



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET



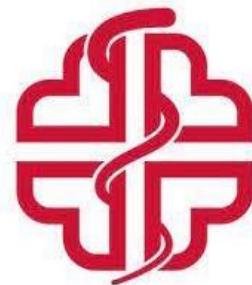
**Jugoslav Đeri**

**PREDIKTIVNI ZNAČAJ VASKULARNOG  
ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I  
MATRIKS METALOPROTEINAZE U  
RAZVOJU DEHISCENCIJE NISKIH  
KOLOREKTALNIH ANASTOMOZA KOD  
BOLESNIKA LIJEČENIH  
NEOADJUVANTNOM RADIOTERAPIJOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA



UNIVERSITY OF BANJA LUKA  
FACULTY OF MEDICINE



**Jugoslav Đeri**

**PREDICATIVE IMPORTANCE OF  
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH  
FACTOR AND MATRIX-  
METALOPROTEINASES IN THE  
DEVELOPMENT OF DEHISCENCE OF LOW  
COLORECTAL ANASTOMOSIS IN PATIENTS  
TREATED WITH NEOADJUVANT  
RADIOTHERAPY**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor: Prof. dr Nikica Grubor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Naslov doktorske disertacije:** Prediktivni značaj vaskularnog endoteljnog faktora rasta i matriks metaloproteinaza u razvoju dehiscencije niskih kolorektalnih anastomoza kod bolesnika liječenih neoadjuvantnom radioterapijom

**Rezime:** Operativno liječenje kolorektalnog karcinoma glavni je i najvažniji model liječenja, koji omogućuje duže i kvalitetnije preživljavanje. Međutim, samo je liječenje ipak veoma kompleksno i ono predstavlja kombinovanu primjenu hirurgije, radioterapije i hemioterapije, a koje danas predstavlja zlatni standard u liječenju kolorektalnog karcinoma. Kolorektalna anastomoza veoma je specifična procedura u digestivnoj hirurgiji, kako u formiranju, zarastanju, tako i u nastanku komplikacija. Zarastanje anastomoze složen je mehanizam i ono zavisi od brojnih, međusobno povezanih, faktora. Cilj ovoga rada bio je da se utvrdi korelacija markera vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), matriksa metaloproteinaze 2 (MMP2) i matriksa metaloproteinaze (MMP9) sa nastankom dehiscencije kolorektalne anastomoze i korelacija radioterapije sa smanjenjem vrijednosti VEGF, MMP2 i MMP9 u tumorskom tkivu i zdravom tkivu u predjelu anastomoze. MMP i VEGF imaju veoma važnu ulogu u progresiji tumora rektuma, a važni su i za adekvatno zarastanje anastomoza. Kod svih pacijenata bioptirano je tumorsko i zdravo tkivo u neposrednoj blizini tumora. Jedna grupa pacijenata hirurški je tretirana, a druga grupa primila je preoperativnu radioterapiju, a potom hirurški tretirana. Imunohistohemijskom analizom bioptiranih preparata utvrđeno je da je postojala pozitivna korelacija dehiscencije anastomoze sa visokim vrijednostima VEGF, MMP2 i MMP9. U svim slučajevima dehiscencije anastomoze imunohistohemijska ekspresija ispitivanih markera bila je povišena, MMP2 u tumorskom tkivu  $p = 0,02$ , MMP9 u tumorskom tkivu  $p = 0,02$  i VEGF u tumorskom tkivu  $p = 0,01$ . Takođe, potvrđena je korelacija radioterapije sa smanjenjem vrijednosti markera, i to MMP2 u tumorskom tkivu  $p = 0,008$ , MMP9 u tumorskom tkivu  $p = 0,04$  i VEGF u tumorskom tkivu  $p = 0,08$ . Dalje je potvrđeno da nije postojala povezanost preoperativno provedene radioterapije sa češćim nastankom dehiscencije kolorektalne anastomoze i drugih komplikacija.

**Ključne riječi:** *Kolorektalna anastomoza, dehiscencija anastomoze, neoadjuvantna radioterapija, MMP, VEGF.*

**Naučna oblast:** Hirurgija

**Naučno polje:** Medicina

Mentor: Prof. dr Nikica Grubor, Faculty of medicine, University of Belgrade

Title of Doctoral Dissertation: Predicate importance of vascular endothelial growth factor and Matrix-metalporoteinases in the development of dehiscence of low colorectal anastomosis in patients treated with neoadjuvant radiotherapy

Summary: Operational treatment of colorectal cancer is the main and most important model of treatment that enables longer and better survival. However, the treatment itself is very complex and it represents a combined use of surgery, radiotherapy and chemotherapy, which is now the gold standard in the treatment of colorectal cancer. Colorectal anastomosis is a very specific procedure in digestive surgery both in formation, healing and in the onset of complications. Anastomosis healing is a complex mechanism and it depends on a number of interconnected factors. The aim of this work was to determine the correlation of markers VEGF, MMP2 and MMP9 with the onset of colorectal anastomosis and correlation of radiotherapy with reduced value of VEGF, MMP2 and MMP9 in tumor tissue and healthy tissue in the anastomosis. MMP and VEGF play a very important role in the progression of rectum tumors and they are also important for adequate healing of anstomosis. All patients were given biopsies of tumors and tissue in the immediate vicinity of the tumor. One group of patients was treated surgically and the other group received preoperative radiotherapy and then surgical treatment. Immunohistochemical analysis of biopsies found that there was a positive correlation of dehiscence anastomosis with high values VEGF, MMP2 and MMP9. In all cases, the dehiscence rate was elevated, MMP2 in tumor tissue  $p = 0,02$ , MMP9 in tumor tissue  $p = 0,02$ , VEGF in tumor tissue  $p = 0,01$ . Radiotherapy correlation with decreased marker value was also confirmed, MMP2 in tumor tissue  $p = 0,008$ , MMP9 in tumor tissue  $p = 0,04$  VEGF in tumor tissue  $p = 0,08$ . It also confirmed that there was no link between preoperative radiotherapy and the more common onset of colorectal anastomosis and other complications.

Keywords: Colorectal anastomosis, dehiscenca anastomosis, neoadjuvant radiotherapy, MMP, VEGF.

Scientific area: Surgery

Scientific field: Medicine

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiološke karakteristike tumora rektuma .....	1
1.1.1. Epidemiološke karakteristike tumora rektuma u svijetu .....	1
1.2. Etiologija tumora rektuma .....	3
1.3. Hirurška anatomija rektuma.....	4
1.4. Određivanje stadijuma tumora rektuma.....	9
1.5. Istorijat hirurgije rektuma .....	12
1.5.1. Hiruruško liječenje rektalnog tumora.....	13
1.5.2. Neoadjuvantna radiohemoterapija.....	14
1.6. Molekularni marker kod tumora rektuma .....	15
1.7. Anastomoza u hirurgiji rektuma i njeno zarastanje .....	18
1.7.1. Faktori odgovorni za zarastanje kolorektalne anastomoze.....	21
1.7.2. Preventivne mjere dehiscencije kolorektalne anastomoze .....	24
2. RADNE HIPOTEZE .....	29
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	30
4. MATERIJALI I METODOLOGIJA .....	31
4.1. Odabir i uključivanje ispitanika u istraživanje.....	31
4.2. Metodologija naučnog istraživanja .....	32
4.3. Hirurški tretman i postoperativno praćenje pacijenata .....	33
4.5. Histološka i imunohistohemijksa analiza .....	36
4.6. Interpretacija dobijenih slikovnih rezultata .....	40
4.7. Statistička obrada podataka .....	40
5. REZULTATI.....	42
5.1. Demografske karakteristike ispitanika u istraživanju .....	42
5.2. Podaci o pacijentu: .....	42
5.3. Učestalost tumora po starosnim grupama .....	44
5.4. Povezanost dehiscencije sa godinama starosti po starosnim grupama .....	44
5.5. Povezanost dehiscencije anastomoze kod pacijenata sa neo RHT, u odnosu na pacijente bez neo RHT .....	46

5.6. Povezanost pola i nastanka dehiscencije anastomose .....	47
5.7. Povezanost dijabetes melitusa i nastanka dehiscencije anastomoze.....	50
5.8. Povezanost dehiscencije anastomoze sa vrijednostima BMI.....	53
5.9. Prikaz stepena distribucije MMP2, MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu rektuma.....	57
5.10. Prikaz stepena distribucije VEGF u zdravom i tumorskom tkivu .....	61
5.11. Povezanost dehiscencije sa visokom distribucijom MMP2, MMP9, VEGF .....	64
5.12. Povezanost neoadjuvantne radioterapije i smanjenja ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF .....	66
5.13. Grafički prikazi ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF prije i poslije neoadjuvantne radioterapije .....	68
5.14. Povezanost ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF sa razvojem postoperativnih infekcija .....	74
5.15. Povezanost ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF sa razvojem enterokolitisa .....	76
5.16. Učestalost reintervencija kod pacijenata sa dehiscencijom .....	78
5.17. Slikovna prezentacija rezultata imunohistohemijske analize .....	80
6. DISKUSIJA.....	86
7. ZAKLJUČCI .....	101
8. LITERATURA.....	102
9. BIOGRAFIJA .....	1

## SKRAĆENICE

MMP – Matrix-metalloproteinasis

VEGF – Vascular endothelial growth factor

AJCC – America Joint Committee on Cancer

IUCC – International Union Against Cancer

5-FU – 5 flourouracil

TIMP1 – Tissue inhibitor of metalloproteinases

KT – Kompjuterizovana tomografija

NMR – Nuklearna magnetna rezonac

RHT – Radiohemoterapija

ASA – American Society of Anesthesiology

## 1. UVOD

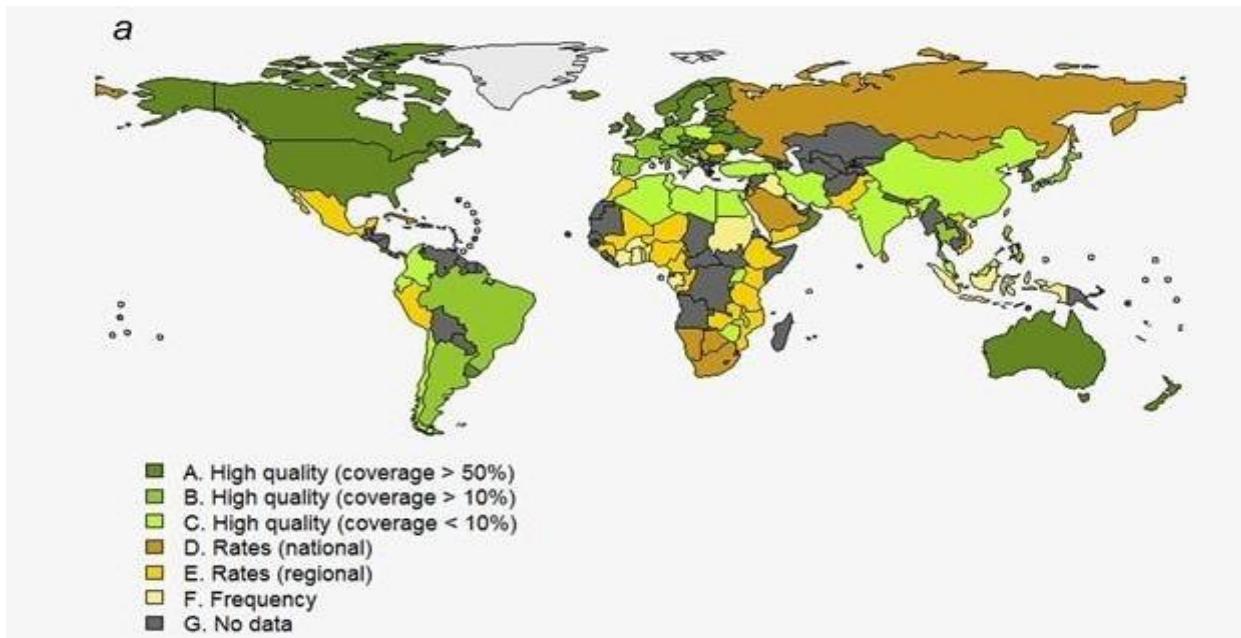
### 1.1. Epidemiološke karakteristike tumora rektuma

#### 1.1.1. Epidemiološke karakteristike tumora rektuma u svijetu

Maligne bolesti danas predstavljaju značajan zdravstveni problem i u velikoj mjeri utiču na kvalitet života bolesnika, a imaju i veliki ekonomski značaj zbog sve većih izdataka za liječenje i njegu oboljelih. Incidencija malignih bolesti varira među zemljama svijeta, kao i unutar samih zemalja. Broj kolorektalnih malignih oboljenja danas je u stalnom porastu. Procjenjuje se da godišnje od karcinoma kolorektuma oboli oko 1,2 miliona ljudi<sup>1</sup>. U Sjedinjenim Američkim Državama 1/3 oboljelih od karcinoma kolorektuma čini karcinom rektuma<sup>2</sup>.

Analiza obolijevanja po polovima pokazuje da je u svijetu karcinom rektuma treći vodeći maligni tumor u muškoj, a drugi u ženskoj populaciji. Muškarci češće obolijevaju od kolorektalnog karcinoma i to u prosjeku za 1,6 puta<sup>3</sup>. Procjenjuje se da godišnje od karcinoma kolorektuma oboli oko 664.000 muškaraca i 571.000 žena, oko 4/5 oboljelih u Aziji (225.185 žena i 283.596 muškaraca) i u Evropi (203.185 žena i 229.229 muškaraca). Najmanji broj oboljelih zabilježen je u Okeaniji (8.086 žena i 9.733 muškarca) i u Africi (15.882 žene i 19.049 muškaraca)<sup>4</sup>.

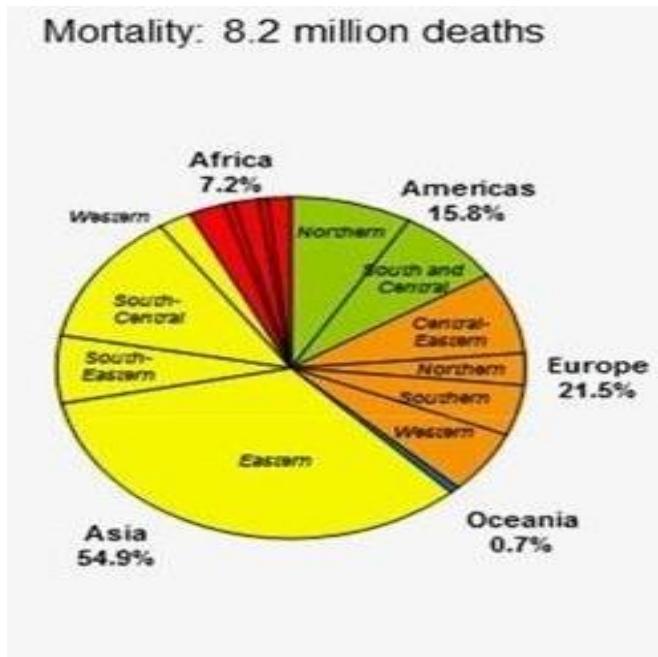
Incidenca karcinoma kolorektuma raste u nekim zemljama gdje je istorijski bila niska, kao na primjer, u Japanu, i to prvenstveno zbog uvođenja zapadnjačkog načina ishrane, koja je bogata mlijekom, mesom, jajima i mastima<sup>5</sup>. U nekim visokorazvijenim zemljama, kao što su Finska i Norveška, incidencija karcinoma kolorektuma i dalje raste, dok se u Francuskoj i Australiji održava stabilnom, a u SAD opada. Najveći je porast stope incidence u Aziji (Japan, Kuvajt i Izrael) i u istočnoj Evropi (Češka Republika, Slovačka i Slovenija) (Slika 1).



*Slika 1: Grafički prikaz distribucije incidence kolorektalnog karcinoma za razvijene i nerazvijene zemlje svijeta (Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, International Journal of Cancer 2015; 136(5): E359–86)*

Maligne bolesti danas su vodeći uzrok umiranja u svijetu, a godišnje u svijetu od kolorektalnog karcinoma umre oko 600.000 ljudi<sup>3</sup> (Slika 2).

Zbog toga je kolorektalni karcinom četvrti najčešći uzrok smrti od karcinoma u svijetu (poslije karcinoma pluća, želuca i jetre; posmatrano za oba pola zajedno)<sup>5</sup>.



Slika 2: Grafički prikaz mortaliteta kolorektalnog karcinoma u svijetu (GLOBOCAN 2012)

Prepostavka je da će do 2030. godine broj umrlih od malignih bolesti iznositi preko 11 miliona<sup>6</sup>. Kolorektalni karcinom treći je po učestalosti uzročnik smrti od karcinoma u svijetu<sup>4</sup>. U velikom broju zemalja širom svijeta dolazi do opadanja stope umiranja od karcinoma kolorektuma, a to kao rezultat ranog otkrivanja bolesti i/ili poboljšanja terapije. Međutim, u zemljama sa ograničenim resursima, kao što su Meksiko i Brazil u Južnoj Americi, i Rumunija i Rusija u istočnoj Evropi, stope mortaliteta i dalje rastu<sup>7</sup>.

## 1.2. Etiologija tumora rektuma

Etiologija kolorektalnog karcinoma još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Ipak, na osnovu dosadašnjih epidemioloških rezultata, utvrđeni su brojni faktori koji dovode do većeg rizika obolijevanja, a postoje i brojni faktori koji mogu smanjiti rizik od obolijevanja. Svi faktori rizika mogu se podijeliti na nepromjenljive i promjenljive faktore<sup>8</sup>.

U nepromjenljive faktore rizika spadaju prije svega godine starosti, tako da je rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma 15 puta veći kod starijih od 50 godina, u odnosu na starosnu grupu 20–49 godina<sup>3,9</sup>.

U odnosu na pol, incidencija i mortalitet su za 35–40% veći kod muškaraca nego kod žena<sup>4</sup>. Rizik obolijevanja od kolorektalnog karcinoma dva do tri puta je veći kod pacijenata srodnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Takođe, pacijenti sa inflamatornim bolestima crijeva, ulceroznim kolitisom i Kronovom bolesti u većoj mjeri doprinose nastanku kolorektalnog carcinoma<sup>10</sup>. Herditarni kolorektalni karcinomi čine i do 10% svih kolorektalnih karcinoma<sup>11</sup>.

U promjenljive faktore rizika spadaju način ishrane i gojaznost, jer je utvrđeno da je način ishrane u korelaciji sa nastankom kolorektalnog karcinoma<sup>12</sup>. Ishrana bogata mastima i crvenim mesom zbog metaboličkih poremećaja u velikoj mjeri dovodi do nastanka kolorektalnog karcinoma, tako da je u zemljama gdje masti čine 50% kalorijskog unosa značajno veća incidencija nastanka kolorektalnog karcinoma<sup>13</sup>. U mnogim studijama uočeno je da prekomjerna tjelesna težina, gojaznost i šećerna bolest predstavljaju faktore rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma kod oba pola<sup>14</sup>.

Hronična upotreba alkohola povećava rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Naime, osobe koje konzumiraju alkohol imaju 23% veći rizik za nastanak maligniteta u odnosu na one koji ne piju ili koji konzumiraju manje od jednog pića dnevno<sup>15</sup>.

### 1.3. Hirurška anatomija rektuma

Debelo crijevo je završni dio digestivnog trakta i pruža se od tankog crijeva do anusa. Hirurška anatomija nešto je drugačija i ona se zasniva na vaskularizaciji kolona.

