP-9 -8202A/G	Genotype A/A	0.102	0.240	14.91	0.0001
		Genotype A/G	0.776	0.500		
		Genotype G/G	0.122	0.260		
NUC	MMP-9 -8202A/G	Genotype A/A	0.170	0.260	6.83	0.009
		Genotype A/G	0.679	0.500		
		Genotype G/G	0.151	0.241		

Also, in patients with NUC who had high disease activity (SIII), the homozygous wild A/A genotype was not determined. The heterozygous A/G genotype was more often detected in 5 (83.3%) patients (p>0.05), and in 1 (16.7%) patient, the homozygous mutant G/G genotype of the MMP-9 gene (-8202A/G) was detected.

To evaluate the detected violations in the SNP of the MMP-9 gene (-8202A/G) and determine the association of the frequency of genotypes with diseases, their distribution was analyzed according to the Hardy-Weinberg equilibrium. Among the examined patients, Hardy-Weinberg conditions (χ² test at the level of significance df=1) were performed for cases and both groups, except replacement (p<0.05). The result is presented in table 1.

According to the data in table 1, a deviation was found in relation to Hardy-Weinberg equilibrium in the frequency of SNP genotypes of the MMP-9 gene -8202A/G: in the control group of healthy volunteers (χ²=14.91, p<0.0001) and in the group of patients with NUC (χ²=6.83, p<0.009). In this regard, the possibility of association of this polymorphism with APC and NUC was evaluated using the general model of inheritance, which does not depend on this equilibrium (table 2).

Analyzing the frequency of genotypes in patients of groups 1 and 2 revealed many features. In patients with APC, the association of the disease with the frequency of the homozygous mutant genotype G/G in the SNP of the MMP-9 gene -8202A/G (rs1169732) was determined (χ²=9.82, p<0.007, OR=2.93, 95%

CI: 1.04 – 9.57), which confirms the influence of this genotype on the development of the disease. Correlations with the SNP of the MMP-9 gene -8202A/G were not detected in patients with NUC. It is possible that the appearance of this homozygous polymorphism of the G/G genotype in the MMP-9 -8202A/G gene is one of the leading regulatory mechanisms of the appearance of APC, the timely detection of which will help correct treatment and prevent the appearance of neoplasia in such patients.

Discussion of research results.

The expression of MMPs and their genetic polymorphisms play an essential role in the development of intestinal pathology. According to our data, the homozygous mutant genotype G/G in the SNP of the MMP-9 gene -8202A/G (rs1169732) had the highest correlation with the development of APCs, which are related to precancerous bowel diseases ($\chi^2=9.82$, $p<0.007$, $OR=2.93$, 95% CI: 1.04 – 9.57). In addition, our study revealed an increase in the quantitative content of MMP-1 in the blood of patients with APC – 74.31 ± 5.28 ng/ml ($p<0.05$) and the ratio of MMP-1/TIMP-1 – 0.078 ± 0.014 ng/ml ($p<0.05$) in comparison with the control group. However, the quantitative content of MMP-3 and MMP-9 in blood serum had no significant difference with patients of group 1 and healthy volunteers. The obtained data confirm the work of scientists who associate MMP mainly with tissue remodeling and extracellular matrix degradation and determine their leading role in the development of neoplasia, including intestinal cancer [22]. In addition, increased expression and activity of MMPs were described in CC patients, where MMP levels correlated with tumor progression and had a negative prognosis [16]. Other authors suggested using MMP as a potentially prognostic risk factor for the malignant transformation of polyps [23].

Unlike patients with APC, patients with NUC had an increase in blood serum as a quantitative content of MMP-9 – 944.62 ± 119.24 ng/ml ($p<0.01$), which correlated with NUC ($r=0.79$), and MMP-1 – 85.16 ± 3.6 ng/ml ($p<0.02$). There was also a difference in the ratio of MMP-1/TIMP-1 ($p<0.001$) compared to healthy subjects. In patients with NUC and total intestinal damage and pseudopolypsis (level of activity SIII according to the Montreal classification), the most significant increase in serum MMP-9 indicators was determined – 1431.15 ± 78.67 ng/ml, compared with other patients of the NUC group ($p<0.02$) and examined groups ($p<0.005$) ($r=0.87$), which indicates the importance of the influence of MMP-9 in the progression of the disease and the development of an active, long-term inflammatory process. In addition, the imbalance in the content of MMP and TIMP-1 in NUC increased. The ratio of MMP-9/TIMP-1 in blood serum significantly increased in patients of group 1 – 0.96 ± 0.18 ng/ml, most pronounced in patients with high disease activity – 1.51 ± 0.37 ng/ml ($p<0.01$), ($r=0.82$), which confirms the importance of MMP-9 expression and their imbalance to TIMP-1 in the progression of NUC, a possible change in the protective functions of SIM [11], and the deepening of inflammatory processes that could lead to stimulation of the formation of neoplasias.

According to Pujada A. et al., 2016p., MMP is one of the biomarkers of NUC activity that can affect all stages of inflammation. MMPs uniquely modulate the

biological activity of cytokines, chemokines, and proteases, which are released with the onset of inflammation, which leads to the initiation of the inflammatory process, including in NUC [24]. Secretion of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12 and MMP-14 by macrophages and fibroblasts and their regulation is also essential for the repair of damaged tissues and timely wound healing in inflammatory bowel diseases [25]. MMP-9 has the greatest differences in the criteria of content in the tissues and blood of the human body, which is associated with their participation in various signaling pathways, including the effect on NF κ B, activation of IL-1 and TGF- β , and the possibility of influence on TNF α , modifying inflammation [24].

The revealed imbalance in the quantitative content of MMP-1, MMP-9, and TIMP-1 in blood serum in our patients with NUC may indicate a significant role of MMP in the inflammatory process, and with a long course of possible participation in the neoplastic transformation of the intestinal epithelium. Although in patients with NUC, we did not find a correlation with polymorphisms of the MMP-9 gene -8202A/G (rs1169732) genotypes, in patients with pronounced disease activity, an increase in the frequency of the G allele and the absence of the A/A genotype of the MMP gene were found -9 (-8202A/G). The determination of the G allele of the MMP-9 gene (-8202A/G) in patients with CKD can be considered a factor for worsening the prognosis of the course of the disease, and the A/A genotype is a protective factor in such patients. In addition, the mutant G/G genotype of the MMP-9 gene (-8202A/G) can be a negative prognostic marker for the appearance of mutagenic changes in patients with NUC, taking into account the revealed correlations of this polymorphism with the development of APC and the biomarker of the appearance of adenomas in healthy individuals.