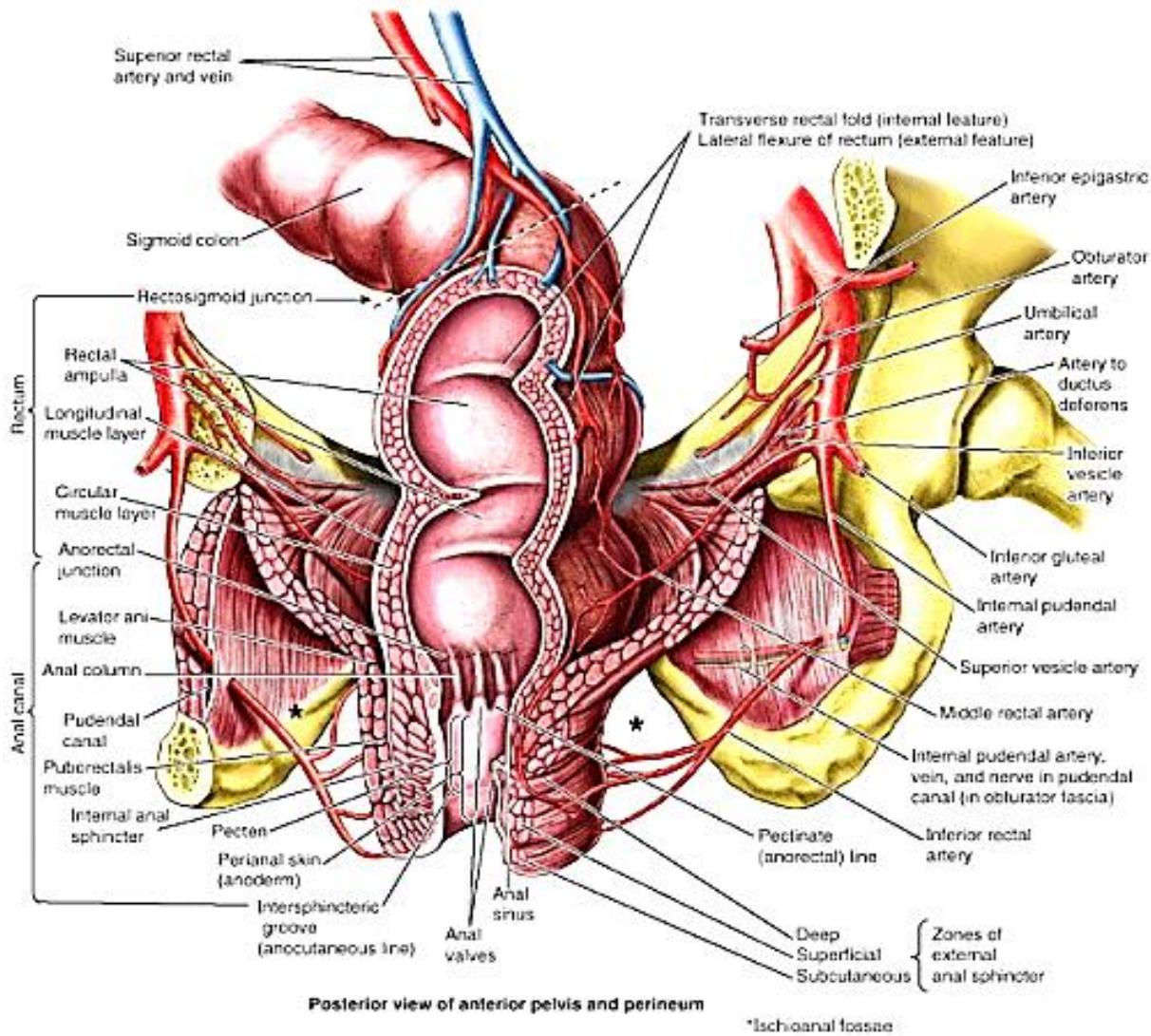
Razlikujemo desni kolon, koji vaskularizuje gornja mezenterična arterija, a on se sastoji od cekuma, ascedentnog kolona i proksimalne dvije trećine poprečnog kolona.

Lijevi kolon vaskularizuje donja mezenterična arterija, a čine ga distalna trećina poprečnog kolona, descedentni kolon i sigmoidni kolon. Rektum, završni dio debelog crijeva, počinje na rektosigmoidnom prelazu u visini promotorijuma i proteže se distalno uz sakrum i kokcigealnu kost. Dužina rektuma iznosi 12–15 cm; u sagitalnoj ravni rektum pravi luk konkavan prema naprijed. U frontalnoj ravni rektum pravi tri zavoja, od kojih su gornji i donji konveksni udesno, a srednji ulijevo. U svom distalnom dijelu ampula rektuma nastavlja se u analni kanal, koji je prosječne dužine četiri cm i završava se anusom.

U gornjoj trećini rektum je spreda i sa strana prekriven parijetalnim peritoneumom, a u srednjoj trećini prekriven je samo sa prednje strane. Donja je trećina ekstraperitonealna.

Zid rektuma sastavljen je od mukoze, submukoze i muskularis proprie. Lamina muskularis propria sastoji se od unutrašnjeg cirkularnog i spoljašnjeg longitudinalnog sloja, koji se spaja sa vlaknima muskulusa puborektala u nivou anorektalnog prstena.

Gornja valvula nalazi se na oko 15 cm od analnog otvora. Srednja valvula je razvijenija i nalazi se u visini najniže tačke peritonealne duplje. Donja Hustonova valvula nalazi se na tri cm iznad zupčaste linije (Slika 3).



Slika 3: Anatomija rektuma i analnog kanala (Moore K, Clinically Oriented Anatomy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005)

Tenije kolona se u rektosigmoidnom prelazu šire, i distalno od tog spoja njih više nema. U lumenu rektuma nalaze se valvule, tzv. Hustonovi nabori, koje formiraju cirkularni mišićni sloj i sluzokoža.

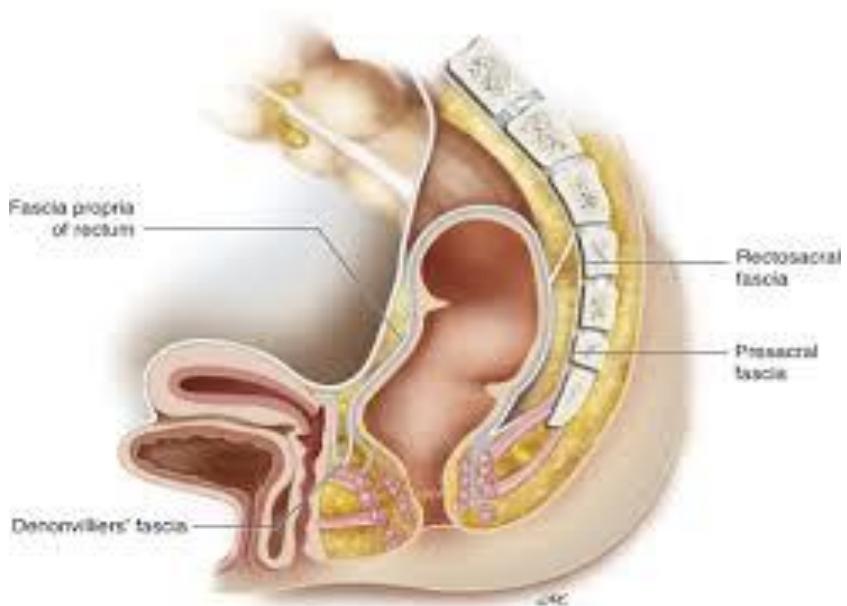
Iza rektuma nalazi se Valdejerova (Waldeyer) fascija, koja je dio parijetalne pelvične fascije, koja prekriva sakralnu i kokcigealnu kost i presakralne krvne sudove. U Valdejerevoj

fasciji nalaze se vlakna sakralnih splanhničkih nerava, te grane lateralnih i medijalnih sakralnih krvnih sudova<sup>16</sup>.

Prednji zid ekstraperitonealnog dijela rektuma pokriva visceralna pelvična fascija, odnosno fascija proprija. Ispred ove fascije nalazi se Denonvijeova (Denonvillier) fascija, koja predstavlja vezivno tkivo koje odvaja rektum od seminalnih kesica i prostate, odnosno vagine kod žena<sup>17</sup>.

Ona se sastoji od kolagenih, glatkih mišićnih i elastičnih vlakana, koja se gusto prepliću.

U rektavezikalnom recezusu završavaju se Denonivejova i Valdejerova fascija, tako da ih lateralno nema, i to je razlog što se karcinomi rektuma šire lateralno. U lumenu rektuma krivinama odgovaraju valvule rektuma (Hustonovi nabori), a koje formiraju cirkularni mišićni sloj i sluzokoža (Slika 4).



Slika 4: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery*, New York: Springer, 2007, p. 5.

Distalno od anorektalnog prelaza počinje analni kanal, čiji je zid građen od unutrašnjeg analnog sfinktera, spoljašnjeg analnog sfinktera i dijela levatornog mišića.

Unutrašnji analni sfinkter predstavlja završni dio cirkularne muskulature crijeva. Spoljašnji analni sfinkter čini poprečnoprugasta muskulatura, raspoređena u tri dijela: potkožni, površni i duboki.

Hirurški rektum može se podijeliti na: gornji (12–15 cm), srednji (6–12 cm) i distalni dio (0–6 cm). Proksimalnu trećinu rektuma vaskularizuje gornja rektalna arterija, koja predstavlja nastavak donje mezenterične arterije.

Srednje rektalne arterije snabdijevaju srednju trećinu rektuma, a one su grane hipogastrične arterije. One ulaze u rektum iznad anusa, kalibra su 1–2 mm i prisutne su obostrano samo u 4,8% slučajeva<sup>18</sup>. Donje rektalne arterije jesu grane pudendalnih arterija, a prolaze kroz ishiorektalnu jamu, granaju se u više grančica koje prodiru kroz spoljašnji i unutrašnji sfinkter do mukoze, gdje se spajaju sa grančicama srednje rektalne arterije.

Venska krv rektuma drenira se u dva venska sistema. Gornja rektalna vena drenira se u portalni sistemu, dok se srednja i donja rektalna vena dreniraju u sistemski venski krvotok. Limfna drenaža rektuma odvija se preko submukoznih i subseroznih limfatičnih pleksusa u zidu crijeva u limfne kanale i žljezde koje prate odgovarajuće arterije<sup>19</sup>.

Najveći dio limfe, oko 90%, drenira se ushodnim putevima. Iz gornje trećine rektuma drenaža se odvija u limfne žljezde duž donje mezenterijalne arterije, iz srednje trećine drenaža je usmjerenja ka ilijačnim limfnim čvorovima, dok iz donje trećine rektuma limfna drenaža odlazi dijelom ka ilijačnim limfnim čvorovima, a dijelom ka dubokim i površnim preponskim limfnim čvorovima.

Autonomna inervacija rektuma potiče od presakralnih simpatičkih vlakana, grana donjeg mezenteričkog pleksusa i sakralnih parasimpatičkih nerava. Simpatička vlakna za rektum nastaju od prva tri lumbalna segmenta kičmene moždine. Gornji hipogastrični pleksus nastaje iz preaortalnog pleksusa i lumbalnih splanhničnih nerava. Potom se vlakna pružaju nadolje, te

u nivou promontorija formiraju lijevi i desni hipogastrični nerv, a kojima se priključuju i parasimpatičke niti (nervi erigantes).

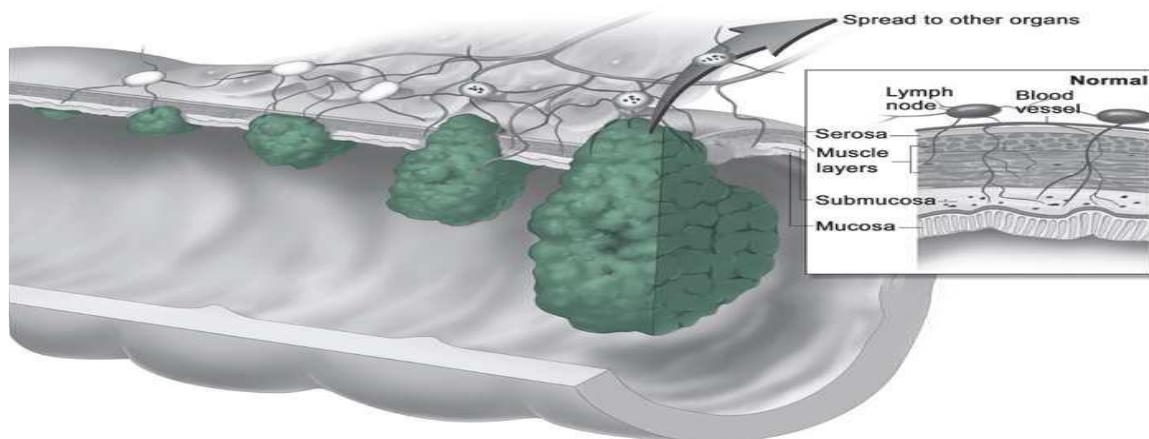
Na taj način nastaju dva pelvična pleksusa koji inervišu rektum i organe male karlice. Voljna muskulatura pelvičnog poda inervisana je pudendalnim nervom, nastalim iz S4 segmenta kičmene moždine<sup>20</sup>.

#### 1.4. Određivanje stadijuma tumora rektuma

Određivanje stadijuma karcinoma rektuma veoma je važno zbog dobijanja informacija o proširenosti bolesti, koje su od najvećeg značaja za prognozu bolesti, za izbor najoptimalnijeg terapijskog tretmana, kao i za procjenu adekvatnog odgovora na primijenjenu terapiju. Histološki tip i podhistološki tip tumora rektuma predstavljaju jedan od faktora u procjeni prognoze tumora rektuma<sup>21</sup>. Da bi se postigla što veća tačnost u određivanju stadijuma karcinoma rektuma i da bi se izabrala najbolja individualna terapija od najvećeg je značaja multidisciplinarni rad hirurga, radiologa i onkologa.

Na osnovu svega ovoga može se reći da je precizno određivanje stadijuma karcinoma rektuma ključno za pravilan multidiplinarni pristup liječenju<sup>22</sup>. Savremeni onkološki pristup danas podrazumijeva i nove kriterijume koji se odnose na prognozu bolesti, vjerovatnoću preživljavanja i na stepen odgovora na terapiju<sup>23</sup>. Najvažniji stavovi kod patohistološkog ispitivanja karcinoma rektuma obuhvataju makroskopsku procjenu preparata, resekcione linije, milimetarsku dubinu progresije, mikrometastasko širenje i tumorske depozite, te vaskularnu i perineuralku invaziju<sup>24</sup>. Godine 1932. Cuthbert E. Dukes, patolog bolnice St. Mark u Londonu postavio je složeniji sistem za određivanje stadijuma karcinoma rektuma. On je utvrdio da karcinom rektuma u svojoj najranijoj fazi nastaje kao proliferacija koja prominira iznad površine epitela i da se razvija iz već postojećeg adenoma, zatim da on metastazira kroz zid crijeva i limfne sudove u limfne čvorove<sup>25</sup>. U onim slučajevima u kojima je tumor ograničen na zid rektuma, oni se klasifikuju kao stadijum A; oni slučajevi, kod kojih se tumor širi direktno kroz

ekstrarektalna tkiva klasifikovani su kao stadijum B; a slučajevi kod kojih su prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima svrstani su u stadijum C. Viši patološki stadijum ukazuje na lošiju prognozu<sup>26</sup> (Slika 5).

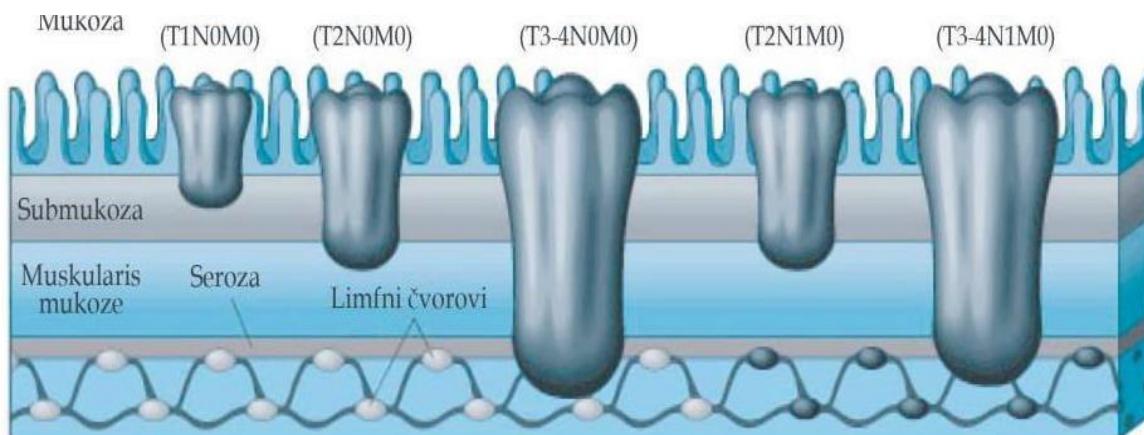


Slika 5: Colorectal Cancer Facts & Figures 2013

Astler i Coller su 1954. godine modifikovali Dukes-ovu klasifikaciju. Godine 1987. *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) i *International Union Against Cancer* (IUCC) uveli su sistem za određivanje stadijuma karcinoma baziran na dubini lokalne tumorske invazije (T), na prisustvu metastaskih limfnih nodusa i njihovom broju (N) i na postojanju udaljenih metastaza(M)<sup>27</sup>. Za razliku od Dukes-ove klasifikacije, koja je bazirana samo na patohistološkom nalazu, TNM sistem za određivanje stadijuma tumora dozvoljava procjenu T, N i M kategorija i uz pomoć drugih kliničkih kriterijuma, kao što su fizikalni pregled bolesnika, imidžing, endoskopski pregled i/ili hirurška eksploracija<sup>28</sup>. Ranije su informacije o patološkom stadijumu bolesti bile korisne samo za procjenu prognoze bolesti, ali danas one se koriste i u mnoge druge svrhe, prevashodno za izbor optimalne terapije i za procjenu odgovora na primjenjenu terapiju. Prema TNM klasifikaciji najvažniju anatomsку strukturu na osnovu koje se bazira određivanje stadijuma tumora predstavlja mišićni sloj zida rektuma (lamina muscularis propria): T1 karcinomi rektuma lokalizovani su unutar mukoze i submukoze. T2 tumori

infiltrišu mišićni sloj zida rektuma, ali ga ne probijaju, dok se T3 karcinomi propagiraju izvan muskularnog sloja i infiltru mezo-rektalno masno tkivo. T4 karcinomi rektuma infiltru peritoneum ili susjedne organe. Međutim, T3 tumori čine široku grupu, koja obuhvata tumore koji se tek diskretno šire preko muskularnog sloja, kao i tumore koji se propagiraju do mezo-rektalne fascije ili koji je infiltru<sup>29</sup>.

Kod ove grupe tumora izuzetno je važno utvrditi da li je tumorom zahvaćena i mezo-rektalna fascija. Ovom klasifikacijom omogućuje se diferenciranje bolesnika sa minimalnom infiltracijom mezo-rektalnog masnog tkiva i bolesnika kod kojih postoji evidentna infiltracija mezo-rektalne fascije. Na osnovu toga može se predvidjeti mogućnost postizanja potpune resekcije tumora, pošto precizna selekcija bolesnika sa različitim rizikom od lokalnog recidiva omogućava primjenu terapije prilagođene individualnom riziku<sup>30</sup> (Slika 6).



Slika 6: Stadijumi razvoja kolorektalnog karcinoma u odnosu na primijenjene klasifikacione sisteme (preuzeto i modifikovano iz AJCC, 2010)

## 1.5. Istorijat hirurgije rektuma

Prvu simptomatologiju bolesti u vezi sa tumorom rektuma dao je John Ardern početkom XIV vijeka. Dugo vremena hirurzi su izbjegavali da operišu crijeva zbog opasnosti od peritonitisa i sigurne smrti bolesnika. Smatra se da je prvu operaciju neoplazme rektuma izveo Faget 1739. godine, kada je načinio perinealnu eksiciju karcinoma rektuma. Paul Kraske uradio je transsakralni pristup 1885. godine, što je obuhvatalo eksiciju kokcigealne kosti i sakruma, i formiranje sakralnog anusa<sup>31</sup>.

U prvim godinama XX vijeka Lockhart-Mummery napravio je proširenu perinealnu eksiciju kod tumora rektuma. Glavni nedostatak ove operacije bio je u nedovoljnom uklanjanju tkiva iz područja limfne drenaže<sup>32</sup>.

Prvu radikalnu operaciju obavio je Czerny, kada je 1883. godine izveo prvu operaciju niskog karcinoma rektuma sa dva pristupa. Engleski hirurg Miles usavršio je ovu operaciju, koja veoma ubrzo postaje operacija izbora u liječenju niskih karcinoma rektuma<sup>20</sup>.

Godine 1921. francuski hirurg Anri Hartman izveo je operaciju resekcije rektuma kod karcinoma gornje i srednje trećine rektuma, bez kreiranja anastomoze, uz formiranje terminalne kolostome.

Claude Dixon, američki hirurg, uradio je prednju gornju resekciju rektuma, koja je po njemu dobila naziv – Operacija po Dixon-u. Ova operacija bila je osnova za kasnije izvođenje niskih sfinkter prezervirajućih resekcija rektuma<sup>33</sup>.

Ser Alan Parks dao je veliki doprinos u razvoju kolorektalne hirurgije, jer je razvio veliki broj novih instrumenata, a istovremeno je uveo i brojne nove hirurške tehnike. Ser Parks je razvio i usavršio i tehniku koloanalne i ileoanalne anastomoze. Zahvaljujući razvoju novih hirurških tehnika i medicinske opreme, kao i sve većem broju pacijenata, usavršena je tehnika prednje niske resekcije rektuma, i to primjenom staplerske anastomoze sa mogućnošću kreiranja izrazito niske anastomoze.

Mnogi danas smatraju da je začetnik staplerske tehnike bio mađarski hirurg Himer Hilt, koji je početkom XX vijeka konstruisao svoj staplerski aparat i postavio osnovne principe mehaničkog šava u hirurgiji. Ovaj instrument koristio je u operaciji želuca. Dalji doprinos unapređenju staplerske tehnike dali su ruski hirurzi pedesetih godina XX vijeka<sup>34</sup>.

Osamdesetih godina prošloga vijeka Heald je uveo i razvio tehniku totalne mezorektalne ekscizije (TME), koja je doprinijela poboljšanju rezultata hirurškog liječenja u pogledu smanjenja lokalnog recidiva i u povećavanju petogodišnjeg preživljavanja<sup>35</sup>. Veoma je važno da se kod resekcije rektuma učini i prezervacija hipogastričnih nerava. Ovim operativnim postupkom značajno se smanjuje postotak pacijenata sa urinarnom i seksualnom disfunkcijom.

#### 1.5.1. Hiruruško liječenje rektalnog tumora

Operativno liječenje kolorektalnog karcinoma glavni je i najvažniji model liječenja koje omogućuje duže i kvalitetnije preživljavanje. Međutim samo liječenje ipak je veoma kompleksno i ono predstavlja kombinovanu primjenu hirurgije, radioterapije i hemoterapije, i to danas predstavlja zlatni standard u liječenju kolorektalnog karcinoma<sup>36</sup>.

U hirurškom liječenju karcinoma rektuma postoji nekoliko ciljeva: liječenje osnovnog oboljenja, očuvanje seksualne funkcije i funkcije mokraćne bešike, te prezervacija sfinktera<sup>37</sup>.

Za ostvarivanje ovih ciljeva primjenjuje se minuciozna hiruška tehnika, poštovanje planova disekcije i kreiranje rizične niske anastomoze. Radikalna operacija karcinoma rektuma može se izvesti na tri načina: prednjom resekcijom, abdominoperinealnom resekcijom i Hartmanovom procedurom. Veoma je važno obaviti adekvatnu dijagnostiku, čime se dobija veliki broj informacija i čime se olakšava proces donošenja odluka o operativnom tretmanu<sup>38</sup>.

### 1.5.2. Neoadjuvantna radiohemoterapija

Iako je hirurško liječenje primarno u tretmanu karcinoma rektuma, važnu ulogu, naročito u uznapredovalim stadijumima bolesti, ima neoadjuvantna radiohemoterapija. Prvi put ova terapija karcinoma rektuma primijenjena je 1914. godine. Hemoterapija i radioterapija veoma su važne u liječenju karcinoma rektuma i mogu se primjenjivati kao posebne mjere ili kao kombinovana terapija (multimodalno liječenje) prije ili poslije hirurškog zahvata. Ranije su hemoterapija i radioterapija posmatrane posebno, ali se danas najčešće govori o kombinovanoj radiohemoterapiji (RHT), jer se kod najvećeg broja novih protokola za liječenje karcinoma rektuma podrazumijeva kombinacija ova dva oblika u okviru neoadjuvantne ili adjuvantne terapije<sup>39</sup>.

Najčešće se primenjuju dva protokola preoperativnog zračenja bolesnika sa karcinomom rektuma:

1. kratkotrajna (*short course*), koja podrazumijeva pet frakcija po 5 Gy, ukupno 25 Gy (hirurški zahvat slijedi nekoliko dana po završenom zračenju ili nakon nekoliko nedjelja);
2. dugotrajna konvencionalna (*long course*), koja podrazumijeva 1,8–2 Gy u 25 frakcija do ukupne doze od 45–50 Gy. Operativni zahvat slijedi najčešće od osam do 12 nedjelja nakon završetka zračenja.

U posljednje vrijeme neoadjuvantna radiohemoterapija postala je standard u terapiji karcinoma rektuma, tako da je kombinacija neoadjuvantne radiohemoterapije sa TME dovela do značajnog poboljšanja u pogledu lokalne kontrole bolesti. Ipak je utvrđeno da primjena neoadjuvantne radiohemoterapije nije uvijek vodila do većeg postotka preživljavanja pacijenata<sup>40</sup>.

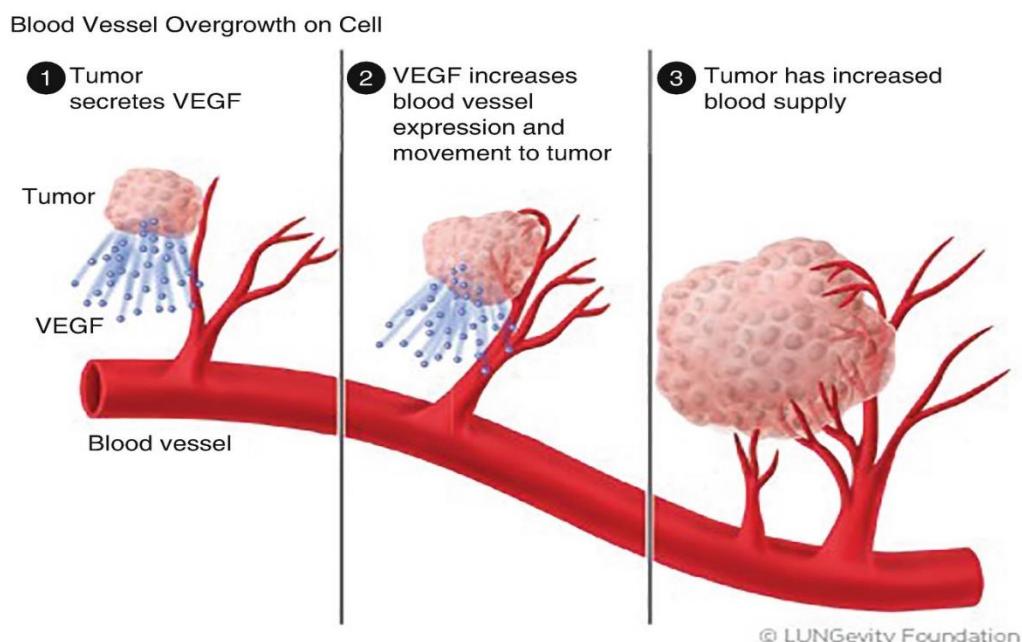
Takođe je utvrđeno da kod pacijenata, poslije neoadjuvantne radiohemoterapije, može doći do značajnog povećanja rizika za nastanak funkcionalnih poremećaja kao što su enteritisi, opstipacije<sup>41</sup>. Brojna ispitivanja takođe su pokazala da nije postojala razlika u onkološkim rezultatima (prevodenje tumora u operabilno stanje, vrijeme preživljavanja) u odnosu na ova dva modela preoperativne radioterapije, koji su primjenjeni kod bolesnika sa karcinomom rektuma<sup>42</sup>. Nakon primjene neoadjuvantne RHT može klinički doći do potpunog odgovora tumora u 10–40% slučajeva, a klinička procjena odgovora na terapiju vrši se nakon 12 nedjelja od početka RHT. Vjerovatnoća postizanja kompletног kliničког odgovora zavisi u velikoj mjeri od inicijalnog stadijuma tumora i molekularnih faktora, a koji do sada nisu u potpunosti razjašnjeni. Klinički kompletan odgovor nije uvijek u korelaciji sa patološki kompletним odgovorom na terapiju, što otežava donošenje odluke o daljem liječenju ovih pacijenata<sup>43</sup>. Prema svjetskim smjernicama, ali i lokalno usvojenim protokolima, kao hemoterapija kombinovano se koristi 5-fluorouracil (5-FU) u kontinuiranoj infuziji tokom 4–6 ciklusa. Dok se u toku trećeg i četvrtog ciklusa primjenjuje radioterapija sa dozom od 50 Gy<sup>44</sup>.

#### 1.6. Molekularni marker kod tumora rektuma

U posljednje vrijeme individualno praćenje pacijenata oboljelih od karcinoma rektuma na osnovu prediktivnih i prognostičkih faktora sve se više primjenjuje. Pomoću molekularnih markera može se utvrditi ponašanje tumora, a mogu biti i prediktivni faktori relapsa bolesti, kao i nastanka postoperativnih komplikacija. Postoje brojni molekularni markeri i oni se obično analiziraju sa bioptiranog materijala prije započetog liječenja<sup>45</sup>. Jedni od takvih molekularnih markera jesu vaskularni endotelni faktor rasta (*Vascular endothelial growth factor*), te matriks metaloproteoinaze (*Matrix-metaloproteinase*) 2 i 9. VEGF je signalni protein koji podstiče rast novih krvnih sudova, a takođe ima i važnu ulogu u angiogenezi, limfogenezi i vaskulogenezi. VEGF obuhvata pet članova, i to VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i faktor rasta placente (*Placental growth factor*)<sup>46,47</sup>. VEGF kao glikoprotein ima centralnu ulogu u angiogenezi i podstiče druge proangiogenetske faktore. Receptori VEGF su tirozin-kinaza receptori i oni se

nalaze na površini vaskularnih endotelnih ćelija, te na endotelnim ćelijama limfnih sudova. VEGF je važan za preživljavanje tumorskih ćelija i za formiranje tumorskih krvnih sudova<sup>48</sup>.

Prisutan je u velikom broju tumora, jer je za rast tumora potreban veliki broj novih krvnih sudova. Angiogenezu VEGF stimuliše na dva načina, i to tako što stimuliše stvaranje novih krvnih sudova i tako što stimuliše hiperpermeabilnost i ekstravazaciju proteina u ekstracelularni prostor<sup>49</sup>. Ispitivanja su pokazala da kod pacijenata sa karcinomom rektuma i sa metastazama u jetri postoje izražena ekspresija VEGF, koja je značajno veća nego kod pacijenata kod kojih nema prisustva metastaza<sup>50,51</sup>. Što je veća ekspresija VEGF, to je lošija prognoza tumora i manje preživljavanje pacijenata u odnosu na pacijente sa tumorima bez VEGF ekspresije ili sa niskom ekspresijom (Slika 7).



Slika: 7. Proc. Nati Acad Sci USA 2002

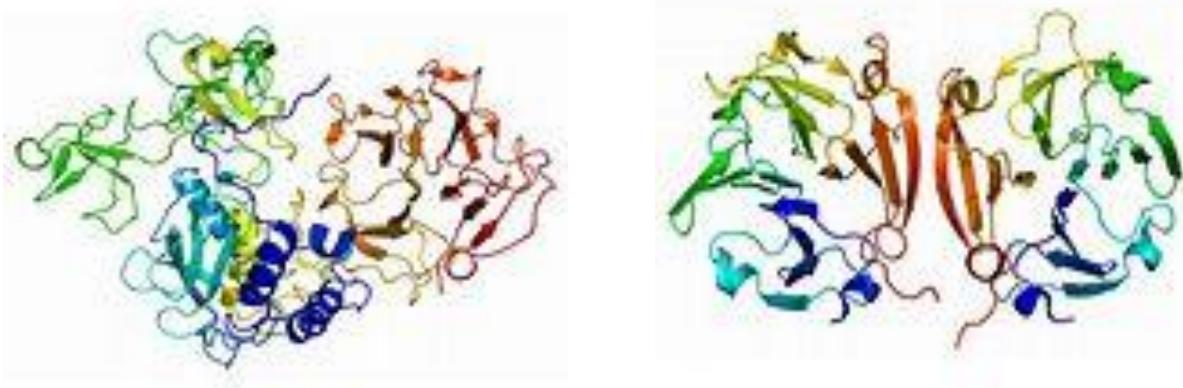
Studije su pokazale da je povećana ekspresija VEGF izazvana tumorskom hipoksijom i nekrozom, te onkogenskom ekspresijom<sup>52,53</sup>. Dokazano je i da se blokiranjem ili inhibicijom

VEGF može dovesti do blokiranja rasta kolorektalnog karcinoma<sup>54</sup>. Lijekovi koji se koriste jesu bevacizmab, cebecitabin, te 5\_FU.

MMP spadaju u porodicu endopeptidaza koje su zavisne o cinku, a koje su odgovorne za fiziološko i patofiziološko remodeliranje tkiva<sup>55</sup>. MMP su glavni enzimi koji su odgovorni za kolagen i drugu razgradnju proteina u vanćelijskom matriksu. Tipične MMP sastoje se od propeptida od oko 80 amimokiselina, dok katalitičke metaloproteinaze imaju i oko 170 aminokiselina. MMP se dijele na membranski tip matriks metaloproteinaze, kolagenaze, želatine, stromelizine i metralizine<sup>56,57</sup>.

Membranski tip matriks metaloproteinaze čine MMP14, MMP15, MMP16 i MMP24; kolagenaze obuhvataju MMP1, MMP8, MMP13 i MMP18; želatine su MMP2, MMP9; stromelizine su MMP3, MMP10 i MMP11 i metrilizine obuhvataju MMP7 i MMP26. Kolagenaze razgrađuju helikalni fibrilarni kolagen, koji je temelj kostiju i ligamenata. Želatini utiču na različite ćelijske funkcije, uključujući angiogenezu i neurogenezu<sup>58</sup>. Oni mogu mijenjati molekule bazalnih membrana i na taj način dovesti do smrti ćelija. MMP, takođe, cijepaju sve strukturne elemente izvanćelijskog matriksa i obrađuju različite supstrate koji nisu elementi izvanćelijskog matriksa<sup>59,60</sup>. MMP imaju i kolagenolitičko djelovanje i mogu aktivirati neke proteaze i druge elemente sa površine ćelije (Slika 7). Smatra se da tumorske ćelije izazivaju prekomjernu ekspresijuenzimske aktivnosti proteasa, što onda dovodi do povećane aktivnosti enzima u okolnim stromalnim ćelijama, te tako izazivaju razgradnju bazalne membrane i invaziju okolnog tkiva<sup>61,62</sup>.

Danas postoji 25 različitih vrsta MMP, od čega su kod ljudi pronađene 22 vrste<sup>63,64</sup>. Povećana aktivnost MMP, kao i njihova povećana ekspresija, dokazane su kod mnogih tumora, kao što su tumori pluća, tumori pankreasa, tumori rektuma, tumori jajnika i tumori mozga.



*Matriks metaloproteinaze 2*

*Matrix metaloproteinaze 9*

*Slika 8: Molekularni prikaz Matriks metaloproteinaza (Acta Crystallogr D Biol Crystalogr. 2004)*

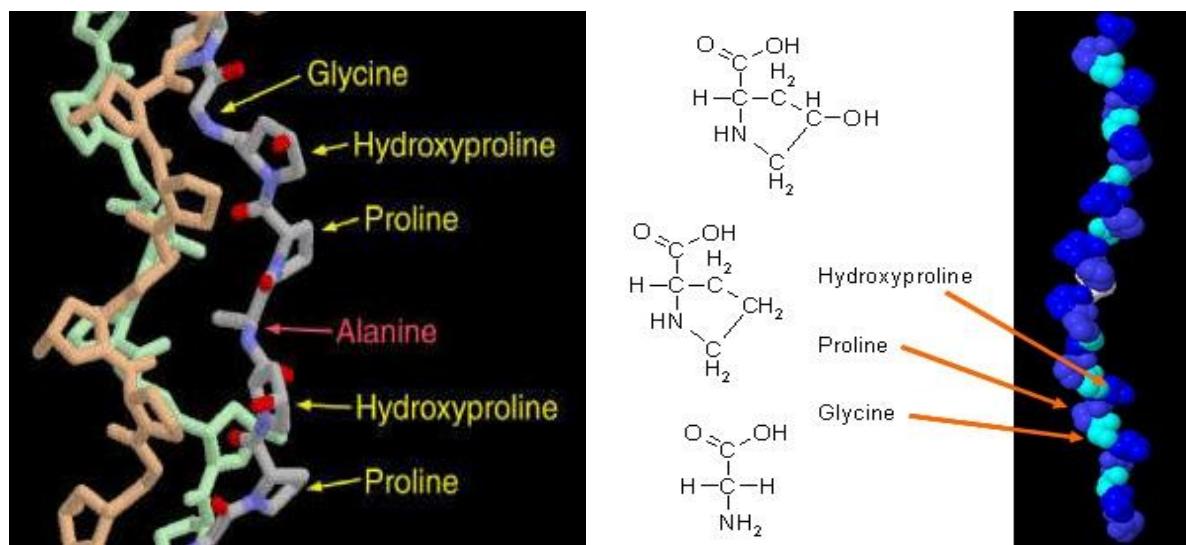
Takođe je utvrđeno i postojanje korelacije MMP sa agresivnošću tumora i sa njihovim zločudnim potencijalom. Imunohistohemiskim analizama utvrđeno je da je MMP izrazito pozitivan u ćelijama karcinoma kolona i rektuma, te da postoji povezanost nivoa MMP sa patohistološkom veličinom i progresijom kolorektalnog karcinoma<sup>65,66</sup>. MMP se mogu inhibirati specifičnim inhibitorima endogenog tkiva metaloproteinaza (TIMP) koje čini porodica od četiri inhibitora proteaze<sup>67</sup>.

#### 1.7. Anastomoza u hirurgiji rektuma i njeno zarastanje

Kolorektalna anastomoza veoma je specifična procedura u digestivnoj hirurgiji, kako u formiranju, zarastanju anastomoze, tako i u nastanku komplikacija.

Riječ anastomoza grčkog je porijekla i originalno ima značenje „otvor ili spoj“. Zarastanje anastomoze složen je mehanizam i ono zavisi od brojnih, međusobno povezanih, faktora.