Conclusions.

Therefore, MMPs play an essential role in inflammatory processes and non-plastic changes. Detection of increased expression of MMP-1 in the patient's blood serum can be considered as one of the markers of colon adenoma. The G/G genotype of the MMP-9 gene (-8202A/G) can be a predictor of the appearance of APC in healthy individuals and a biomarker of neoplastic changes in patients with NUC. The increased expression of MMP-9 and the growth of imbalance in the ratio of MMP-9/TIMP-1 in the blood serum of patients with NUC has a negative prognostic sign regarding the progression of the disease and the degree of inflammation activity in such patients.

Prospects for further research.

Further research should be directed to develop possible ways to correct the detected changes in MMP content and MMP genetic polymorphism in patients with NUC and APC and preventive measures to prevent disease progression and improve the prognosis, respectively, of possible neoplastic transformation of the intestinal epithelium.

ФАКТОРИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ НЕОПЛАЗІЇ У ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ

Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

hel_kirjan@i.ua

Неспецифічний виразковий коліт - запальне захворювання кишечника, яке має складні патогенетичні механізми розвитку хвороби та при тривалому перебігу запального процесу, підвищення виникнення ризику раку товстої кишки. Спорадичні форми раку кишечника, більш часто виникають через послідовність аденома-карцинома, при виключенні запалення. Однак як в ініціації запалення так і у формуванні неоплазій важливу роль відіграють зміни функціонування матриксних металопротеїназ. Мета роботи - оцінити у пацієнтів Полтавського регіону особливості впливу MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 на розвиток та перебіг виразкового коліту та аденоматозних поліпів товстої кишки, проаналізувати спадкову схильність в залежності від однонуклеотидних поліморфізмів генів TIMP-1 C536T (rs11551797), MMP-9 -8202A/G (rs11697325). У дослідження було включено 89 хворих: 53 (59,6%) із неспецифічним виразковим колітом, 36 (40,4%) із аденоматозними поліпами та 49 здорових осіб. Проведено кількісне визначення MMP-1, MMP-3, MMP-9 та їх TIMP-1 сироватки крові методом ІФА та оцінено однонуклеотидні поліморфізми генів MMP-9 A-8202G (rs11697325) та TIMP-1 C536T (rs11551797) із використанням зразків ДНК цільної венозної крові методом ПЦР. Хворі на аденоматозні поліпи мали кореляційний зв'язок із генотипом G/G в SNP гену MMP-9 -8202A/G (rs1169732) ($\chi^2=9,82$, $p<0,007$), достовірне зростання вмісту MMP-1 в крові ($p<0,05$) та співвідношення MMP-1/TIMP-1 ($p<0,05$) в порівнянні з групою контролю. Пацієнти із неспецифічним виразковим колітом мали зростання як кількісного вмісту MMP-9 ($p<0,01$) ($r=0,79$), найбільш виражено при вираженій активності хвороби, так і MMP-1 ($p<0,02$). Також зберігалась відмінність у різниці співвідношення MMP-1/TIMP-1 ($p<0,001$), та зросло співвідношення MMP-9/TIMP-1, найбільш виражено при високій активності захворювання ($p<0,01$) ($r=0,82$). Отже, виявлення підвищеної експресії MMP-1 сироватки крові, можливо розглядати як один із маркерів можливої появи аденоми товстої кишки, а G/G генотип гену MMP-9 (-8202A/G) як предиктор появи аденоми у здорових осіб та біомаркер неоплазії у хворих на виразковий коліт. Підвищена експресія MMP-9 та дисбаланс в співвідношенні MMP-9/TIMP-1 у сироватці крові хворих на неспецифічний виразковий коліт має негативну прогностичну ознаку, щодо прогресування хвороби.

Ключові слова: матриксні металопротеїнази, аденоматозні поліпи, запалення, неспецифічний виразковий коліт.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Особливості перебігу, прогнозу та лікування коморбідних станів при захворюваннях внутрішніх органів з урахуванням генетичних, вікових і гендерних аспектів» (№ державної реєстрації: 0118U004461).

Вступ.

Неспецифічний виразковий коліт (НВК), який відноситься до запальних захворювань кишечника, зазвичай тривало турбує пацієнта, іноді на протязі всього життя та має стійкість до лікування. Крім того, останні роки спостерігається тенденція до зростання захворюваності та поширеності у всьому світі [1]. Дана тенденція обумовлена складністю патогенетичних механізмів розвитку хвороби та впливом множинних етіологічних чинників [2].

Тривале неспецифічне запалення епітелію кишечника при НВК, його рецидивуючий характер може викликати перебудову структури слизової оболонки кишечника (СОТК) [3], порушувати регенеративні функції, під впливом проліферативних змін епітелію приводити до появи неоплазії, іноді прискорюючи появу мутагенезу [4]. Роботи науковців підтверджують підвищення ризику розвитку раку товстої кишки (РТК) при тривалому перебігу НВК, в порівнянні зі здоровими особами [1, 5, 6]. РТК, який формується

на фоні НВК через дисплазію, обумовлений впливом запального генетично зміненого механізму [2, 7], на відміну від більшості спорадичних випадків раку кишечника, які розвиваються через послідовність аденоми-карциноми без участі запалення [8, 9]. Однак, є дослідження, які підтверджують подібність впливу генетичних мутацій у пацієнтів із НВК та спорадичним РТК із використанням певних процесів накопичення мутацій [7]. Тому виявлення можливих схожих механізмів появи неоплазій у пацієнтів із НВК та аденоматозними поліпами товстої кишки (АПТК), які приводять до РТК, може допомогти в подальшому з ефективною профілактикою прогресування захворювань та відповідною корекцією терапії.

В розвитку запалення СОТК, що є характерною морфологічною особливістю при НВК і в появі неопластичних змін, важливу роль відіграють матриксні металопротеїнази (ММР). ММР відносяться до сімейства протеолітичних ферментів цинк-вмісних ендопептидаз, які модулюють імунні відповіді та клітинний гомеостаз в організмі людини. Порушення у функціонуванні ММР, можуть ініціювати запалення, змінити сигнальний каскад і тканинну архітектоніку, спровокувати деградацію позаклітинного матриксу, який відповідає за ремоделювання тканин та привести до формування органічного захворювання кишечника [10, 11]. Відіграючи важливу роль у багатьох патофізіологічних процесах при НВК, ММР змінюють

проникність СОТК та бар'єрну функцію кишечника [12]. Також MMP мають вагу в прогресуванні та метастазуванні РТК за рахунок впливу на руйнування позаклітинного матриксу [13], що впливає на появу непласичних утворень і при НВК. У ділянках тканин, де відбуваються підсилені процеси репарації та ангіогенезу, таких як зони запалення, тканинах пухлини, збільшується активність MMP-9 [14]. При НВК експресія MMP-9 пов'язана як з ініціацією, так і з продовженням запального процесу за рахунок індукції прозапальних цитокінів, таких як TNF- α та IL1- α [15]. Експресія MMP-1 являється ключовим маркером переходу НВК в РТК [6], також як і хронічна експресія MMP-9, відповідно даних інших науковців [15].

Такі MMP, як MMP-1,-8,-9,-10,-12,-13 не визначаються в здоровій СОТК, а їх експресія впливає на репаративні процеси. Інші MMP-2,-3,-7 виконують захисні функції, регулюють клітинний гомеостаз та експресуються постійно при НВК [11]. Доведена захисна роль MMP-9 на СОТК у попередженні розвитку неоплазій. Крім того, експресія MMP-9 в епітелії ТК зберігає стабільність мікробіоти кишечника, що підтверджується підвищеним рівнем мРНК для *16S rRNA*, та сприяє нормалізації рівнів *Bacteroidetes* та *Firmicutes*, які складають основну частину здорової бактеріальної популяції кишечника. Надмірна експресія MMP9 пов'язана також зі зниженням парацелюлярної проникності [6].

В фізіологічних умовах активність MMP регулюється тканинними інгібіторами матриксних металопротеїназ (ТІМП), а співвідношення MMP до ТІМП становить 1:1 [14, 16]. При прогресуванні НВК має значення дисбаланс між MMP та їх інгібіторами, які під впливом генетичного поліморфізму, імунного дисбалансу, зовнішнього середовища змінюють відновлення тканин та визначають ступінь деградації білка, порушуючи захисні функції СОТК [11]. У розвитку АПТК, MMP також відіграють важливу роль за рахунок впливу на ремоделювання тканин [17]. Однонуклеотидні поліморфізми генів (SNP), які відповідають за функціонування MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-16 мають прогностичне значення як фактори розвитку РТК [16, 18], що важливо для своєчасного виявлення неоплазії. Інші автори також підтвердили значення SNP гену MMP1-1607 ins/del G та MMP-3 -1612 ins/delAe у розвитку АПТК [19].

Таким чином, MMP, ТІМП та гени, які відповідають за їх функціонування, відіграють важливу роль у розвитку запалення та клітинній стабільності, мають вагомий вплив на появу і прогресування НВК та неопластичні процеси в кишечнику. Тому визначення ролі MMP у перебігу даних захворювань, виявлення їх взаємозв'язку із генетичними поліморфізмами MMP є надважливою задачею, вирішення якої допоможе у виявленні нових ланок формування диспластичних змін та в подальшому пошуку шляхів попередження прогресування хвороб.

Мета дослідження.

Оцінити активність, особливості впливу MMP-1, MMP-3, MMP-9, ТІМП-1 на розвиток та перебіг НВК та АПТК, проаналізувати частоту і спадкову схильність в залежності від однонуклеотидних поліморфізмів генів ТІМП-1 C536T (rs11551797), MMP-9 -8202A/G (rs11697325) у пацієнтів Полтавського регіону.

Об'єкт і методи дослідження.

У дослідження було включено 89 хворих, які проходили лікування із січня 2018 по травень 2021 року в Полтавській обласній клінічній лікарні ім. М.В.Скляфосовського. Дослідження проводилося згідно з принципами Гельсінської декларації Світової медичної асоціації «Етичні засади медичних досліджень, що стосуються людських суб'єктів» (змінена в жовтні 2013 року). Письмова інформована згода була отримана від усіх хворих, які брали участь у дослідженні. Для досягнення поставленої мети, пацієнти були поділені на 2 групи. Першу групу склали 53 (59,6%) хворих із НВК, у яких потенційно може виникнути рак кишечника при тривалому перебігу хвороби під впливом множинних факторів ризику, в тому числі і спадкових факторів, за рахунок запального характеру мутагенезу [1, 5]. Друга група – 36 (40,4%) пацієнтів із АПТК, які можуть також трансформуватися у колоректальний рак, але за даними Aceto G.M. et al. [9], запалення не приймає участь у непласичних змінах аденом.

Середній вік пацієнтів складав $46,9 \pm 8,4$ років, співвідношення чоловіків та жінок – 1:1,8, відмінності між групами були недостовірні ($p > 0,05$). Для порівняння отриманих даних, обстежена контрольна група – 49 здорових осіб (середній вік $33,4 \pm 6,1$ років), співвідношення чоловіків та жінок – 1:1,6. Діагноз НВК встановлювали відповідно Монреальської класифікації, яка була адаптована Silverberg M.S. та Satsangi J. et al., 2005 р. [20]. Для верифікації діагнозу АПТК, використовували рекомендації ендоскопічної Паризької класифікації 2002 року [21].

Серед обстежених пацієнтів із НВК, переважали хворі з лівобічним ураженням товстої кишки (E2 за Монреальською класифікацією) – 26 (49,1%) осіб, рідше виявлялися хворі з тотальним та субтотальним процесом (E3) – 17 (32,1%) пацієнтів та ізольованим ураженням прямої кишки (E1) – 10 (18,8%) хворих. Більшість хворих на НВК мали низьку активність процесу – 28 (52,8%) (S1 за Монреальською класифікацією), середню активність (S2) виявили у 19 (35,9%) хворих. Найбільш рідко визначали високу активність НВК (S3) – 6 (11,3%) осіб, у яких при ендоскопічному обстеженні виявляли тотальне ураження кишечника з проявами псевдополіпозу, що підтверджувало більш виражений запальний процес. Обстежені пацієнти у дослідженні не отримували біологічну терапію, яка може пригнічувати TNF- α , впливаючи на вміст MMP у сироватці крові.

АПТК також, як і ураження кишечника при НВК, частіше локалізувались у прямій та сигмовидній кишці – 32 (88,9%) хворих, поліпи у висхідному та низхідному відділі виявили у 4 (11,1%) хворих. Переважали пацієнти з поодинокими поліпами – 30 (83,3%) хворих, 2-4 поліпи визначили у 6 (16,7%) пацієнтів. За розмірами, абсолютна більшість мала до 1 см – 34 (94,4%) пацієнтів, у 2 (5,6%) хворих поліпи були більше 1 см. Всім пацієнтам проводилось ендоскопічне дослідження, з послідовним вивченням морфологічних змін та підтвердженням діагнозу гістологічно після видалення поліпу.