Procesi koji utiču na zarastanje jesu sljedeći: biohemski, biomehanički i histomorfološki. Glavna gradivna jedinica svake anastomoze jeste kolagen, koji čini 25% svih tjelesnih proteina i koji predstavlja osnovu biohemskog procesa zarastanja tkiva. Osnovni sastojak kolagena jeste tropokolagen, i on je sastavljen od tri peptidna lanca<sup>68</sup>. Hidroksiprolin jeste aminokiselina koja se nalazi jedino u kolagenu, a u drugim proteinima nije prisutna u značajnijoj količini (Slika 9). Stvaranje kolagena odvija se od strane fibroblasta u submukozi zida crijeva, u kojoj se nalazi u količini 2–7%. Zbog svega toga submukoza je sloj crijevnog zida, koji je veoma značajan za zarastanje anastomoze. Metabolizam kolagena na samoj anastomozni u stalnoj je ravnoteži između razgradnje starog i sinteze novog kolagena<sup>69</sup>.



Slika 9: Molekularna struktura kolagena (preuzeto iz: Klinička biohemija 2010)

U prvim danima u predjelu anastomoze razgrađuju se stara kolagena vlakna pod dejstvom specifičnog proteolitičkog enzima kolagenaze. Tako dolazi do smanjenja koncentracije kolagena u zoni anastomoze.

Zbog svih ovih dešavanja za integritet anastomoze u ovom periodu odgovorni su hirurški šavovi, fibrinske naslage, te adhezivna reakcija peritoneuma ili velikog omentuma. U daljem periodu dolazi do povećanog stvaranja i ugradnje mladog kolagena, tako da poslije pada u prvim danima dolazi do rasta koncentracije kolagena.

Sedmog postoperativnog dana koncentracija kolagena nalazi se na nivou ili je čak i veća od preoperativne, a novosintetisani kolagen ugrađuje se u anastomozu, te postepeno preuzima ulogu šavnog materijala<sup>70,71</sup>.

Veoma bitan faktor, koji ima ulogu u nastanku dehiscencije kolorektalne anastomose, jeste taj da se u zidu rektuma nalazi najveća koncentracija kolagenaze, fermenta koji izaziva razgradnju kolagena. Utvrđeno je da operacije na kolorektumu, zasad nepoznatim mehanizmom, dovode do pojačane produkcije kolagenaze u svim dijelovima digestivnog trata, a naročito u predjelu anastomoze.

Potpuni oporavak crijevnog zida poslije operativnog zahvata završava poslije šest mjeseci, ali anastomoza je formirana i reintegrисана već poslije 14 dana<sup>69,72</sup>.

Na crijevo kao cijev djeluju dvije sile – po uzdužnoj osovini (sile rastezanja) i u radijalnom smjeru (sile prskanja). Utvrđeno je da je otpornost anastomoze na sile rastezanja i sile prskanja već nakon nedjelju dana poslije operativnog zahvata dostigla nivo neoperisanog crijeva. Brojne su studije dokazale da dvije nedjelje poslije operativnog zahvata, pri opterećenju češće dolazi do prskanja na crijeva na mjestu udaljenom od anastomoze, dok sama anastomoza ostaje intaktna<sup>69</sup>.

### 1.7.1. Faktori odgovorni za zarastanje kolorektalne anastomoze

Za zarastanje kolorektalne anastomoze odgovorni su mnogobrojni faktori koji se mogu podijeliti na: sistemske, lokalne i tehničke faktore.

#### **Sistemski faktori koji utiču na zarastanje anastomoze jesu sljedeći:**

- životna dob, metabolički poremećaji, ishrana bolesnika, prateće bolesti;
- preoperativna radioterapija, hemoterapija, terapija kortikosteroidima.

#### **Lokalni faktori koji utiču na zarastanje anastomoze jesu:**

- poremećaj vaskularizacije debelog crijeva;
- neadekvatna priprema kolona;
- infekcija i stanje šoka tokom operacije;
- hipoksija i hipovolemija.

#### **Hirurški faktori koji utiču na zarastanje anastomoze jesu sljedeći:**

- visina anastomoze;
- neadekvatna hirurška tehnika.

Na zarastanje anastomoze u starijoj životnoj dobi prije svega utiču aterosklerotske promjene, hipoproteinemije, hipovitaminoze i anemije<sup>73</sup>.

Sve ovo kod starije populacije dovodi do češće pojave dehiscencije anastomoze, sa većim morbiditetom i mortalitetom<sup>74</sup>.

Veličina tumora veća od pet centimetara, kao i lokalizacije tumora (kada se nalazi manje od šest centimetara od anokutane linije) važni su faktori rizika za popuštanje anastomoze sa komplikacijama i posljedicama<sup>75</sup>.

Dijabetes melitus takođe utiče na zarastanje anastomoze zbog poremećaja mikrovaskularne perfuzije i zbog metaboličkih promjena vezanih za hiperglikemiju<sup>76,78</sup>.

Kod pacijenata sa hipoproteinemijom i hipovitaminozom takođe postoji problem zarastanja anastomoze<sup>73</sup>.

Zbog nedovoljnog unošenja proteina u organizam, te povećanog katabolizma proteina kod malignih bolesti, dolazi do smanjenja koncentracije plazma proteina i to dovodi do veće šanse za nastanak dehiscencije anastomoze<sup>79,80</sup>.

Na zarastanje ansatomoza značajno utiče nedostatak vitamina C i cinka. Za zarastanje anastomoze potrebno je dnevno unošenje vitamina C između 500-1000mg, jer je vitamin C odgovoran za sintezu kolagena<sup>73</sup>.

Dugotrajna upotreba kortikosteroida utiče na zarastanje anastomoze, i izaziva endokrine i metaboličke neželjene reakcije tipa jatrogene hiperglikemije, poremećaja metabolizma i distribucije masti, kataboličkog efekta na mišićno, limfno i vezivno tkivo, odnosno kolagen<sup>81,82</sup>.

Od lokalnih faktora poseban uticaj na zarastanje anastomoza ima hipoksija i hipovolemija.

Kiseonik je potreban pri hidroksilaciji lizina i prolina u sintezi kolagena, a dokazano je da nivo kolagena raste proporcionalno nivou pO<sub>2</sub>.

Smanjenje viskoznosti krvi hemodilucijom ili perfuzionim lijekovima može poboljšati mikrocirkulacioni protok u crijevima i doprinijeti zarastanju anastomoze. Velika operativna trauma zbog hipovolemije i hipoksije dovode do smanjenja koncentracije kolagena, a samim tim i do otežanog zarastanja anastomoze. Kolon i rektum posebno su osjetljivi na promjenu volumena krvi, tako da redukcija volumena krvi od samo 10% smanjuje perfuziju za 30%. Gubitak volumena krvi direktno će se odraziti na intraluminalnu cirkulaciju, tako da poremećaji volumena značajno ugrožavaju anastomozu<sup>83,84,85</sup>.

Adekvatna priprema kolona takođe je veoma važna za zarastanje anastomoze, jer to dovodi do smanjenja bakterijske kontaminacije i smanjenja intraluminalnog pritiska i prateće ishemije.

Tehnički faktori često su veoma važni za zarastanje anastomoze. Operativne tehnike razlikuju se od hirurga do hirurga, ali svaka operativna tehnika mora ispoštovati osnovne postulate kao što su: adekvatna prokrvljenost anastomoze, smanjenje tenzije na liniji anastomoze, hermetizacija anastomoze, uklanjanje opstrukcije distalno od anastomoze, te atraumatski rad sa tkivima<sup>86,87,88,89,90</sup>.

Dobra prokrvljenost anastomoze postiže se očuvanjem magistralnih krvnih sudova, kao i osiguravanjem dobre perfuzije intramuralnih krvnih sudova na ivici resekcije.

Hermetizacija anastomoze postiže se plasiranjem šava na rastojanju 3–5 mm. Gušće plasiranje šavova može da traumatizuje tkivo i da ugrozi vaskularizaciju anastomoze, a neće bitno poboljšati hermetizaciju. Pojedinačni šavovi manje traumatizuju tkivo, a najbolje rezultate ima primjena spororesorptivnih šavnih materijala (Vicryl-Johnson & Johnson Medical Ltd, United Kingdom; PDS – Bobigny Cedex France). Takođe, treba izbjegavati jako zatezanje šavova. Radi poboljšanja hermetizacije i zarastanja anastomoze pojedini hirurzi koristili su fibrinsko ljepilo, ali se pokazalo da to nije dovelo do poboljšanja rezultata u zarastanju anastomoza<sup>91,92</sup>.

Tenzija u predjelu anstomoze mora se izbjjeći, jer ugrožava normalan krvotok anastomoze, onemogućuje hermetizaciju i može izazvati rupturu anastomoze. To se prije svega može postići adekvatnim oslobođanjem poprečnog i silaznog kolona, te lijeve fleksure, visokim podvezivanjem donje mezenterične arterije, podvezivanjem donje mezenterične vene uz donji rub pankreasa, kao i oslobođanjem velikog omentuma<sup>93–96</sup>.

ASA skor jeste klasifikacija fiziološkog statusa koji kliničaru omogućuje procjenu statusa pacijenta kako bi se predudio operativni rizik. Bolesnici sa ASA skorom većim od tri imaju veći komorbiditet, pa i povećan rizik za dehiscenciju anastomoze. Sa svakim stepenom povećanja ASA skora, učestalost dehiscencije kolorektalne anastomoze povećava se za 2,5 puta<sup>97</sup>.

### 1.7.2. Preventivne mjere dehiscencije kolorektalne anastomoze

Dehiscencija anastomoze predstavlja jednu od najznačajnijih i potencijalno najopasnijih komplikacija u kolorektalnoj hirurgiji, jer ugrožava život pacijenata, a često zahtijeva hitnu hiruršku intervenciju, što je praćeno produženim i skupljim liječenjem. Grupa autora (*International study group of Rectal Cancer*) postavila je definiciju dehiscencije anastomoze po kojoj: „Dehiscencija anastomoze je defekat crijevnog zida, uključujući šavnu ili staplersku liniju neorektalnog rezervoara, što dovodi do komunikacije između intra i ekstra luminalnog prostora“<sup>98,99</sup>.

Pored dehiscencije, značajne anastomotske komplikacije još su i krvarenje i stenoza anastomoze.

Kliničke manifestacije dehiscencije anastomoze najčešće se manifestuju između petog i sedmog postoperativnog dana<sup>100,101</sup>.

Rane dehiscencije nastaju unutar 48 sati i imaju ozbiljne posljedice, a manifestuju se znacima sepse, leukocitozom, povišenom temperaturom, defansom, tahikardijom, paralitičkim ileusom i na kraju septičkim šokom. U pojedinim slučajevima dehiscencija anastomoze nije praćena abdominalnom simptomalogijom, već su prisutni samo leukocitoza i febrilnost.

Težina i ozbiljnost dehiscencije stepenuje se na nekoliko stadijuma:

- stepen A dehiscencije koji ne zahtijeva izmjenu liječenja bolesnika;
- stepen B dehiscencije, gdje je potreban aktivni terapeutski pristup, ali se problem rješava bez laparotomije;
- stepen C dehiscencije, čije se liječenje ne može uspješno riješiti bez laparotomije.

Klinički evidentna dehiscencija kreće se u intervalu 2,2–20% i može se manifestovati na više načina: pelvična sepsa, lokalizovani i difuzni peritonitis, sterkoralna fistula, rektovaginalna fistula i hronični presakralni apses i sinus<sup>102,103</sup>. Pelvična sepsa nastaje nakon parcijalne

dehiscencije anastomoze i manifestuje se pogoršanjem opšteg stanja, ali bez znakova peritonitisa. Sanira se spontano ili na produženu antibiotsku terapiju. Lokalizovani peritonitis posljedica je nesmirivanja pelvične sepse sa daljim pogoršanjem opšteg stanja i s ograničenom peritonealnom reakcijom<sup>104,105</sup>. Sterkoralna fistula posljedica je probijanja gnojnog i fekalnog sadržaja na kožu na mjestu drena, operativnu ranu ili vaginu, ili formiranja hroničnog presakralnog sinusa<sup>106</sup>. Fistula se javlja u oko 5% slučajeva u fazi smirivanja lokalizovanog peritonitisa. Karakteriše se održavanjem dobrog opšteg stanja bolesnika i spontanog zarastanja ako je očuvana prolaznost anastomoze i distalnog dijela rektuma.

Difuzni peritonitis posljedica je rane totalne dehiscencije i manifestuje se razvojem septičnog šoka, što zahtijeva intenzivne mjere reanimacije i hitnu relaparotomiju<sup>107,108</sup>.

Dijagnoza dehiscencije postavlja se na osnovu digitorektalnog pregleda kod niskih anastomoza endoskopski, kompjuterizovanom tomografijom (KT) ili magnetnom rezonanciom (NMR) abdomena i male karlice. Kada je u pitanju radiološko dokazivanje dehiscencije, svakako treba imati na umu i dosta lažno negativnih nalaza (50%), kao i lažno pozitvnih nalaza (8%), posebno kada su u pitanju male dehiscencije. Zato je prilikom donošenja odluke o liječenju uvijek neophodno kombinovati klinički, laboratorijski nalaz sa radiološkim nalazom<sup>109</sup>.

U slučaju kada se javi difuzni peritonitis indikovana je hitna relaparotomija, jer pretjerano odlaganje operativnog zahvata može dovesti do porasta mortaliteta i do 22%. Poslije obimne toalete trbušne duplje, u slučaju manje dehiscencije, učini se derivantna ileostomija ili kolostomija, ako već ranije nije učinjena, uz dobru redrenažu. Pojedini autori smatraju da svaka klinički jasna dehiscencija sa peritonealnim nadražajem zahtijeva urgentnu relaparotomiju i da ne treba gubiti vrijeme dijagnostikom, koja može zavarati i samo odložiti odluku o reoperaciji<sup>110</sup>. Ako je dehiscencija anastomoze posljedica ishemije i nekroze ili ako je nastupila dehiscencija preko polovine cirkumferencije, mora se primjeniti Hartmanova procedura<sup>111</sup>.

Učestalost dehiscencije može se značajno smanjiti primjenom određenih preoperativnih, intraoperativnih i postoperativnih postupaka.

Preoperativna prevencija obuhvata sistem mjera koje djeluju na sistemske i lokalne faktore u cilju poboljšanja zarastanja anastomoze. Opšta priprema bolesnika ima zadatak da poboljša opšte stanje bolesnika i da koriguje prateća bolesna stanja koja povećavaju rizik operativnog zahvata i nastanak dehiscencije anastomoze<sup>112</sup>. Hipoproteinemija nije jednostavan problem i njena korekcija zahtijeva duži period. Lokalna priprema kolona podrazumijeva mehaničko uklanjanje fekalnih masa iz kolona i rektuma.

Time se smanjuje količina stalno prisutnih aerobnih i anaerobnih bakterija, kao i pritisak na mjestu novoformirane anastomoze. Mehaničko čišćenje vrši se primjenom laksativnih sredstava i klizmi, te ortogradnom lavažom. Danas postoje brojna sredstva koja služe za čišćenje crijeva i pripremu bolesnika za operaciju<sup>113–115</sup>. Pored čišćenja crijeva pacijentu se propisuje i antibiotska terapija, i to najčešće primjena metronidazola u kombinaciji sa cefalosporinima III generacije<sup>116,117</sup>.

Intraoperativne mjere prevencije predstavljaju najvažnije mjere za sprečavanje nastanka dehiscencije anastomoze.

Intraoperativne mjere prevencije podrazumijevaju dobar položaj bolesnika, sigurnu anesteziju, adekvatan operativni pristup i širinu operativnog polja. Bitan je i izbor adekvatne incizije, čime se omogućuje dobra preglednost u toku operativnog zahvata. Danas se smatra da totalna medijalna laparatomija obezbjeđuje najbolji pristup i najbolju preglednost. Pažljiva i nježna manipulacija tkivom, kao i aseptičan rad, takođe su važni za prevenciju dehiscencije anastomoze. Resecirani okrajci crijeva moraju biti dovoljno prokrvljeni, a sama anastomoza bez tenzije. Anastomoza se može kreirati ručno ili, kako je danas češće, pomoću mehaničkog šivača (staplera).

Kod ručnog kreiranja kolorektalne anastomoze smatra se da najbolje rezultate imaju resorptivni konci (Vicryl-Johnson & Johnson Medical Ltd, United Kingdom; PDS – Bobigny Cedex France). Razmak između šavova treba da se kreće između tri i pet milimetara, a sami se šavovi ne smiju previše pritezati, kako bi se spriječila ishemija i nekroza u predjelu anastomoze<sup>118</sup>.

Primjena staplera ubrzala je i olakšala kreiranje anastomoza, ali nema dokaza da je primjena staplera značajno poboljšala zarastanje anastomoza<sup>119</sup>.

Sigurnost anastomoze intraoperativno se provjerava pregledom resekcionalih prestenova, čiji tkivni kontinuitet mora biti očuvan.

Dugo trajanje operacije i anestezije takođe su faktor rizika za zarastanje anastomoze. Brojna su ispitivanja pokazala da trajanje operacije duže od tri sata nosi rizik za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze<sup>120,121</sup>.

Intraoperativna lavaža kolona važna je mjera prevencije dehisencije i ona se primjenjuje kada nije adekvatno urađeno preoperativno mehaničko čišćenje kolona ili u akutnim stanjima kada nije bilo uslova, ni vremena da se ono uopšte provede. Primjena protektivne ileostome ili kolostome ne može spriječiti pojavu dehiscencije, ali mnogo veći značaj ima u sprečavanju pogoršavanja komplikacija dehiscencije, jer sprečava da od parcijalne dehiscencije nastupi kompletna dehiscencija anastomoze<sup>122,123</sup>.

Od ostalih intraoperativnih mjera prevencije značajne su: primjena nazogastrične sonde, koja sprečava crijevnu distenziju, te adekvatno zatvaranje operativne incizije po anatomske slojevima uz adekvatnu hemostazu. Ipak, efekat primjene nazogastrične sonde danas je pod znakom pitanja<sup>124</sup>.

Postoperativne mjere prevencije podrazumijevaju profilaksu plućnih komplikacija i infarkta miokarda. Sprovode se primjenom kiseonika, adekvatnom hidratacijom bolesnika, te održavanjem adekvatnog volumena krvi. Prevencija tromboze krvnih sudova donjih ekstremiteta i male karlice provodi se primjenom niskomolekularnih heparina i mehaničkim mjerama prevencije<sup>125</sup>.

Učestalost plućne embolije kod bolesnika sa dubokom venskom trombozom (DVT) varira 10–30%. Oko 10% bolesnika sa plućnom embolijom umire u prvih sat vremena. Zato je potrebno što prije početi sa mobilizacijom bolesnika, što se postiže odgovarajućom analgezijom i fizikalnom terapijom.

Danas postoje oprečni stavovi kada treba započeti sa ishranom bolesnika poslije operacije. Neki smatraju da ishranu bolesnika treba započeti u prvih 48 sati poslije operacije, dok se u najvećem broju slučajeva smatra da sa ishranom treba započeti kada bolesnik dobije stolicu, odnosno četvrtog ili petog postoperativnog dana<sup>126</sup>. Od ostalih mjera prevencije važna je regulacija glikemije kod dijabetesa melitusa, kao i sprečavanje urinarne retencije.