У 55 пацієнтах з ураженнями кишечника та 23 здоровим добровольцям, які склали контрольну групу склали, проведено кількісне визначення MMP-1, MMP-3, MMP-9 та їх ТІМП-1 сироватки крові ме-

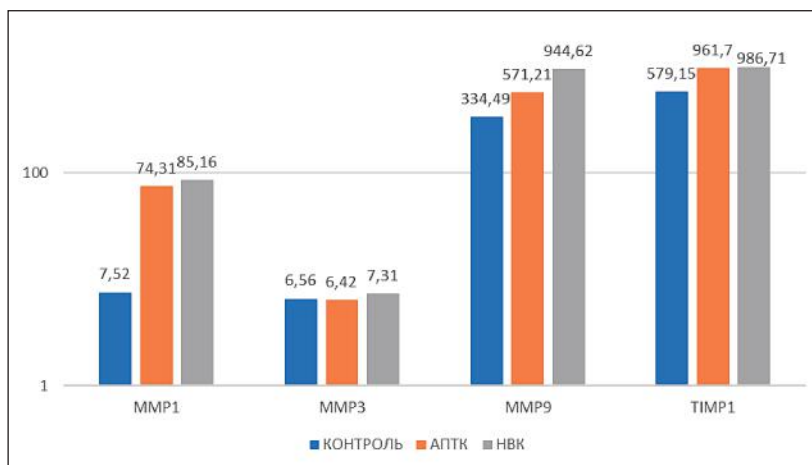


Рисунок 1 – Особливості кількісного вмісту MMP-1,-3,-9 та TIMP-1 у сироватці крові пацієнтів із НБК та АПТК в порівнянні з контрольною групою (ng/ml).

тодом імуноферментного аналізу з використанням тест-систем Human TIMP-1 Platinum ELISA (Австрія), Human MMP-1 ELISA kit (Корея), Human MMP-3 ELISA kit (USA), Human MMP-9 Quantikine ELISA (USA&Canada). Дослідження проводилось в лабораторії Українсько-німецького гастроентерологічного центру «ВУК-КІІВ», м. Київ.

Генетичні зміни, які потенційно могли сприяти розвитку АПТК та НБК та визначали можливий вплив MMP, оцінювали аналізуючи одонуклеотидні поліморфізми генів (SNP) MMP-9 A-8202G (rs11697325) та TIMP-1 C536T (rs11551797) у 89 пацієнтів 1 та 2 групи і у 49 здорових осіб. В дослідженні використовували зразки ДНК, що була виділена з цільної венозної крові та тотальної ДНК для генотипування індивідів. Зразки спочатку заморожували, в подальшому зберігали при температурі -20°C до проведення дослідження. Для виділення необхідних поліморфізмів використовувався метод полімеразної ланцюгової реакції. ДНК виділяли методом фенольно – хлороформної екстракції, з подальшим промиванням зразків у 70% розчині етилового спирту. Ампліфікацію послідовностей проводили на термоциклері Research PCR Thermal Cycler (Corbett, Австралія). Набори для генотипування використовували відповідно до інструкцій. Генотипування виконувалося у епігенетичній лабораторії Державної установи «Інституту геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова» НАМН України.

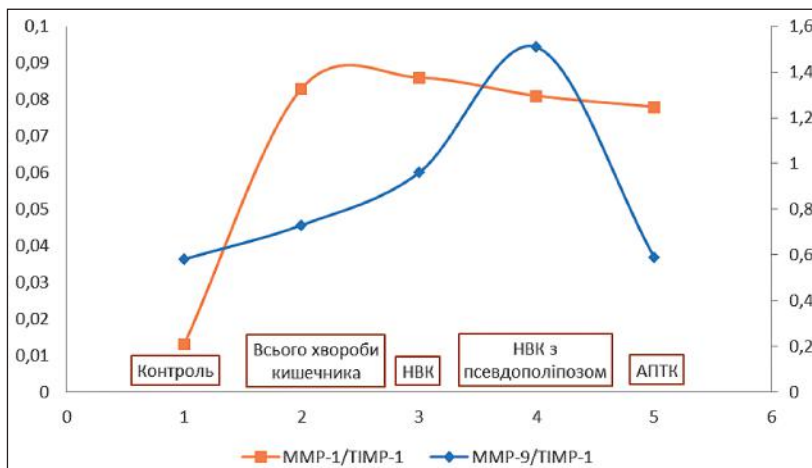


Рисунок 2 – Показники співвідношення MMP-9/TIMP-1 та MMP-1/TIMP-1 у сироватці крові пацієнтів із НБК та АПТК порівнюючи з контрольною групою (ng/ml).

Математичну обробку, для визначення достовірності в різниці виявлених результатів, статистичний аналіз проводили із використанням стандартних аналітичних програм Microsoft EXCEL (2010 р.), критеріїв t – Стьюдента, із застосуванням таблиць Стьюдента (відмінності вважалися статистично достовірними при значенні ймовірності ($p < 0,05$)) на персональному комп'ютері. Розподіл генотипів по дослідженню поліморфних локусів перевіряли на відповідність рівновазі Харді – Вайнберга (X-B) за допомогою точного критерію Фішера. Очікувану гетерозиготність поліморфізмів генів розраховували по опублікованим методикам. Відносно відхилення очікуваної гетерозиготності від спостережуваної (D) розраховували відповідно формулі: $D = (h_{obs} - h_{exp}) / h_{exp}$, де h_{obs} – очікувана, h_{exp} – спостережувана. Для аналізу асоціації маркерів досліджених генів порівнювали частоту алелей та генотипів в групах хворих та здорових осіб, використовуючи критерій χ^2 з поправкою Йетса на безперервність та застосуванням двобічного точного критерію Фішера.

Результати дослідження.

За результатами нашого дослідження, у пацієнтів як першої так і другої групи виявлено відхилення у вмісті MMP сироватки крові (рис. 1). Показники кількісного вмісту MMP-1 зростали як у хворих на АПТК (n=28) – 74,31±5,28 ng/ml ($p < 0,05$), так і при НБК (n=27) – 85,16±3,6 ng/ml ($p < 0,02$), порівнюючи зі здоровими добровольцями (n=23) – 7,52±5,06 ng/ml.

Відмінність у кількості MMP-1 між обстеженими групами пацієнтів не достовірна ($p > 0,05$). Крім того, визначено зростання показників MMP-9 у обох групах, в порівнянні з контрольною групою. В першій групі MMP-9 склали 944,62±119,24 ng/ml ($p < 0,01$) та мали кореляцію із НБК ($r = 0,79$), в другій групі зростання було не достовірне – 571,21±175,76 ng/ml ($p > 0,05$), порівнюючи зі здоровими – 334,49±113,38 ng/ml та між двома групами. Показники кількісного вмісту сироватки крові TIMP-1 також зростали: при АПТК – 961,70±329,72 ng/ml, НБК – 986,71±358,63 ng/ml, без достовірної різниці, порівнюючи між собою та групою контролю. Показники MMP-3 не мали різниці в обох групах: 1 група – 7,31±1,57 ng/ml, 2 група – 6,42±1,97 ng/ml, та достовірно не відрізнялися від здорових добровольців. Різниця у кількісному вмісті MMP та TIMP в різних вікових категоріях пацієнтів та по статі не виявлено.

Враховуючи виявлені зміни у зростанні MMP-9 в групі пацієнтів із НБК, для виявлення зв'язку з прогресуванням захворювання, проаналізували окремо вміст MMP-9 у 6 хворих із НБК, які мали ступінь активності SIII за Монреальською класифікацією, тотальне ураження кишечника з проявами псевдополі-

позу, як прояви високої активності захворювання та мали негативний прогноз щодо подальшого перебігу хвороби. У даних хворих, вміст MMP-9 мав достовірне зростання – 1431,15±78,67 ng/ml, в порівнянні з іншими хворими групи НВК (p<0,02) та пацієнтами з АПТК і здоровими особами (p<0,005) (r=0,87). Вміст MMP-1, MMP-3 та TIMP-1 не мав достовірної різниці з основною групою хворих на НВК та зберігалась відповідна різниця, в порівнянні з АПТК і контрольною групою.

При аналізі співвідношення MMP-1, MMP-9 до TIMP-1 визначили відхилення у вмісті показників в обох обстежених групах (рис. 2).

У хворих всіх обстежених груп визначено зростання співвідношення MMP-1/TIMP-1 в порівнянні з групою контролю, достовірно у хворих з НВК – 0,086±0,009 ng/ml (p<0,001) та АПТК – 0,078±0,014 ng/ml (p<0,05). Співвідношення MMP-9/TIMP-1 достовірно збільшилось у пацієнтів 1 групи – 0,96±0,18 ng/ml (p<0,05), найбільш інтенсивний кореляційний зв'язок визначено у хворих, які мали тотальне ураження кишечника із псевдополіпозом при НВК – 1,51±0,37 ng/ml (p<0,01), (r=0,82).

Для виявлення можливого впливу генетичного поліморфізму на зміну у функціонуванні MMP, їх індукції формування неоплазії, проаналізовано частоту та розподіл SNP генів MMP-9 A-8202G (rs11697325) та TIMP-1 C536T (rs11551797) у обстежених хворих. Аallel T, поліморфного локуса C536T гену TIMP-1 (rs11551797), не визначалась у всіх обстежених групах пацієнтів Полтавського регіону та здорових добровольців, тому в подальшому даний поліморфізм не аналізувався. При аналізі частоти виявлення SNP гену MMP-9 A-8202G (rs11697325), який відповідає за запальні та репаративні процеси в кишечнику, були виявлені гомозиготний дикий A/A генотип поліморфізму, гетерозиготний A/G генотип та гомозиготний мутантний G/G генотип поліморфізму у всіх обстежених групах (рис. 3).

Відповідно отриманих даних, в групі пацієнтів з АПТК виявлено достовірну різницю по частоті виявлення як гетерозиготного, так гомозиготного мутантного типу гену MMP-9 (-8202A/G) в порівнянні як з групою хворих на НВК так і контрольною групою. SNP поліморфізм по одній алелі A/G виявлявся рідше – 16 (44,4%) хворих (p<0,05), мутантний поліморфізм G/G виявлено достовірно частіше – 11 (30,6%) пацієнтів (p<0,02), що можливо обумовлює більш виражений вплив даного поліморфізму на розвиток поліпів за рахунок зміни в регуляції запальних та проліферативних процесів.

Також, у пацієнтів з НВК, які мали високу активність хвороби (SIII), гомозиготний дикий A/A генотип не визначався. Частіше виявляли гетерозиготний A/G генотип у 5 (83,3%) хворих (p>0,05), у 1 (16,7%) пацієнта гомозиготний мутантний G/G генотип гену MMP-9 (-8202A/G).

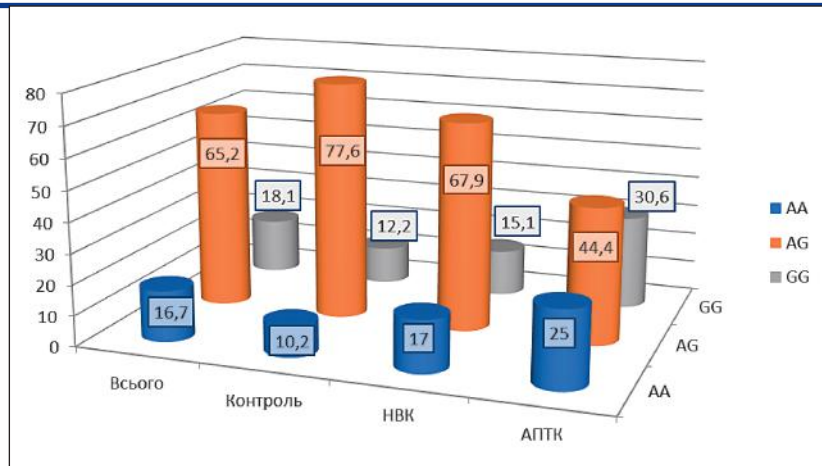


Рисунок 3 – Частота виявлення SNP гену MMP-9 -8202A/G (rs11697325) у хворих з НВК та АПТК.

Для оцінки виявлених порушень в SNP гену MMP-9 (-8202A/G) та визначення асоціації частоти генотипів із захворюваннями, проаналізовано їх розподіл на відповідність рівновазі Харді-Вайберга. Серед обстежених пацієнтів умови Харді-Вайберга (тест χ^2 при рівні значущості df=1) виконувались для випадків та обох груп, крім заміни (p<0,05). Результат представлено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Недотримання рівноваги Харді – Вайнберга в контрольній групі здорових осіб та хворих НВК

№	ген	генотип	контроль	HWE	χ^2	p
Контроль	MMP-9 -8202A/G	Генотип A/A	0.102	0.240	14.91	0.0001
		Генотип A/G	0.776	0.500		
		Генотип G/G	0.122	0.260		
НВК	MMP-9 -8202A/G	Генотип A/A	0.170	0.260	6.83	0.009
		Генотип A/G	0.679	0.500		
		Генотип G/G	0.151	0.241		

Відповідно даних таблиці 1, виявлено відхилення, щодо дотримання рівноваги Харді-Вайберга по частоті генотипів SNP гену MMP-9 -8202A/G: в контрольній групі здорових добровольців ($\chi^2=14,91$, p<0,0001) та в групі хворих на НВК ($\chi^2=6,83$, p<0,009). В зв'язку з цим, можливість асоціації даного поліморфізму із АПТК та НВК оцінювали з використанням загальної моделі спадкування, яка не залежить від даної рівноваги (табл. 2).