Primarno zarastanje anastomoze dvostruko skraćuje hospitalizaciju i tako smanjuje troškove liječenja, a istovremeno se poboljšavaju i funkcionalni rezultati (sa odličnim ishodom i do 80% slučajeva). Neposredni uticaj dehiscencije anastomoze na rani postoperativni tok ogleda se u: povećanju morbiditeta i mortaliteta uz produženje hospitalizacije, dužem boravku bolesnika u jedinici intenzivne njage, porastu troškova zbog dodatne dijagnostike, skupe terapije i novih operacija<sup>127</sup>. Dugoročni negativni efekati dehiscencije anastomoze na liječenje ogledaju se u: pogoršanju funkcionalnih rezultata i kvaliteta života operisanih pacijenata, povećanom riziku od lokalnog recidiva tumora i pogoršanju rezultata ukupnog i petogodišnjeg preživljavanja<sup>128</sup>. Pogoršanje funkcionalnih rezultata i kvaliteta života ogleda se u: povećanom broju stolica tokom dana i noći, postojanju urgencije, fragmentacije stolica, otežanom pražnjenju, nerazlikovanju stolice od vjetrova, različitim stepenima inkontinencije, itd<sup>129</sup>.

## 2. RADNE HIPOTEZE

1. Neoadjuvantna radioterapija ne utiče na češću pojavu dehiscencije i ranih komplikacija kod pacijenata kod kojih je provedena radioterapija, u odnosu na pacijente kod kojih je proveden samo hirurški tretman.
2. Neoadjuvantna radioterapija doveće do smanjenja ekspresije VEGF i MMP2 i MMP9 kod pacijenata koji će biti podvrgnuti neoadjuvantnoj radioterapiji i tako će dovesti do regresije tumora.
3. Visoka ekspresija VEGF i MMP2 i MMP9 u tumorskom tkivu i u okolnom zdravom tkivu biće u korelaciji sa većim brojem postoperativnih komplikacija kod pacijenata operisanih zbog karcinoma rektuma, kao što su dehiscencija anastomoze, enterokolitisi, pojava postoperativnog ileusa.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati učestalost pojave dehiscencije kolorektalne anastomoze i pojave drugih ranih postoperativnih komplikacija kao što su enterokolitisi i postoperativni ileus kod pacijenata operisanih zbog niske lokalizacije karcinoma rektuma, liječenih sa neoadjuvantnom radioterapijom ili bez nje.
2. Ispitati tkivnu ekspresiju vaskularnog endoteljnog faktora rasta (VEGF) i matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP2 i MMR9) u bioptiranom zidu anastomose rektuma i bioptiranom tumorskom tkivu kod pacijenata podvrgnutih operativnom liječenju karcinoma rektuma sa neoadjuvantnom radiohemoterapijom i bez nje u odnosu na pojavu dehiscencije anastomoze i drugih komplikacija.
3. Ispitati korelaciju neoadjuvantne radioterapije i ekspresije VEGF, MMP2 i MMR9 u bioptiranom zidu sluznice rektuma i bioptiranom tumorskom tkivu kod pacijenata sa karcinom rektuma u odnosu na pojavu dehiscencije anastomoze.

## 4. MATERIJALI I METODOLOGIJA

### 4.1. Odabir i uključivanje ispitanika u istraživanje

Radi se o prospektivnoj, opservacionoj studiji sa dvije kohorte i sa ukupno 60 pacijenata starosti od 50 do 75 godina, kod kojih je standardnim dijagnostičkim metodama bio endoskopski otkriven i patohistološki potvrđen adenokarcinom rektuma stadijuma T2 i T3. Istraživanje je provedeno na Klinici za opštu i abdominalnu hirurgiju i Klinici za onkologiju, u Zavodu za patologiju i Zavodu za radioterapiju Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (UKC RS) u periodu od 1. januara 2018. do 31. septembra 2021. godine, zavisno od vremena potrebnog za formiranje kohorti.

Kriterijumi za uključivanje u studiju:

- histopatološki potvrđen adenokarcinom rektuma;
- pacijenti starosne dobi od 50. do 75. godine;
- pacijenti kod kojih je izvedena radikalna operacija sa kreiranjem staplerske anastomose;
- bolesnici s ASA skorom 1–3;
- primijenjena neoadjuvantna terapija po principu dugotrajnog režima radiohemoterapije za polovinu posmatranih pacijenata.

Kriterijumi za isključivanje iz studije:

- neresktabilni tumori ili postojanje metastaza;
- pacijenti kod kojih je urađena radikalna operacija koja podrazumijeva amputaciju rektuma;
- pacijenti kod kojih je kreirana ručna anastomoza;
- tumori koji nisu histopatološki potvrđeni kao adenokarcinomi.

#### 4.2. Metodologija naučnog istraživanja

Svi pacijenti obuhvaćeni studijom bili su podijeljeni u dvije grupe.

Kohortu 1 činila su 32 pacijenata sa adenokarcinomom rektuma kod kojih se prije operativnog zahvata provodila neoadjuvantna radioterapija rektuma zahvaćenog tumorom.

Kohortu 2 činilo je 30 pacijenata sa adenokarcinomom rektuma koji su biti podvrnuti samo operativnom zahvatu, resekciji rektuma sa kolorektalnom anastomozom.

Podaci o pacijentima dobijeni su iz medicinske dokumentacije, kliničkog, radiološkog i laboratorijskog pregleda:

- medicinska dokumentacija: pol, godine, osnovna bolest, komorbiditeti, stadijum tumora, lijekovi koje trenutno koriste;
- patohistološki nalaz: vrsta tumora, stadijum tumora, širenje kroz slojeve zida kolona, širenje na limfne čvorove i okolno tkivo;
- laboratorijski nalazi: hematološke i biohemijске analize.

Svim pacijentima preoperativno je urađen klinički pregled, a potom endoskopski pregled sa biopsijom i patohistološkom verifikacijom uzorka. Kod svih pacijenata kojima je planirana neoadjuvantna radiohemoterapija, kao i onima kojima je planiran operativni zahvat iz bioptata tumora i okolnog zdravog tkiva zida debelog crijeva, rađena je patohistološka analiza i ekspresija VEGF, te MMP2 i MMP9. Svim pacijentima urađeni su laboratorijski i biohemijski nalazi, nalazi tumorskih markera (Ca 19-9, AFP, CEA), a potom KT abdomena i male karlice.

Svi pacijenti sa potvrđenim karcinomom rektuma pregledani su od strane onkologa i potom upućeni na onkološki konzilijum za maligne bolesti digestivnog trakta, gdje su doneseni modaliteti o daljem liječenju.

Pacijenti kojima je određeno hirurško liječenje pregledani su od strane anesteziologa, te im je određen ASA skor (*American Society Anesthesiologists*) i data im je saglasnost za operativni zahvat.

Pacijenti kojima je određena neoadjuvantna terapija ona se provodila po tipu dugotrajnog režima radiohemoterapije, a potom se od šest do osam nedjelja nakon provedene terapije obavljala hirurška intervencija.

#### 4.3. Hirurški tretman i postoperativno praćenje pacijenata

Pacijenti kojima nije određena neoadjuvantna terapija upućeni su na hirurško liječenje. Pacijenti su primani u bolnicu dva dana prije operativnog zahavata radi preoperativne pripreme, kao i zbog adekvatnog čišćenja crijeva. Po prijemu svim pacijentima se daje profilaktička antibiotska terapija metronidazola 500 mg na osam sati, te dan prije operacije vrši se mehaničko čišćenje crijeva primjenom laksativa Kolopur preparata, koji se primjenjuje u dvije doze. Veče prije operativnog zahavata svi pacijenti dobijaju dozu niskomolekularnog heparina subkutano kao prevencija tromboembolijskih komplikacija. Neposredno preoperativno daje se cefazolin u dozi od jednog grama parenteralno kao profilaktička terapija. Svi su pacijenti operisani u opštoj endotrahealnoj anesteziji u elektivnom operativnom programu. Pacijent se na operativnom stolu postavlja u standardni Lloyd-Davies položaj sa blago savijenim koljenima i kukovima. Nakon pranja i pokrivanja operativnog polja, učini se gornja i donja medijalna laparatomija, te se učini eksploracija trbušne duplje radi identifikacije tumorske promjene i eventualne diseminacije osnovne bolesti. Nakon eksploracije trbušne duplje učini se mobilizacija sigmoidnog kolona, pri čemu se čuvaju krvni sudovi i ureteri. Potom se učini incizija peritoneuma, koja se nastavlja proksimalno sve do korijena donjih mezeneričnih krvnih sudova, koji se potom ligiraju i reseciraju. Odredi se mjesto resekcije sigmoidnog kolona, te se isti resecira, a potom se prelazi u fazu totalne mezorektalne ekscizije, koja se radi kod tumora srednje i donje trećine rektuma.

Presječeni sigmoidni kolon zategne se prema naprijed, te se tako prikaže zadnji zid mezorektalne fascije, a potom se pristupi ošrom odvajanju endorekalne od presakralne fascije.

Tako se pristupa avaskularnom sloju, koje se na kraju završava presjecanjem Waldeyer-ove fascije i prikazivanjem mišića pelvičnog dna.

Nakon toga pristupa se disekciji lateralnih zidova rektuma uz prezervaciju pelvičnih i hipogastričnih nerava, te uretera. Takođe, prilikom disekcije lateralnih zidova potrebno je zbrinuti srednju rektalnu arteriju, koja se nalazi u ovoj regiji. Završna disekcija radi se na prednjem zidu, što predstavlja najteži dio disekcije. Kod žena identificuje se zadnji zid vagine, a kod muškaraca disekcija se radi duž sjemenih kesica. Disekcijom se prati Denonviller-ova fascija i ona se presjeca u svojoj donjoj trećini. Nakon što se učini totalna mezorektalna ekscizija i identificuje tumor, resekcija se učini 1–2 cm distalno uz pomoć linearнog staplera, a terminalno-terminalna anastomoza učini se uz pomoć cirkularнog staplera. Kontrola anastomoze vrši se uz pomoć resekcijskih prstenova, te vodenom probom, kojom se u malu karlicu naspe fiziološka otopina, te se kroz rectum, uz pomoć šprice, insuflira vazduh. U slučaju prisustva mjeđuhurića vazduha značilo bi pozitivnu probu i neadekvatno kreiranu anastomozu.

Po završetku operativnog zahvata pacijenti su premješteni u sobu za reanimaciju, a po stabilizaciji kardio-respiratornih parametara, isti su premještani na odjel Klinike za opštu i abdominalnu hirurgiju, gdje su tretirani infuzijama, te antibiotskom terapijom. Peroralna ishrana uvodila se četvrtog ili petog postoperativnog dana. Sve vrijeme pacijenti su praćeni radi otkrivanja nastanka simptoma dehiscencije kolorektalne anastomoze.

Kod pacijenata kod kojih je postojala sumnja na dehiscenciju anastomoze korištene su dijagnostičke pretrage, koje su obuhvatale klinički pregled, laboratorijske i biohemijске analize, te radiološke pretrage. Klinički pregled obuhvatao je prisustvo bolova u abdomenu, povišenu temperaturu, postojanje gnojnog ili fekalnog sadržaja na abdominalnom drenu. Od laboratorijskih nalaza rađeni su nalazi KKS, te vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP), prokalcitonina, uree i kreatinina. Od radioloških metoda koristili su se nalaz ultrazvuka (UZ) abdomena i nalaz kompjuterizovane tomografije (KT) abdomena i male karlice.

#### 4.4. Procedure kod pacijenata sa dehiscencijom

Kod pacijenata kod kojih je verifikovana dehiscencija anastomoze na osnovu opšteg stanja donosila se odluka o daljim modalitetima liječenja. Kod pacijenata kod kojih je opšte stanje bilo stabilno, bez porasta upalnih parametara, provodio se konzervativni tretman, dok je kod pacijenata sa znacima pogoršanja opšteg stanja i sa simptomima septičkog stanja bilo potrebno uraditi hirurško zbrinjavanje dehiscencije kreiranjem bipolarne stome ili operacije po Hartmanu.

Radi dobijanja potpunih podataka ova je studija imala odgovarajuće protokole kojih se pridržavala:

- preoperativne karakteristike, koje su obuhvatale: životnu dob pacijenta, pol, indeks tjelesne mase (BMI), postojanje komorbiditeta, distancu tumora od anokutane linije, da li je preoperativno provođena radiohemoterapija, te anesteziološki pregled prilikom kojeg je određen ASA skor, imunohistohemijsko određivanje vrijednosti VEGF, MMP2 i MMP9 u bioptiranom tkivu tumora i zdravom tkivu u neposrednoj blizini tumora;
- intraoperativne karakteristike: dužinu trajanja operativnog zahvata, visinu kreirane anastomoze, gubitak krvi u toku operacije u mililitrima i eventualne nadoknade;
- postoperativne karakteristike, koje su obuhvatale: mjerjenje vrijednosti vitalnih parametara (EKG, krvni pritisak, KKS), diureze, lokalno praćenje operativne rane, vrijeme uspostavljanja pasaže crijeva i početka peroralne ishrane, nastanak dehiscencije anastomoze i drugih postoperativnih komplikacija, način njihovog zbrinjavanja, te dužina trajanja hospitalizacije;
- patohistološki rezultat tumora reseciranih crijeva i usmjeravanje na dalje terapijske procedure.

#### 4.5. Histološka i imunohistohemijska analiza

Kod svih ispitivanih pacijenata (obje kohorte) u bioptičkom materijalu tumorskog tkiva i okolnog zdravog dijela zida debelog crijeva radila se histopatološka analiza i ekspresija VEGF i MMP2 i MMP9.

Za histopatološku analizu koristiće se resecirani dio rektuma, čijom će se analizom utvrditi histološki tip karcinoma i stadijum karcinoma. Za ispitivanje ekspresije VEGF i MMP2 i MMP9 uzimaće se bioptirani dijelovi tumora i dijelovi zdravog tkiva sa mjesta planirane anastomoze, koji se šalju na imunohistohemijsku analizu. Kao rane i najznačajnije postoperativne komplikacije koje će se analizirati jesu: dehiscencija anastomose, a potom i ostale postoperativne komplikacije, i to dehiscencija operativne rane, infekcija operativne rane, postoperativne komplikacije, dermatitisi, dijareja, proktitisi, akutni cistitisi. Prema dosadašnjim podacima rane komplikacije javljaju se u periodu od tri dana do tri mjeseca od operativnog zahvata.

Rane postoperativne komplikacije pratiće se u toku hospitalizacije, kao i po otpuštanju pacijenta iz bolnice u periodu od tri mjeseca. Praćenje pacijenata i verifikovanje ranih postoperativnih komplikacija po otpuštanju na kućni tretman vršiće se kroz redovne kontrole, koje će se provoditi tokom prvih tri mjeseca nakon provedenog operativnog zahvata. Za verifikovanje komplikacija koristiće se klinički pregled, nalazi KKS, upalnih parametara, UZ abdomena i male karlice, te kolonoskopija. Eksperimentalni rad obavljaće se u laboratoriji Zavoda za patologiju UKC RS sa sljedećom opremom: Tkivni procesor Leica TP 1020, Leica Biosystems, Stanica za kalupljenje Leica EG1160, Rotacioni mikromotor Leica RM2255, Aparat za HE bojenje Leica ST-4040, Lab Vision™ Autostainer 360 + PT Module, Aparat za imunohistohemijsko bojenje sa pratećom opremom, Thermo Fisher Scientific, Svjetlosni mikroskop sa digitalnom kamerom i opremom za analizu slike, Leica DM2500.

Sam proces pripreme tkiva za imunohistohemijsku obradu, koji je urađen u laboratoriji Zavoda za patologiju obavlja se na sljedeći način:

- Tkivo je prošlo fiksaciju u desetpostotnom formaldehidu 48h!

- Dehidratacija tkiva obavljala se u aparatu LEICA ASP 300S po sljedećem protokolu:
  1. formaldehid 10% 6h;
  2. 70% alkohol 1h 30';
  3. 96% alkohol 1h 30';
  4. 100% alkohol 3x 1h 30';
  5. ksilol 3x 1h 30';
  6. parafin 3x 1h 30'.
- Nakon dehidratacije tkivo je ukalupljeno u parafinske blokove.
- Blokovi su rezani na  $4\mu$  i bojeno metodom HE u aparatu Myreva, po sljedećem protokolu:
  1. ksilol 4';
  2. 100% alkohol 2';
  3. 96% alkohol 1';
  4. 75% alkohol 1';
  5. tekuća voda 1';
  6. destilovana voda 1';
  7. hematoxilin 2';
  8. tekuća voda 2';
  9. 0,1% HCl 1';
  10. tekuća voda 1';
  11. 75% alkohol 1';
  12. eosin 2';
  13. 96% alkohol 2';
  14. 100% alkohol 2';
  15. 100% alkohol 1';
  16. ksilol 3'.
- Preparati montirani kanada balzamom.
- Presjeci su bojeni sa 3 različita imunohistohemijska antitijela – MMP9, MMP2 i VGEF – po sljedećem protokolu:

- MMP9 – Anti-MMP9 antibody ab74277 Rabbit polyclonal to MMP9, razrjeđenje je 1:200
  1. blokada endogene peroksidaze 10 minuta tripostotnim vodonik-peroksidom;
  2. ispiranje – 2x wash puferom;
  3. toplotni oporavak antiga – CITRATNI puffer ph 6,0, PT LINK 20 minuta hlađenje;
  4. ispiranje – 3x wash puferom;
  5. BLOKADA NESPECIFIČNOG BOJENJA – 10 minuta proteinski blok;
  6. ispiranje – 1x wash puferom;
  7. INKUBACIJA SA PRIMARNIM ANTITIJELOM – 30 minuta na sobnoj temperature;
  8. ispiranje – 4x wash puferom;
  9. VIZUELIZACIJA Ab64261 – 10 minuta SEKUNDARNO ANTITIJELO OZNAČENO BIOTINOM (ŽUTI LINK);
  10. ispiranje – 4x wash puferom;
  11. deset minuta STREPTAVIDIN-PEROKSIDAZA (CRVENI LINK);
  12. ispiranje – 4x wash puferom;
  13. DAB HROMOGEN – 1–10 minuta jedna kap DAB hromogena na 1,5 ml supstrata
  14. POZITIVNO KONTROLNO TKIVO – PLACENTA.
  
- MMP2 – Anti-MMP2 antibody ab227755 Rabbit polyclonal to MMP2, razrjeđenje je 1:100
  1. blokada endogene peroksidaze – 10 minuta tripostotnim vodonik-peroksidom;
  2. ispiranje – 2x wash puferom;
  3. toplotni oporavak antiga – CITRATNI puffer ph 6,0, PT LINK 20 minuta hlađenje;
  4. ispiranje – 3x wash puferom;
  5. BLOKADA NESPECIFIČNOG BOJENJA – 10 minuta proteinski blok;
  6. ispiranje – 1x wash puferom;
  7. INKUBACIJA SA PRIMARNIM ANTITIJELOM – 30 minuta na sobnoj temperature;

8. ispiranje – 4x wash puferom;
9. VIZUELIZACIJA Ab64261 – 10 minuta SEKUNDARNO ANTITIJELO OZNAČENO BIOTINOM (ŽUTI LINK);
10. ispiranje – 4x wash puferom;
11. deset minuta STREPTAVIDIN-PEROKSIDAZA (CRVENI LINK);
12. ispiranje – 4x wash puferom;
13. DAB HROMOGEN – 1–10 minuta jedna kap DAB hromogena na 1,5 ml supstrata
14. POZITIVNO KONTROLNO TKIVO – PLACENTA.