Аналізуючи частоту генотипів у пацієнтів 1 та 2 групи виявлено ряд особливостей. У хворих з АПТК

Таблиця 2 – Загальна модель спадкування у пацієнтів з АПТК та НВК

Ген SNP: MMP-9 -8202A/G rs1169732	Генотипи	Частота генотипів		χ^2	p	OR	
		Пацієнти (n=36)	Контроль			Значення	95% CI
Контрольна група – здорові (n=49)							
АПТК	A/A	0.250	0.102	9.82	0.007	2.93	0.89 – 9.68
	A/G	0.444	0.776			0.23	0.09 – 0.59
	G/G	0.306	0.122			3.15	1.04 – 9.57
НВК	A/A	0.170	0.102	1.33	0.51	1.80	0.56 – 5.80
	A/G	0.679	0.776			0.61	0.25 – 1.49
	G/G	0.151	0.122			1.27	0.41 – 3.98

визначали асоціацію захворювання з частотою гомозиготного мутантного генотипу G/G в SNP гену MMP-9 -8202A/G (rs1169732) ($\chi^2=9,82$, $p<0,007$, OR=2,93, 95% CI: 1.04 – 9.57), що підтверджує вплив даного генотипу на розвиток захворювання. У пацієнтів з НБК, кореляційні зв'язки із SNP гену MMP-9 -8202A/G не виявлено. Можливо поява даного гомозиготного поліморфізму генотипу G/G в гені MMP-9 -8202A/G є одним із провідних регуляторних механізмів появи АПТК, своєчасність виявлення якого допоможе в корекції лікування та попередженні появи неоплазій у таких хворих.

Обговорення результатів дослідження.

Експресія MMP та їх генетичні поліморфізми, відіграють важливу роль у розвитку патології кишечника. За нашими даними, гомозиготний мутантний генотип G/G в SNP гену MMP-9 -8202A/G (rs1169732) мав найбільший кореляційний зв'язок із розвитком АПТК, які відносяться до передракових захворювань кишечника ($\chi^2=9,82$, $p<0,007$, OR=2,93, 95% CI: 1.04 – 9.57). Крім того, в нашому дослідженні виявлено зростання кількісного вмісту MMP-1 в крові у хворих на АПТК – $74,31\pm 5,28$ ng/ml ($p<0,05$) та співвідношення MMP-1/TIMP-1 – $0,078\pm 0,014$ ng/ml ($p<0,05$) в порівнянні з групою контролю. Однак кількісний вміст MMP-3 та MMP-9 в сироватці крові не мав достовірної різниці з пацієнтами 1 групи та здоровими добровольцями. Отримані дані підтверджують роботи науковців, які пов'язують MMP переважно з ремоделюванням тканин і деградацією позаклітинного матриксу, та визначають їх провідну роль у розвитку неоплазій, в тому числі й раку кишечника [22]. До того ж підвищена експресія та активність MMP були описані у хворих на РТК, де рівні MMP корелювали із прогресуванням пухлин та мали негативний прогноз [16]. Інші автори запропонували використовувати MMP як потенційно прогностичні фактори ризику злоякісної трансформації поліпів [23].

На відміну від хворих із АПТК, пацієнти із НБК, мали зростання в сироватці крові як кількісного вмісту MMP-9 – $944,62\pm 119,24$ ng/ml ($p<0,01$) що мав кореляцію із НБК ($r=0,79$), так і MMP-1 – $85,16\pm 3,6$ ng/ml ($p<0,02$). Також зберігалась відмінність у різниці співвідношення MMP-1/TIMP-1 ($p<0,001$), порівнюючи зі здоровими. У хворих із НБК та тотальним ураженням кишечника і псевдополіпозом (ступінь активності SIII за Монреальською класифікацією) визначали найбільше зростання показників MMP-9 сироватки крові – $1431,15\pm 78,67$ ng/ml, порівнюючи з іншими хворими групи НБК ($p<0,02$) та обстеженими групами ($p<0,005$) ($r=0,87$), що свідчить про вагомий вплив MMP-9 у прогресуванні хвороби та розвитку активного тривалого запального процесу. Крім того, зростає дисбаланс у вмісті MMP та TIMP-1 при НБК. Співвідношення MMP-9/TIMP-1 в сироватці крові достовірно збільшилось у пацієнтів 1 групи – $0,96\pm 0,18$ ng/ml, найбільш виражено у хворих з високою активністю захворювання – $1,51\pm 0,37$ ng/ml ($p<0,01$), ($r=0,82$), що підтверджує значення експресії MMP-9 та їх дисбалансу в співвідношенні з TIMP-1 у прогресуванні НБК, можливий зміни захисних функцій СОТК [11], та поглибленні запальних процесів, які могли приводити до стимуляції формування неоплазій.

За даними Pujada A. et al., 2016р., саме MMP відносять до одних із біомаркерів активності НБК, які

можуть впливати на всі етапи запалення. MMP унікальним чином модулюють біологічну активність цитокінів, хемокінів, протеаз, які вивільнюються з початком запалення, що призводить до ініціації запального процесу, в тому числі і при НБК [24]. Секреція MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12 та MMP-14 макрофагами і фібробластами та їх регуляція, також важлива для репарації пошкоджених тканин та своєчасного загоєння ран при запальних захворюваннях кишечника [25]. MMP-9 має найбільші розбіжності, у критеріях вмісту в тканинах та крові організму людини, що пов'язано з їх участю у різноманітних сигнальних шляхах, в тому числі з впливом на NF κ B, активацією IL-1 і TGF- β , та можливістю впливу на TNF α , модифікуючи запалення [24].