- VEGF Anti-VEGF antibody ab51745 Rabbit polyclonal to VEGF, razređenje je 1:100
  1. blokada endogene peroksidaze –10 minuta tripostotnim vodonik-peroksidom;
  2. ispiranje – 2x wash puferom;
  3. toplotni oporavak antiga – CITRATNI puffer ph 6,0, PT LINK 20 minuta hlađenje;
  4. ispiranje – 3x wash puferom;
  5. BLOKADA NESPECIFIČNOG BOJENJA – 10 min proteinski blok;
  6. ispiranje – 1x wash puferom;
  7. INKUBACIJA SA PRIMARNIM ANTITJELOM – 30 minuta na sobnoj temperature;
  8. ispiranje – 4x wash puferom;
  9. VIZUELIZACIJA Ab64261 – 10 minuta SEKUNDARNO ANTITIJELO OZNAČENO BIOTINOM (ŽUTI LINK);
  10. ispiranje – 4x wash puferom;
  11. deset minuta STREPTAVIDIN-PEROKSIDAZA (CRVENI LINK);
  12. ispiranje – 4x wash puferom;
  13. DAB HROMOGEN – 1–10 minuta jedna kap DAB hromogena na 1,5 ml supstrata;
  14. POZITIVNO KONTROLNO TKIVO – Pankreas.

- Nakon bojenja imunohistohemije obavljeno je i kontra bojenje u aparatu Myreva:
  1. hematoksilin 3';

2. tekuća voda 2x 4';
  3. amonijačna voda 2';
  4. tekuća voda 2x 4';
  5. 96% alkohol 2';
  6. 100% alkohol 2';
  7. ksitol 2x 2'.
- Slijedi montiranje preparata kanada balzamom i stavljanje pokrovног stakalca.

#### 4.6. Interpretacija dobijenih slikovnih rezultata

Intenzitet imunohistohemijskih reakcija MMP9, MMP2 i VEGF procijenjen je prema sljedećim parametrima: odsustvo smeđih granula u ćelijeskoj citoplazmi – nula, prisustvo malih smeđih granula u citoplazmi 10% – jedan, distribucija smeđih velikih granula u pojedinačnim ćelijama od 10 do 50% – dva, prisustvo velikih smeđih granula u citoplazmi većine ćelija preko 50% č – tri. Pozitivne fleke definisane su kao braon-žute čestice ili tan braon čestice u citoplazmi (uvećanje  $\times 100$ ). Pored ćelija raka, u većini slučajeva postojala je ekspresija MMP2, MMP9 i VEGF u stromalnim ćelijama sa manjim udjelom nego u malignim epitelnim ćelijama.

#### 4.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su bili obrađeni standardnim statističkim metodama i računarskim programom za statističku analizu SPSS softver (verzija 18.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) na osnovu kojih su doneseni konkretni zaključci u skladu sa postavljenim hipotezama i ciljevima istraživanja. Po potrebi, osnovne karakteristike ispitanika poređene su sa Student-ovim t-testom ili Mann-Whitney-evim U testom za kontinuirane varijable, a Fisher-ovim egzaktnim testom za kategoričke varijable. Za određivanje nezavisnih prediktora korištena je univariatna Cox-ova

proporcionalna hazardna regresiona analiza. Svi podaci obrađeni su uz stepen statističke značajnosti od 95%.

Standardne krive dizajnirane su da procijene dijagnostičku i prognostičku vrijednost MMP9, MMP2 i VEGF u tkivima, u smislu osjetljivosti, specifičnosti, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV) i negativne prediktivne vrijednosti (NPV). Optimalne presječene vrijednosti tkiva MMP9, MMP2 i VEGF identifikovane su prema Wilcoxon-ovim testom, te Z testom. Statistička povezanost dehiscencije sa dijabetes melitusom (DM) utvrđivana je na osnovu Kruskalii-Wallis (K-W) testa,  $p > 0,05$ . Takođe, statistička povezanost dehiscencije BMI utvrđena je Kruskalii-Wallis (K-W) testom – 0,6899. Svi rezultati prikazani su tabelarno i grafički.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Demografske karakteristike ispitanika u istraživanju

Bolesnici su bili podijeljeni u dvije grupe (kohorte).

Kohortu 1 činiće 32 pacijenata s rektalnim adenokarcinomom, kod kojih će se prije operacije provesti neoadjuvantna radioterapija tumorom zahvaćenog rektuma.

Kohortu 2 činiće 30 pacijenata s adenokarcinomom rektuma, koji će biti podvrgnuti samo hirurškom zahvatu, resekciji rektuma s kolorektalnom anastomozom.

### 5.2. Podaci o pacijentu:

- Medicinska dokumentacija: pol, starost, osnovna bolest, komorbiditeti, stadijum tumora, lijekovi koji se trenutno koriste;
- patohistološki nalaz: vrsta tumora, stadijum tumora, širenje slojeva stijenke rektuma, šireći se na limfne čvorove i okolno tkivo;
- radiološki nalaz: lokalno širenje i širenje na daljinu bolesti;
- laboratorijski nalazi: hematološke i biohemijске analize.

*Tabela 1: Distribucija pacijenata sa karcinomom rektuma po polu*

	Kohorta 1	Kohorta 2	UKUPNO
<b>POL</b>			
<b>M</b>	23 (71,8%)	21 (70%)	44 (71%)
<b>Ž</b>	9 (28,2%)	9 (30%)	18 (29%)
<b>UKUPNO</b>	32 (100%)	30 (100%)	62 (100%)
<b>DEHISCENCIJA</b>			
<b>DA</b>	3	2	5
<b>NE</b>	29	28	57
<b>UKUPNO</b>	32	30	62

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

U prvoj kohorti od ukupnog broja pacijenata ženskog pola bilo je devet, odnosno 28,2%, a u drugoj kohorti broj pacijenata ženskog pola takođe je bio devet, odnosno 30%. Na osnovu dobijenih podataka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti tumora po polu,  $p>0,05$ .

### 5.3. Učestalost tumora po starosnim grupama

*Tabela 2: Distribucija pacijenata sa karcinomom rektuma po starosnoj kategoriji*

DOB	Kohorta 1		Kohorta 2		UKUPNO	
	N	%	N	%	N	%
<b>50-65</b>	7	21,8%	9	30 %	16	25,8%
<b>&gt; 65</b>	25	78,1%	21	70%	46	74,2%
<b>UKUPNO</b>	32	100,00%	30	100,00%	62	100,00%

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

U prvoj kohorti, sa pacijentima koji su sa neo HRT, broj osoba ispod 65 godina starosti bio je sedam, odnosno 21,88%, a u drugoj kohorti, gdje su nezračeni pacijenati, broj osoba ispod 65 godina bio je devet, odnosno 30%. Na osnovu dobijenih podataka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti tumora po starosnim grupama između pacijenata sa neo RHT i pacijenata bez neo RHT, t-test:  $p > 0,05$ .

### 5.4. Povezanost dehiscencije sa godinama starosti po starosnim grupama

Utvrđeno je da se dehiscencija anastomoze javila kod jednog pacijenta (14,3%) u starosnoj grupi ispod 65 godina, u grupi kod pacijenata koji su podvrgnuti neoadjuvantnoj terapijom. Kod pacijenata koji su pripadali starosnoj grupi preko 65 godina broj slučajeva

dehiscencije bio dva, odnosno 8%. Kod pacijenata ispod 65 godina starosti koji nisu bili tretitani neoadjuvantnom radioterapijom dehiscencija se nije javila ni kod jednog pacijenta. Kod pacijenta preko 65 godina starosti dehiscencija se javila u dva slučaja (9,5%).

Iz tabele se vidi da nema statistički značajne povezanosti između dehiscencije i starosnih grupa, poredeći sve kohorte, i odvojeno i zajedno,  $p > 0,05$ .

*Tabela 3: Distribucija pacijenata sa dehiscencijom unutar starosnih grupa*

DEHISCENCIJA	Kohorta 1		Kohorta 2		UKUPNO
	50 - 65	> 65	50-65	> 65	
NE	6 (85,7%)	23 (92%)	9 (100%)	19 (90,5%)	57 (91,9%)
DA	1 (14,3%)	2 (8%)	0 (0%)	2 (9,5%)	5 (8,1%)
UKUPNO	7 (100%)	25 (100%)	9 (100%)	21 (100%)	62 (100%)

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

*Tabela 4: Korelacija pacijenata sa dehiscencijom anastomoze i godinama starosti*

Koeficijent korelacije			
			ST GRUPA
<b>DEHISCENCIJA</b>	SVI	r	0,039
		p	0,762
		N	62
	Kohorta 1	r	-0,089
		p	0,628
		N	32
	Kohorta 2	r	0,175
		p	0,355
		N	30

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

### 5.5. Povezanost dehiscencije anastomoze kod pacijenata sa neo RHT, u odnosu na pacijente bez neo RHT

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost dehiscencije anastomoze kod pacijenata sa neo RHT, u odnosu na pacijente bez neo RHT.

*Tabela 5: Distribucija pacijenata sa dehiscencijom anastomoze kod pacijenata sa neo RHT i pacijenata bez neo RHT*

VRIJEDNOSTI STATISTIČKOG POREĐENJA					
	Kohorta 1		Kohorta 2		<i>p</i>
	AR.SRED.	SD	AR.SRED.	SD	
<b>DEHISCENCIJA</b>	16,00	18,38	15,00	18,38	> 0,05

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

#### 5.6. Povezanost pola i nastanka dehiscencije anastomose

U prvoj kohorti broj pacijenata sa dehiscencijom anastomose iznosio je dva, odnosno 8,7% kod muških pacijenata, a kod ženskih pacijenata bila je jedna dehiscencija, odnosno 11,1%. U drugoj kohorti dehiscencija anastomoze javila se kod dva pacijenta muškog pola, odnosno 9,5%, dok kod osoba ženskog pola nije bilo dehiscencije.

Za poređenje razlika između grupa unutar kohorti, korišten je Z-test za nezavisne uzorke, uz validaciju i normalizaciju uzorka.

*Tabela 6: Distribucija pacijenata sa dehiscencijom anastomoze kod muškog i kod ženskog pola*

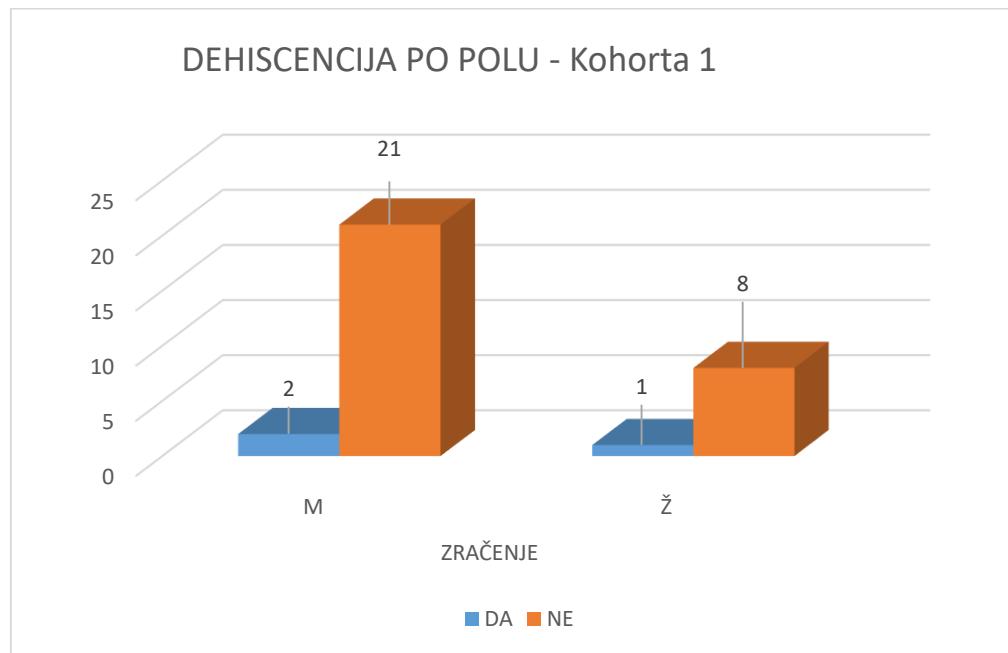
DEHISCENCIJA	Kohorta 1		Kohorta 2		UKUPNO
	M	Ž	M	Ž	
<b>DA</b>	2 (8,7%)	1 (11,1%)	2 (9,5%)	0 (0%)	5 (8%)
<b>NE</b>	21 (91,3%)	8 (88,9%)	19 (90,5%)	9 (100%)	57 (92%)
<b>UKUPNO</b>	23 (100%)	9 (100%)	21 (100%)	9 (100%)	62 (100%)

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

Na osnovu dobijenih rezultata, u prvoj kohorti Z-test nam je pokazao da se proporcionalna zastupljenost dehiscencije kod osoba muškog pola statistički značajno ne razlikuje u odnosu na osobe ženskog pola,  $z = 0,24$ ,  $p > 0,05$ ;

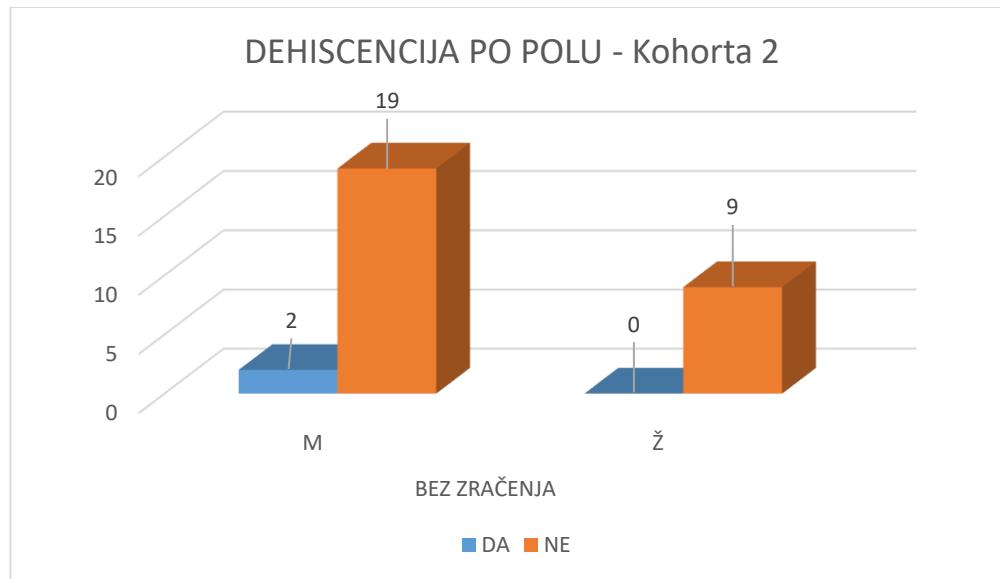
U drugoj kohorti Z-test nam je pokazao da se proporcionalna zastupljenost dehiscencije kod osoba muškog pola statistički značajno ne razlikuje u odnosu na osobe ženskog pola,  $z = 1,01$ ,  $p > 0,05$ .

Slika 10: Grafički prikaz distribucije dehiscencije anastomoze kod pacijenata sa neo RHT



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

Slika 11: Grafički prikaz distribucije dehiscencije anastomoze kod pacijenata bez neo RHT



Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

### 5.7. Povezanost dijabetes melitusa i nastanka dehiscencije anastomoze

Tabela 7: Distribucija pacijenata sa dehiscencijom anastomoze kod pacijenata sa dijabetes melitusom i bez dijabetes melitusa u dvije posmatrane kohorte

DEHISCENCIJA	Kohorta 1		Kohorta 2		UKUPNO
	DM -	DM +	DM -	DM +	
DA	1 (4,5%)	2 (20%)	0 (0%)	2 (25%)	5 (8%)
NE	21 (95,5%)	8 (80%)	22 (100%)	6 (75%)	57 (92%)
UKUPNO	22 (100%)	10 (100%)	22 (100%)	8 (100%)	62 (100%)

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

U prvoj kohorti, sa pacijenatima koji su zračeni, dehiscencija anastomoze javila se kod jednog pacijenta bez dijabetesa, odnosno 4.5%, i kod dva pacijenta sa dijabetesom, odnosno 20%. U drugoj kohorti dehiscencija anastomoze nije bila prisutna ni kod jednog pacijenta bez dijabetesa, dok je dehiscencija anastomoze bila prisutna kod dva pacijenta sa dijabetesom, odnosno 25%.

Na osnovu dobijenih rezultata, u prvoj kohorti Z-test pokazao je da se proporcionalna zastupljenost dehiscencije kod osoba koje imaju dijabetes statistički značajno razlikuje u odnosu na one koji nemaju dijabetes,  $z = 1,6$ ,  $p < 0,05$ . Na osnovu dobijenih rezultata, u drugoj kohorti Z-test pokazao je da se proporcionalna zastupljenost dehiscencije kod osoba koje imaju dijabetes statistički značajno razlikuje u odnosu na one koji nemaju dijabetes,  $z = 2,81$ ,  $p < 0,05$ .

*Tabela 8: Distribucija pacijenata sa dehiscencijm anastomoze kod pacijenata sa dijabetes melitusom i bez dijabetes melitusa u ukupnom broju posmatranih pacijenata*

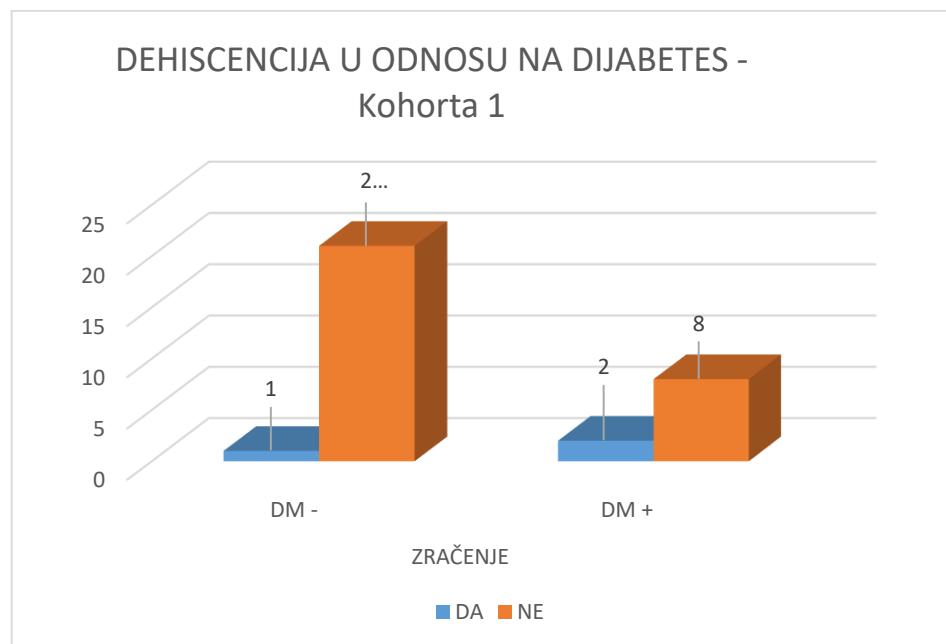
DEHISCENCIJA		DM -		DM +		UKUPNO	
DA	NE	1	(2,3%)	4	(22,2%)	5	(8%)
		43	(97,7%)	14	(77,8%)	57	(92%)
		44	(100%)	18	(100%)	62	(100%)

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

Od ukupnog broja posmatranih pacijenata utvrđeno je da se kod pacijenata bez dijabetes melitusa dehiscencija anastomoze javila kod jednog pacijenta, odnosno kod 2.3% pacijenata, dok se dehiscencija anastomoze kod pacijenata sa dijabetes melitusom javila kod četiri pacijenta, odnosno kod 22% pacijenata.

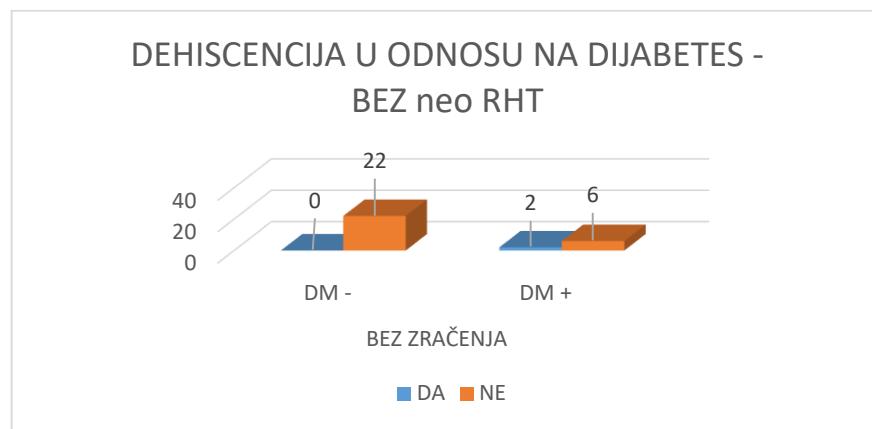
Na osnovu dobijenih rezultata, a posmatrajući zajedno obje grupe pacijenata, pacijente sa neo RHT i pacijente bez neo RHT, utvrdili smo da postoji statistički značajna povezanost između dehiscencije i DM,  $p < 0,05$ .

*Slika 12: Grafički prikaz distribucije dehiscencije anastomoze kod pacijenata Kohorte 1 sa dijabetes melitusom i bez dijabetesa melitusa*



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

*Slika 13: Grafički prikaz distribucije dehiscencije anastomoze kod pacijenata Kohorte 2 sa dijabetes melitusom i bez dijabetesa melitusa*



Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

#### 5.8. Povezanost dehiscencije anastomoze sa vrijednostima BMI

*Tabela 9: Distribucija pojedinačnih kohorti zračenih i nezračenih pacijenata sa dehiscencijom anastomoze u odnosu na vrijednosti BMI*

DEHISCENCIJA	Kohorta 1			Kohorta 2			UKUPNO
	BMI < 19	BMI 19-25	BMI > 25	BMI < 19	BMI 19-25	BMI > 25	
DA	0	1	2	0	0	2	5
NE	5	17	7	5	18	5	57
UKUPNO	5	18	9	5	18	7	62

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT. BMI - indeks tjelesne mase, jedinica je kg/m<sup>2</sup>.

Od ukupnog broja pacijenata sa neo RHT u grupi koja je imala vrijednost BMI manji od 19 nije bilo nijednog pacijenta sa dehiscencijom anastomoze. U grupi pacijenata sa BMI 19–25 bio je jedan pacijent sa dehiscencijom anastomose, odnosno 5,5%, a u grupi pacijenata sa BMI preko 25 bila su dva pacijenta, odnosno 22,2% pacijenata.

Od ukupnog broja pacijenata bez neo RHT u grupi sa BMI manjim od 19 nije bilo nijednog pacijenta sa dehiscencijom. Ni u grupi pacijenata sa BMI između 19 i 25 nije bilo nijednog pacijenta sa dehiscencijom, dok su u grupi pacijenata sa BMI preko 25 bila dva pacijenta sa dehiscencijom, odnosno 28,6% pacijenata.

Na osnovu dobijenih rezultata posmatranih pacijenata utvrđeno je da, posmatrajući unutar pojedinih kohorti odvojeno, postoji statistička značajnost u nastanku dehiscencije kod pacijenata sa BMI većim od 25, u odnosu na pacijente sa BMI manjim od 19. Takođe, utvrđeno je da postoji statistička značajnost u nastanku dehiscencije kod pacijenata sa BMI većim od 25, u odnosu na pacijente sa BMI 19–25.

*Tabela 10: Distribucija ukupnog broja pacijenata sa dehiscencijom anastomoze u odnosu na vrijednosti BMI*

<b>DEHISCENCIJA</b>	<b>BMI &lt; 19</b>	<b>BMI 19–25</b>	<b>BMI &gt; 25</b>	<b>UKUPNO</b>
<b>DA</b>	0 (0%)	1 (2,8%)	4 (25%)	5 (8%)
<b>NE</b>	10 (100%)	35 (97,2%)	12 (75%)	57 (92%)
<b>UKUPNO</b>	10 (100%)	36 (100%)	16 (100%)	62 (100%)

Legenda: BMI indeks tjelesne mase jeste vrijednost koja se dobije kada težinu osobe u kilogramima podijelimo sa kvadratom visine u metrima, jedinica je kg/m<sup>2</sup>.

Posmatrajući ukupan broj pacijenata sa neo RHT i pacijenata koji su bez neo RHT u odnosu na BMI utvrđeno je da u grupi pacijenata sa BMI manjim od 19 nije bilo nijednog pacijenta sa dehiscencijom anastomoze.

U grupi pacijenata sa BMI između 19 i 25 broj pacijenata sa dehiscencijm iznosio je jedan, odnosno 2,8%, dok je u grupi pacijenata sa BMI većim od 25 broj pacijenata sa dehiscencijom bio četiri, odnosno 25% pacijenata.

Posmatrajući zajedno grupe pacijenata sa neo RHT i pacijente bez neo RHT, utvrdili smo da postoji statistički značajna povezanost između DEHISCENCIJE i BMI. Za poređenje razlika između grupa korišten je Z-test za nezavisne uzorke, uz validaciju i normalizaciju uzorka.

*Tabela 11: Distribucija ukupnog broja pacijenata sa dehiscencijom anastomoze u odnosu na vrijednosti BMI*

Independent Samples Z-test					
	BMI 19- 25-Z	BMI > 25- Z	BMI < 19- BZ	BMI 19- 25-BZ	BMI > 25- BZ
Z	0,56	1,31	0	0	1,31
<b>BMI &lt; 19-Z</b>	<i>Sig. (2-tailed)</i>	0,2894	0,0952	0	0,0952
<b>BMI 19- 25-Z</b>	Z	1,53	0,56	1,04	1,95*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		0,0633	0,2894	0,1482
<b>BMI &gt; 25-Z</b>	Z		1,31	2,36*	0,41
	<i>Sig. (2-tailed)</i>			0,0952	0,0090
<b>BMI &lt; 19- BZ</b>	Z			0	1,58*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>				0,0569
<b>BMI 19- 25-BZ</b>	Z				2,81*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>				0,0025

● - unutar kohorti ; ○ - između kohorti ; \* - značajna razlika  $p \leq 0,05$ .

*Tabela 12: Distribucija broja pacijenata sa dehiscencijom anastomoze u odnosu na dijabetes melitus i na vrijednosti BMI*

		DM	BMI	DEHISCENCIJA
DM	1,000	0,278	0,246	
		0,123	0,175	
BMI	0,278	1,000	0,273	
	0,123		0,130	
DEHISCENCIJA	0,246	0,273	1,000	
	0,175	0,130		

5.9. Prikaz stepena distribucije MMP2, MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu rektuma

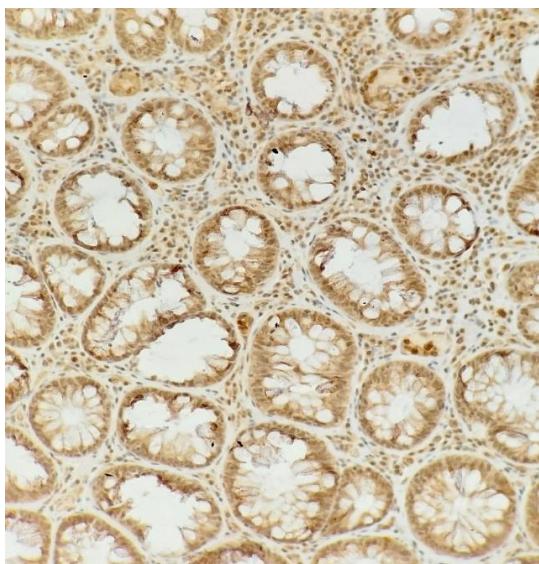
*Tabela 13: Distribucija MMP2 u tumorskom i zdravom tkivu prije i poslije provedene neoadjuvantne radioterapije*

Kohorta 1					
	0	1	2	3	
<b>MMP2 a</b>	0 (0%)	0 (0%)	19 (59,4%)	13 (46,6%)	
<b>MMP2 b</b>	0 (0%)	6 (18,7%)	22 (67,8%)	4 (12,5%)	
<b>MMP2 c</b>	0 (0%)	12 (37,5%)	17 (53,1%)	3 (9,4%)	
<b>MMP2 d</b>	5 (15,6%)	21 (65,6%)	5 (15,6%)	1 (3,1%)	

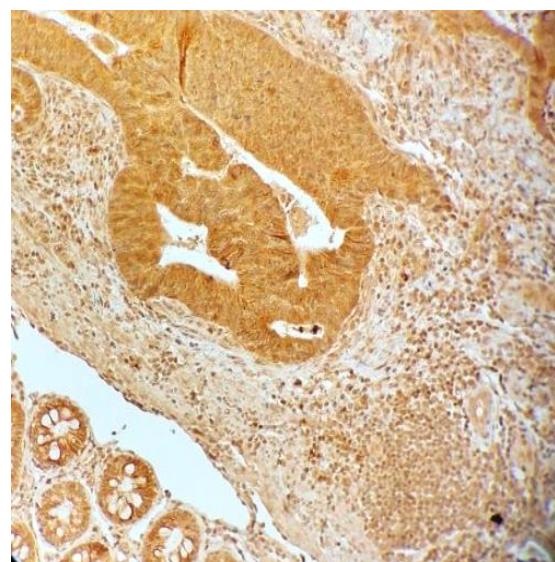
Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

Tabelarno je prikazan stepen distribucije MMP2 u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kojima je preoperativno bila određena neo RHT. Studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata prije neo RHT stepen distribucije MMP2 u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 59,4% pacijenata (Slika 15). Najveći stepen distribucije MMP2 u zdravom tkivu takođe je bio između 10% i 50%, odnosno gradus dva, i to kod 67,8% pacijenata (Slika 14).

*Slika 14*



*Slika 15*



Legenda: Stepen distribucije MMP2, gradus dva u zdravom i tumorskom tkivu.

Poslije zračenja najveći stepen distribucije MMP2 u tumorskom tkivu bio je između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva kod 53,1% pacijenata. Najveći stepen distribucije MMP2 u zdravom tkivu bio je do 10%, odnosno u gradusu jedan, i to kod 65,6% pacijenata (Tabela 13).

*Tabela 14: Distribucija MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu prije i poslije provedene neoadjuvantne radioterapije*

Kohorta					
	0	1	2	3	
<b>MMP9 a</b>	0 (0%)	2 (6,2%)	19 (59,4%)	11 (34,4%)	
<b>MMP9 b</b>	0 (0%)	8 (25%)	19 (59,4%)	5 (15,6%)	
<b>MMP9 c</b>	1 (3,1%)	11 (34,4%)	16 (50%)	4 (12,5%)	
<b>MMP9 d</b>	3 (9,4%)	23 (71,9%)	5 (15,6%)	1 (3,1%)	

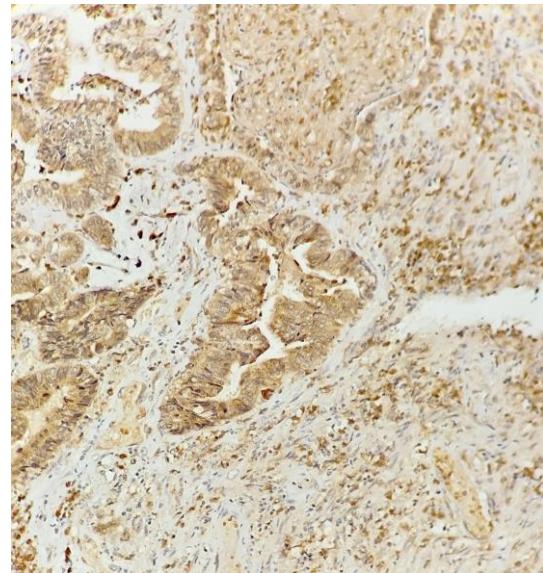
Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

Tabelarno je prikazan stepen distribucije MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kojima je preoperativno bila određena neo RHT i u ovom slučaju studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata stepen distribucije MMP9 u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 54,9% pacijenata (Slika 17). Najveći stepen distribucije MMP9 u zdravom tkivu takođe je bio između 10% i 50%, i to kod 54,9% pacijenata (Slika 16).

*Slika 16*



*Slika 17*



Legenda: Stepen distribucije MMP9, gradus dva u zdravom i tumorskom tkivu.

Poslije provedene neoadjuvantne RHT najveći stepen distribucije MMP9 u tumorskom tkivu bio je između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva kod 50% pacijenata. Najveći stepen distribucije MMP9 u zdravom tkivu bio je do 10%, odnosno u gradusu jedan, i to kod 71,9% pacijenata (Tabela 14).

## 5.10. Prikaz stepena distribucije VEGF u zdravom i tumorskom tkivu

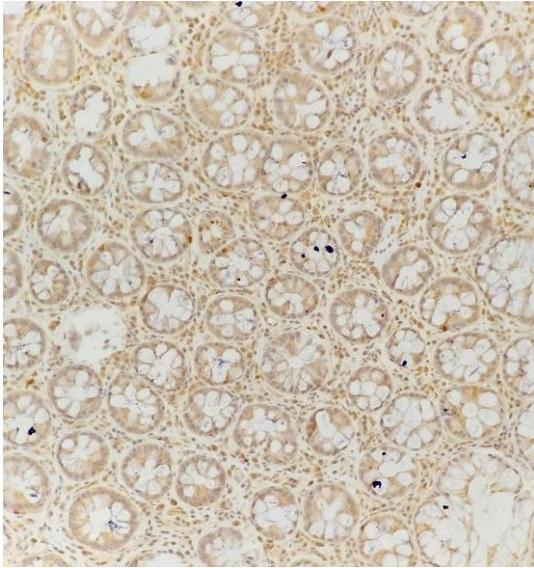
*Tabela 15: Distribucija VEGF u tumorskom i zdravom tkivu prije i poslije provedene neoadjuvantne radioterapije*

Kohorta 1					
	0	1	2	3	
<b>VEGF a</b>	0 (0%)	0 (0%)	20 (62,5%)	12 (37,5%)	
<b>VEGF b</b>	1 (3,1%)	11 (34,4%)	17 (53,1%)	3 (9,4%)	
<b>VEGF c</b>	1 (3,1%)	15 (46,9%)	13 (40,6%)	3 (9,4%)	
<b>VEGF d</b>	3 (9,4%)	24 (75%)	4 (12,5%)	1 (3,1%)	

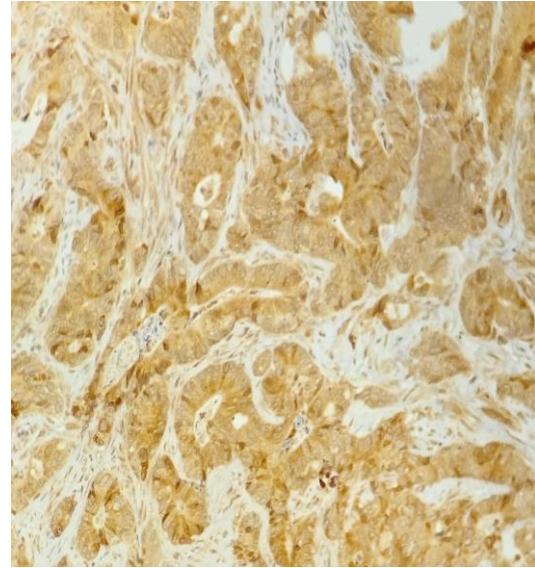
Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

Tabelarno je prikazan stepen distribucije VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kojima je preoperativno bila određena neo RHT i u ovom slučaju studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata stepen distribucije VEGF u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 62,5% pacijenata (Slika 19).

*Slika 18*



*Slika 19*



Legenda: Stepen distribucije VGEF, gradus dva u zdravom i tumorskom tkivu.

Najveći stepen distribucije VEGF u zdravom tkivu takođe je bio između 10% i 50%, i to kod 53,1% pacijenata (Slika 18). Poslije zračenja najveći stepen distribucije VEGF u tumorskom tkivu bio je do 10%, odnosno u gradusu jedan, kod 46.9% pacijenata. Najveći stepen distribucije VEGF u zdravom tkivu takođe je bio do 10%, odnosno u gradusu 1, kod 75% pacijenata (Tabela 15).

*Tabela 16. Distribucija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kod kojih nije provedena neoadjuvantna radioterapija*

Kohorta 2					
	0	1	2	3	
<b>MMP2 a</b>	0 ( 0%)	6 (20%)	18 (60%)	6 (20%)	
<b>MMP2 b</b>	3 (10%)	15 (50%)	9 (30%)	3 (10%)	
<b>MMP9 a</b>	1 (3,3%)	9 (30%)	15 (50%)	5 (16,7%)	
<b>MMP9 b</b>	3 (10%)	15 (50%)	10 (33,3%)	2 (6,7%)	
<b>VEGF a</b>	0 (0%)	7 (23,3%)	16 (53,3%)	7 (23,3%)	
<b>VEGF b</b>	2 (6,7%)	17 (56,7%)	10 (33,3%)	1 (3,3%)	

Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

Tabelarno je prikazan stepen distribucije MMP2 u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kod kojih nije provođena neoadjuvantna radioterapija. U ovom slučaju studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata stepen distribucije MMP2 u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 60% pacijenata. Najveći stepen distribucije MMP2 u zdravom tkivu bio je do 10%, odnosno gradus jedan, i to kod 50% pacijenata. Takođe je prikazan i stepen distribucije MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kod kojih nije provođena neoadjuvantna radioterapija. U ovom slučaju studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata stepen distribucije MMP9 u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 50% pacijenata. Najveći stepen distribucije MMP9 u zdravom tkivu bio je do 10%, odnosno gradus jedan, i to kod 50% pacijenata.

Ovdje je prikazan i stepen distribucije VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata kod kojih nije provođena neoadjuvantna radioterapija.

U ovom slučaju studijom je utvrđeno da je kod najvećeg broja pacijenata stepen distribucije VEGF u tumorskom tkivu bio između 10% i 50%, odnosno u gradusu dva, i to kod 53,3% pacijenata. Najveći stepen distribucije VEGF u zdravom tkivu bio je do 10%, odnosno u gradusu jedan, i to kod 56,7% (Tabela 12).

### 5.11. Povezanost dehiscencije sa visokom distribucijom MMP2, MMP9, VEGF

U studiji su posmatrani i povezanost ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu rektuma. Posmatrajući grupu pacijenata koji nisu zračeni, utvrdili smo da postoji slabo do umjerenog pozitivna korelacija između nastanka DEHISCENCIJE i viših vrijednosti ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF, koji su nađeni u bioptiranom tumorskom i bioptiranom zdravom tkivu rektuma.

*Tabela 17: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod nezračenih pacijenata i nastanka dehiscencije anastomoze*

Korelacija		
DEHISCENCIJA		
	<i>r</i>	<i>p</i>
MMP2 a	<b>0,423*</b>	<b>0,0200</b>
MMP2 b	<b>0,453*</b>	<b>0,0120</b>
MMP9 a	<b>0,420*</b>	<b>0,0208</b>
MMP9 b	<b>0,472**</b>	<b>0,0084</b>
VEGF a	<b>0,391*</b>	<b>0,0325</b>
VEGF b	<b>0,410*</b>	<b>0,0243</b>

Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT. \* – značajna razlika, \*\* – izrazito značajna razlika.