Виявлений дисбаланс у наших пацієнтів із НБК у кількісному вмісті MMP-1, MMP-9 та TIMP-1 в сироватці крові може свідчити про визначну роль MMP у запальному процесі, та при тривалому перебігу можливий участі в неопластичній трансформації епітелію кишечника. Не дивлячись на те, що у хворих на НБК ми не виявили кореляцію із поліморфізмами генотипів гену MMP-9 -8202A/G (rs1169732), у пацієнтів які мали виражену активність хвороби, виявлено підвищення частоти алелі G та відсутність генотипу A/A гену MMP-9 (-8202A/G). Визначення алелі G гену MMP-9 (-8202A/G) у хворих на НБК можливо розглядати як фактор погіршення прогнозу перебігу хвороби, а генотип A/A – як протективний чинник у таких пацієнтів. Крім того, мутантний G/G генотип гену MMP-9 (-8202A/G) може бути негативним прогностичним маркером появи мутагенних змін у хворих на НБК, враховуючи виявлені кореляції даного поліморфізму із розвитком АПТК та біомаркером появи аденоми у здорових осіб.

Висновки.

Отже, MMP відіграють важливу роль як в запальних процесах так і в непластичних змінах. Виявлення підвищеної експресії MMP-1 сироватки крові у хворого, можливо розглядати як один із маркерів появи аденоми товстої кишки. G/G генотип гену MMP-9 (-8202A/G) може бути предиктором появи АПТК у здорових осіб та біомаркером неопластичних змін у хворих на НБК. Підвищена експресія MMP-9 та зростання дисбалансу в співвідношенні MMP-9/TIMP-1 у сироватці крові хворих на НБК має негативну прогностичну ознаку, щодо прогресування хвороби та ступеню активності запалення у таких хворих.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження доцільно спрямувати на розробку можливих шляхів корекції виявлених змін у вмісті MMP та генетичного поліморфізму MMP у пацієнтів із НБК та АПТК і профілактичних заходах, щодо попередження прогресування захворювання та поліпшення прогнозу, відповідно можливої неопластичної трансформації кишечного епітелію.

References / Література

1. Abdalla LF, Chaudhry Ehsanullah R, Karim F, Oyewande AA, Khan S. Role of using nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chemoprevention of colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Cureus*. 2020 May 22; 12(5):e8240. DOI: [10.7759/cureus.8240](https://doi.org/10.7759/cureus.8240).
2. Dorofeyev AE, Dorofeeva AA, Kiriyan EA, Rasskhina OA, Dynia YZ. Genetic polymorphism in patients with early and late onset of ulcerative colitis. *Wiadomości Lekarskie* 2020;LXXIII(1): 87-90.
3. Dorofeev AE, Kiriyan EA. Nekotorye geneticheskiye prediktory razvitiya patologii kishechnika. *Svit meditsini ta biologii*. 2014;10(4-2):31-4.
4. Baker AM, Cross W, Curtius K, Al Bakir I, Choi CR, Davis HL, et al. Evolutionary history of human colitis-associated colorectal cancer. *Gut*. 2019 Jun;8(6):985-95. DOI: [10.1136/gutjnl-2018-316191](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316191).
5. Dulai PS, Sandborn WJ, Gupta S. Colorectal Cancer and Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease: A Review of Disease Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Dec;9(12):887-94. DOI: [10.1158/1940-6207.CAPR-16-0124](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0124).
6. Pujada A, Walter L, Patel A, Bui TA, Zhang Z, Zhang Y, et al. Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. *Oncotarget*. 2017 Oct 17;8(55):94650-65. DOI: [10.18632/oncotarget.21841](https://doi.org/10.18632/oncotarget.21841).
7. Porter RJ, Arends MJ, Churchhouse AMD, Din S. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: translational risks from mechanisms to medicines. *J Crohns Colitis*. 2021 Dec 18;15(12):2131-41. DOI: [10.1093/ecco-icc/jjab102](https://doi.org/10.1093/ecco-icc/jjab102).
8. Corley DA, Jensen CD, Marks AR, Zhao WK, Lee JK, Doubeni CA, et al. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1298-306. DOI: [10.1056/NEJMoa1309086](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309086).
9. Aceto GM, Catalano T, Curia MC. Molecular aspects of colorectal adenomas: the interplay among microenvironment, oxidative stress, and predisposition. *Biomed Res Int*. 2020 Mar 16;2020:1726309. DOI: [10.1155/2020/1726309](https://doi.org/10.1155/2020/1726309).
10. Jonsson A, Hjalmarsson C, Falk P, Lois Ivarsson M. Stability of matrix metalloproteinase-9 as biological marker in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2018 Feb;35:50. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1109-4>.
11. O'Shea NR, Smith AM. Matrix metalloproteinases role in bowel inflammation and inflammatory bowel disease: An up to date review. *Inflamm. Bowel Dis*. 2014;20:2379-93. DOI: [10.1097/MIB.000000000000163](https://doi.org/10.1097/MIB.000000000000163).
12. Bai X, Bai G, Tang L, Liu L, Li Y, Jiang W. Changes in MMP-2, MMP-9, inflammation, blood coagulation and intestinal mucosal permeability in patients with active ulcerative colitis. *Exp Ther Med*. 2020 Jul;20(1):269-74. DOI: [10.3892/etm.2020.8710](https://doi.org/10.3892/etm.2020.8710).
13. Burg-Roderfeld M, Roderfeld M, Wagner S, Henkel C, Grötzinger J, Roeb E. MMP-9-hemopexin domain hampers adhesion and migration of colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2007 Apr;30(4):985-92. DOI: [10.3892/ijo.30.4.985](https://doi.org/10.3892/ijo.30.4.985).
14. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):55-71. DOI: [10.1016/j.bbamer.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.01.003).
15. Marshall DC, Lyman SK, McCauley S, Kovalenko M, Spangler R, Liu C, et al. Selective Allosteric Inhibition of MMP9 Is Efficacious in Pre-clinical Models of Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0127063. DOI: [10.1371/journal.pone.0127063](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127063).
16. Banday MZ, Sameer AS, Mir AH, Mokhdomi TA, Chowdri NA, Haq E. Matrix metalloproteinase (MMP) -2, -7 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population – A case-control study and a mini review. *Gene*. 2016 Sep 1;589(1):81-89. DOI: [10.1016/j.gene.2016.05.028](https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.028).
17. Eiró N, González LO, Cid S, Andicoechea A, Vizoso FJ. Matrix metalloproteinases expression in different histological types of colorectal polyps. *Rev Esp Enferm Dig*. 2017 Jun;109(6):414-20. DOI: [10.17235/reed.2017.4551/2016](https://doi.org/10.17235/reed.2017.4551/2016).
18. Morini SR, Denadai MV, Waisberg J, Lopes Filho GJ, Matos D, Saad SS. Metalloproteinases and colorectal cancer. Correlation of gene expression and clinical-pathological parameters. *Acta Cir Bras*. 2020;35(7):e202000707. DOI: [10.1590/s0102-865020200070000007](https://doi.org/10.1590/s0102-865020200070000007).
19. Lièvre A, Milet J, Carayol J, Le Corre D, Milan C, Pariente A, et al. Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma. *BMC Cancer*. 2006 Nov 24;6:270. DOI: [10.1186/1471-2407-6-270](https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-270).
20. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis*. 2017 Jun 1;11(6):649-70. DOI: [10.1093/ecco-icc/jjx008](https://doi.org/10.1093/ecco-icc/jjx008).
21. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc*. 2003 Dec;58(6):3-43. DOI: [10.1016/s0016-5107\(03\)02159-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(03)02159-x).
22. West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):615-29. DOI: [10.1038/nri3896](https://doi.org/10.1038/nri3896).
23. Pezeshkian Z, Nobili S, Peyravian N, Shojaee B, Nazari H, Soleimani H, et al. Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Pre-cancerous Conditions and in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 10;13(24):6226. DOI: [10.3390/cancers13246226](https://doi.org/10.3390/cancers13246226).
24. Pujada A, Walter L, Dhere T, Garg P. Matrix metalloproteinases as potential fecal biomarkers for ulcerative colitis – a function beyond their proteolytic activity. *Metalloproteinases In Medicine*. 2016;3:19-29. DOI: <https://doi.org/10.2147/MNM.S52956>.
25. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185. DOI: [10.1155/2014/149185](https://doi.org/10.1155/2014/149185).

ФАКТОРИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ НЕОПЛАЗІЇ У ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ

Кир'ян О. А.

Резюме. Неспецифічний виразковий коліт відноситься до запальних захворювань кишечника, який має складні патогенетичні механізми розвитку хвороби та при тривалому перебігу запального процесу, підвищення ризику раку товстої кишки. Спорадичні форми раку кишечника, більш часто виникають через послідовність аденома-карцинома, при виключенні запалення. Однак як в ініціації запалення так і у формуванні неоплазій важливу роль відіграють зміни функціонування матриксних металопротеїназ. Тому метою нашої роботи було вивчення у пацієнтів Полтавського регіону особливостей впливу MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 на розвиток та перебіг виразкового коліту та аденоматозних поліпів товстої кишки, аналіз спадкової схильності в залежності від одноступінцевих поліморфізмів генів TIMP-1 C536T (rs11551797), MMP-9 -8202A/G (rs11697325). У дослідження були включені 89 хворих: 53 (59,6%) із неспецифічним виразковим колітом, 36 (40,4%) із аденоматозними поліпами та 49 здорових. Дослідили кількісний вміст MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 сироватки крові методом ІФА та одноступінцевих поліморфізмів генів MMP-9 A-8202G (rs11697325) та TIMP-1 C536T (rs11551797) із використанням зразків ДНК цільної венозної крові методом ПЦР. Отже, виявлення підвищеної експресії MMP-1 сироватки крові, можливо розглядати як один із маркерів можливої появи аденоми товстої кишки, а G/G генотип гену MMP-9 (-8202A/G) як предиктор появи аденоми у здорових осіб та біомаркер неоплазії у хворих на виразковий коліт. Підвищена експресія MMP-9 та дисбаланс в співвідношенні MMP-9/TIMP-1 у сироватці крові хворих на неспецифічний виразковий коліт має негативну прогностичну ознаку, щодо прогресування хвороби.

Ключові слова: матриксні металопротеїнази, аденоматозні поліпи, запалення, неспецифічний виразковий коліт

RISK FACTORS FOR NEOPLASIA IN PATIENS WITH ULCERATIVE COLITIS

Kyrian O. A.

Abstract. Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease with complex pathogenetic mechanisms. It increases the risk of colon cancer in a case of the long-term inflammation. Sporadic forms of cancer develop more frequently because of the adenoma-carcinoma sequence if there is no inflammation, however, matrix metalloproteinases play an important role in both inflammation initiation and in neoplasia.

The purpose of this article is to describe the research of peculiarities of the MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 influence on the development and the course of the ulcerative colitis and adenomatous polyps of the colon in patients of the Poltava region. During the research, the hereditary predisposition to the disease and its dependency on the TIMP-1 C536T (rs11551797), MMP-9 -8202A/G (rs11697325) single nucleotide polymorphism (SNP) was analyzed. 89 patients were involved in the research: 53 (59.6%) with ulcerative colitis, 36 (40.4%) with adenomatous polyps and 49 healthy people. MMP-1, MMP-3, MMP-9, and blood serum TIMP-1 were quantified with the ELISA assay. MMP-9 A-8202G (rs11697325) and TIMP-1 C536T (rs11551797) SNP were analyzed with the PCR method using the DNA sample of the whole venous blood. The correlation was established between the patients with adenomatous polyps and with the G/G genotype of MMP-9 -8202A/G (rs11697325) ($\chi^2=9,82$, $p<0,007$) SNP. A significant increase of MMP-1 level in blood ($p<0,05$) was also detected, as well as MMP-1/TIMP-1 ratio in comparison with the control group. The increased level of MMP-9 ($p<0,01$) ($r=0,79$) and MMP-1 ($p<0,02$) was found in patients with the ulcerative colitis. This appeared to be most marked in patients with highly active disease. The difference between the MMP-1/TIMP-1 ratio of the groups remained as well, and also the MMP-9/TIMP-1 ration increased especially in a case of highly active disease ($p<0,01$) ($r=0,82$). The increased expression of MMP-1 in blood serum therefore can be regarded as one of the markers associated with the development of colon adenoma, and the G/G genotype of MMP-9 (-8202A/G) can be considered as the marker of the adenoma development in healthy people and as the neoplasia biomarker in patients with ulcerative colitis. The increase expression of MMP-9 and the imbalance in the ratio of MMP-9/TIMP-1 in blood serum in patients with ulcerative colitis is considered an unfavorable prognostic marker.

Key words: matrix metalloproteinases, adenomatous polyps, inflammation, ulcerative colitis

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Kyrian O. A.: [0000-0003-4855-4208](https://orcid.org/0000-0003-4855-4208)^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kyrian Olena Anatoliyivna / Кир'ян Олена Анатоліївна

Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет

Ukraine, 36000, Poltava, 23 Shevchenko str. / Адреса: Україна, 36000, м. Полтава, вул. Шевченка 23

Tel.: +380954503535 / Тел.: +380954503535

E-mail: hel_kirjan@i.ua

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 17.06.2022 / Стаття надійшла 17.06.2022 року
Accepted 06.11.2022 / Стаття прийнята до друку 06.11.2022 року