*Tabela 18: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod zračenih pacijenata i nastanka dehiscencije anastomoze*

Korelacije		
DEHISCENCIJA		
	<i>r</i>	<i>p</i>
MMP2 a	<b>0,389*</b>	<b>0,0278</b>
MMP2 b	<b>0,597**</b>	<b>0,0003</b>
MMP2 c	<b>0,436*</b>	<b>0,0127</b>
MMP2 d	<b>0,558**</b>	<b>0,0009</b>
MMP9 a	<b>0,2212</b>	<b>0,2238</b>
MMP9 b	<b>0,377*</b>	<b>0,0336</b>
MMP9 c	<b>0,2353</b>	<b>0,1948</b>
MMP9 d	<b>0,389*</b>	<b>0,0276</b>
VEGF a	<b>0,415*</b>	<b>0,0181</b>
VEGF b	<b>0,3033</b>	<b>0,0915</b>
VEGF c	<b>0,351*</b>	<b>0,0492</b>
VEGF d	<b>0,383*</b>	<b>0,0307</b>

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT. \* – značajna razlika, \*\* – izrazito značajna razlika.

5.12. Povezanost neoadjuvantne radioterapije i smanjenja ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF

U studiji su posmatrani pacijenti kod kojih je provedena neo RHT i utvrđeno je da je kod 12 pacijenata (37,5%) postojala izražena ekspresija MMP2 u tumorskom tkivu prije RHT, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija MMP2 u tumorskom tkivu bila samo u tri pacijenta (9,4%). Takođe, utvrđeno je da je kod 11 pacijenata (34,4%) postojala izražena ekspresija MMP9 u tumorskom tkivu prije provedene radioterapije, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija MMP9 u tumorskom tkivu bila u tri pacijenta (9,4%).

*Tabela 19: Prikaz pacijenata kod kojih je provedena neoadjuvantna radioterapija i vrijednosti MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom*

Korelacija uparenih uzoraka			
	N	r	p
<b>MMP2 a &amp; MMP2 c</b>	32	<b>0,475</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b>MMP2 b &amp; MMP2 d</b>	32	<b>0,523</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b>MMP9 a &amp; MMP9 c</b>	32	<b>0,345</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b>MMP9 b &amp; MMP9 d</b>	32	<b>0,775</b>	<b>&lt; 0,01</b>
<b>VEGF a &amp; VEGF c</b>	32	0,206	> 0,05
<b>VEGF b &amp; VEGF d</b>	32	<b>0,391</b>	<b>&lt; 0,05</b>

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

U studiji takođe je utvrđeno da je kod 12 pacijenata (37,5%) postojala izražena ekspresija VEGF u tumorskom tkivu prije radioterapije, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija VEGF bila kod tri pacijenta (9,4%).

*Tabela 20: Korelacije vrijednosti MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom prije i poslije provedene radioterapije*

	Test uparenih uzoraka							
	Uparene razlike							
	r	SD	SE	95% Interval CI		t	df	p
				Niže	Više			
<b>MMP2 a &amp; MMP2 c</b>	0,688	0,592	0,105	0,474	0,901	6,566	31	<b>&lt; 0,01</b>
<b>MMP2 b &amp; MMP2 d</b>	0,875	0,609	0,108	0,655	1,095	8,127	31	<b>&lt; 0,01</b>
<b>MMP9 a &amp; MMP9 c</b>	0,563	0,759	0,134	0,289	0,836	4,190	31	<b>&lt; 0,01</b>
<b>MMP9 b &amp; MMP9 d</b>	0,781	0,420	0,074	0,630	0,933	10,522	31	<b>&lt; 0,01</b>
<b>VEGF a &amp; VEGF c</b>	0,813	0,780	0,138	0,531	1,094	5,890	31	<b>&lt; 0,01</b>
<b>VEGF b &amp; VEGF d</b>	0,594	0,712	0,126	0,337	0,850	4,717	31	<b>&lt; 0,01</b>

U studiji je utvrđeno da je kod četiri pacijenta (12,5%) postojala izražena ekspresija MMP2 u zdravom tkivu prije provedene radioterapije, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija MMP2 u zdravom tkivu bila kod jednog pacijenta (3,1%). Kod pet pacijenata (15,6%) utvrđena je izražena ekspresija MMP9 u zdravom tkivu prije provedene radioterapije, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija MMP9 u zdravom tkivu bila kod jednog pacijenta (3,1%).

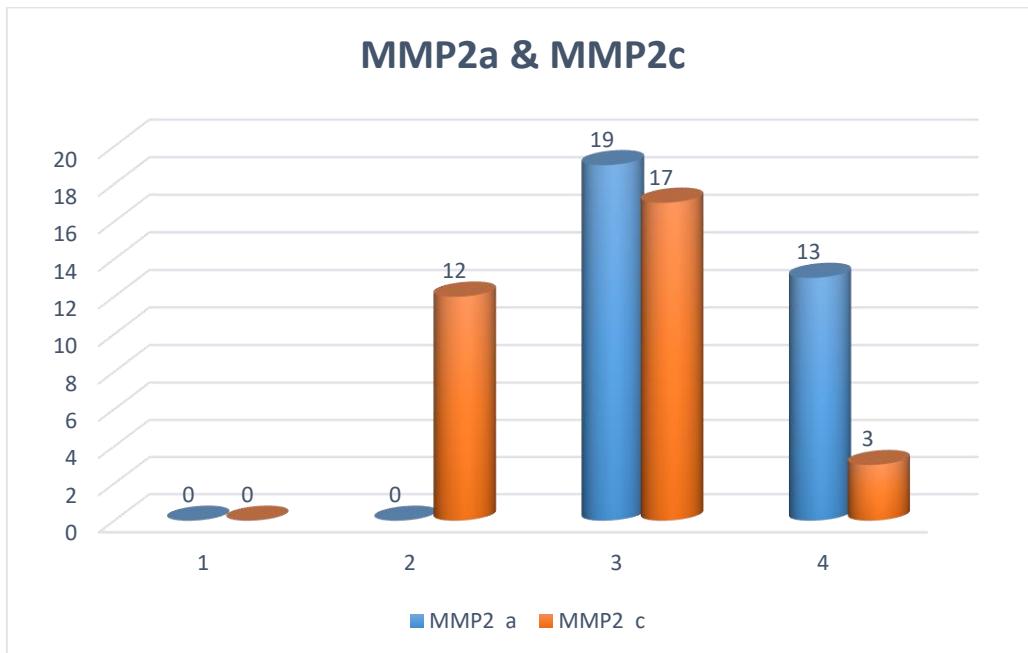
Takođe, utvrđeno da je kod četiri pacijenta (12,5%) postojala izražena ekspresija VEGF u zdravom tkivu prije provedene radioterapije, dok je poslije provedene radioterapije izražena ekspresija VEGF u zdravom tkivu bila kod jednog pacijenta (3,1%).

Iz prethodne tabele vidi se da postoji statistički izuzetno značajna razlika između vrijednosti MMP2, MMP9 i VEGF prije i poslije zračenja (korišten Wilcoxon test, p test), a na slikama se vidi da se ta razlika ogleda u smanjenju vrijednosti prebojenosti MMP2, MMP9 i VEGF.

#### 5.13. Grafički prikazi ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF prije i poslije neoadjuvantne radioterapije

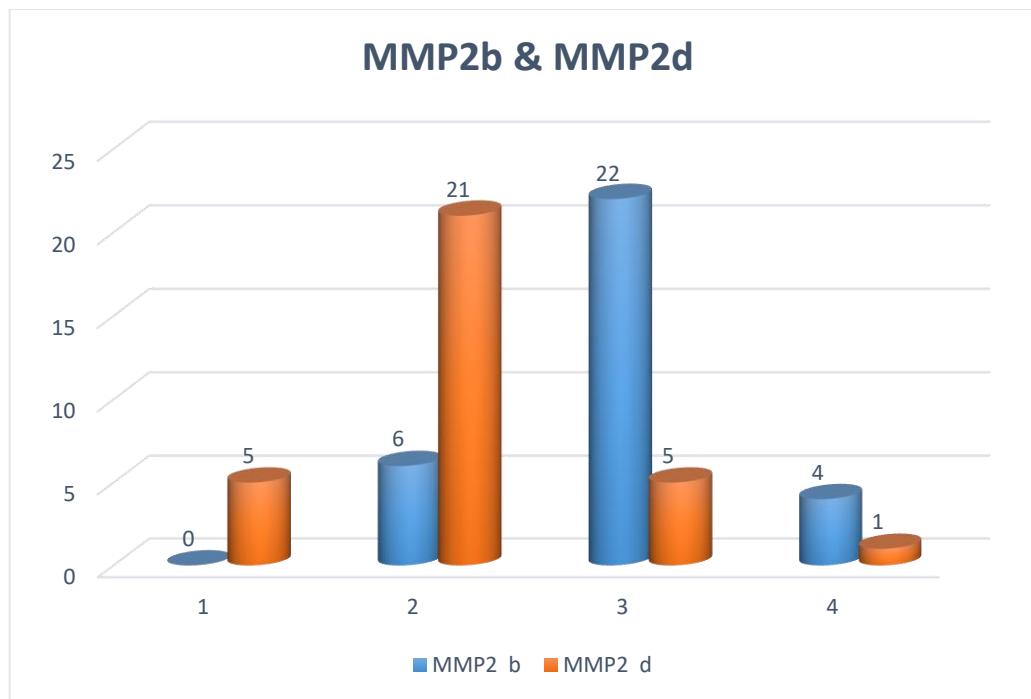
Grafikoni 20 i 21 pokazuju da je došlo do smanjenja ekspresije MMP2 u tumorskom i u zdravom tkivu poslije provedene neoadjuvantne radioterapije.

*Slika 20: Grafički prikaz ekspresije MMP2 u tumorskom tkivu prije i poslije provedene neo RHT*



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

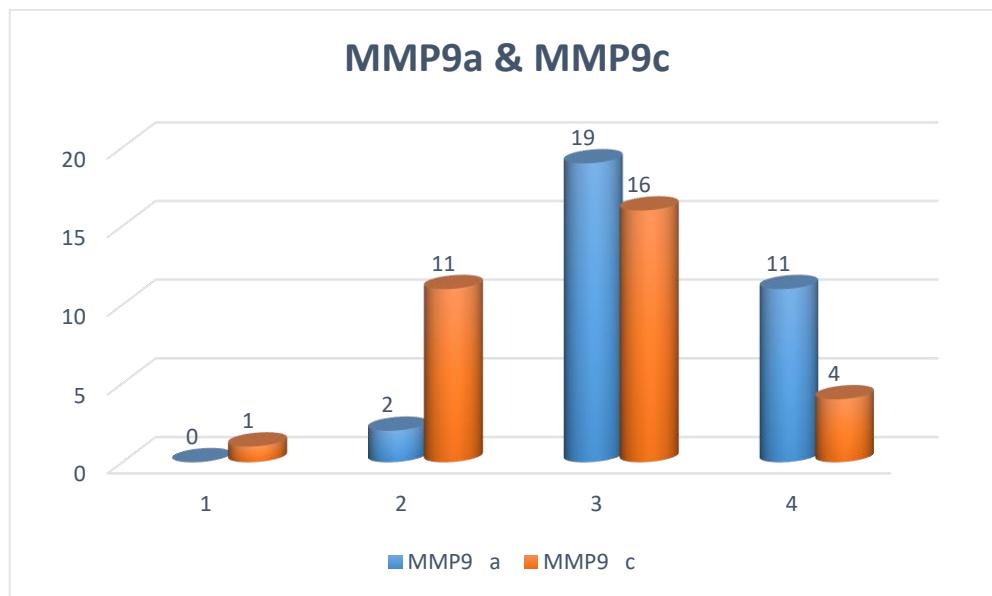
Slika 21: Grafički prikaz ekspresije MMP2 u zdravom tkivu prije i poslije provedene neo RHT



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

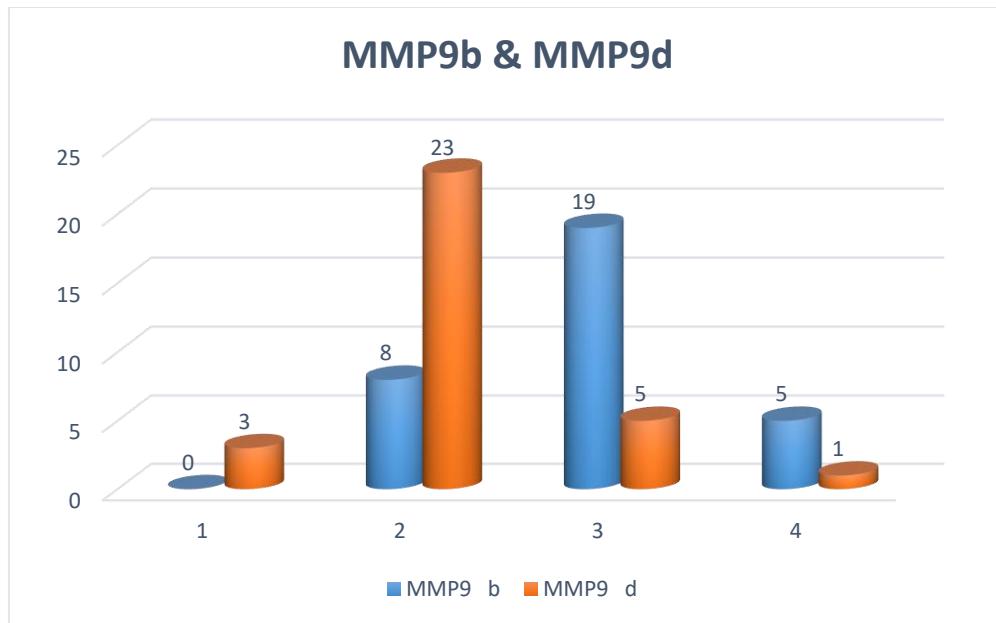
Grafikoni 22 i 23 pokazuju da je došlo do smanjenja ekspresije MMP9 u tumorskom i u zdravom tkivu poslije provedene neoadjuvantne radioterapije.

*Slika 22: Grafički prikaz ekspresije MMP9 u tumorskom tkivu prije i poslije provedene neo RHT*



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

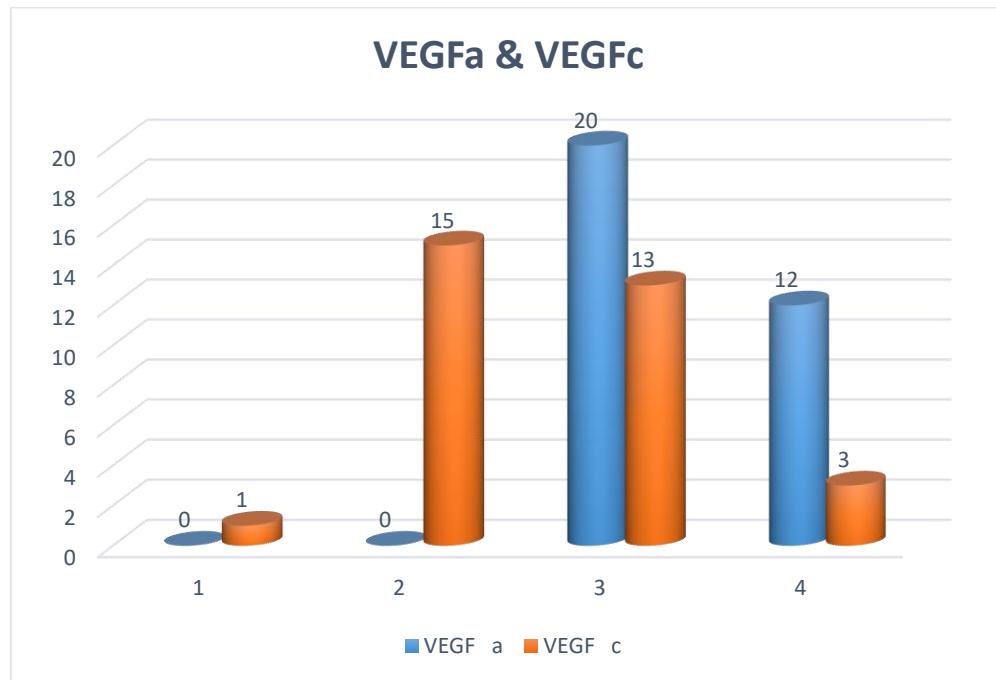
Slika 23: Grafički prikaz ekspresije MMP9 u zdravom tkivu prije i poslije provedene neo RHT



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

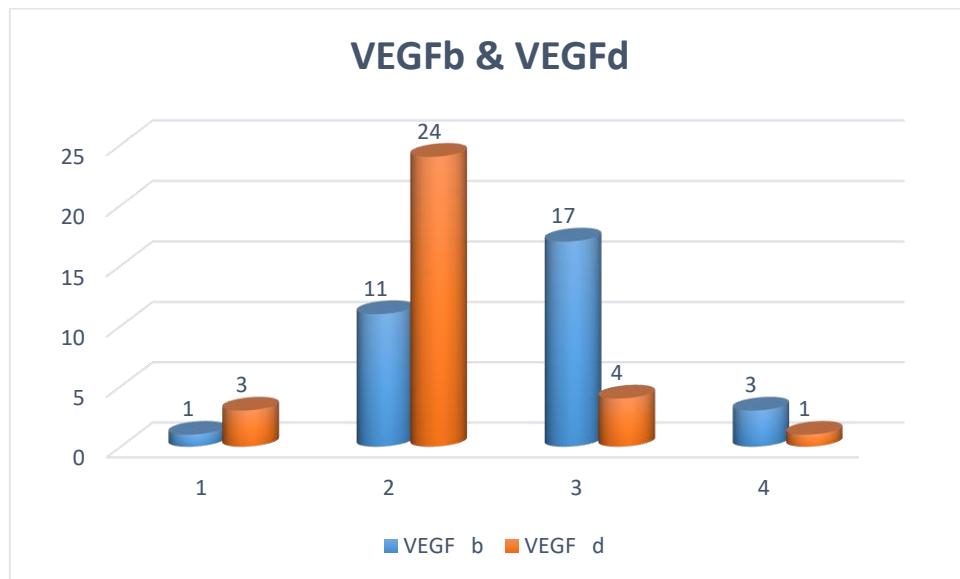
Grafikoni 24 i 25 pokazuju da je došlo do smanjenja ekspresije VEGF u tumorskom i u zdravom tkivu poslije provedene neoadjuvantne radioterapije.

*Slika 24: Grafički prikaz ekspresije VEGF u tumorskom tkivu prije i poslije provedene neo  
RHT*



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

Slika 25: Grafički prikaz ekspresije VEGF u zdravom tkivu prije i poslije provedene neo RHT



Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

#### 5.14. Povezanost ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF sa razvojem postoperativnih infekcija

U studiji je utvrđeno da je kod četiri pacijenta (12.5%), kod kojih je provedena neoadjuvantna radioterapija, došlo do razvoja postoperativne infekcije. Utvrđeno je da je u tri slučaja postojala slaba ekspresija MMP2 i MMP9 do 10%, gradus jedan, i u jednom slučaju umjerena eksresija od 10 do 50, gradus dva. Obradom podataka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna korelacija između infekcije rane i ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF kod pacijenata sa neo RHT.

*Tabela 21: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata sa neo RHT nastankom postoperativnih infekcija*

INFEKCIJA RANE		
	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>MMP2 c</b>	0,321	0,073
<b>MMP2 d</b>	0,134	0,466
<b>MMP9 c</b>	0,028	0,879
<b>MMP9 d</b>	-0,078	0,673
<b>VEGF c</b>	0,292	0,105
<b>VEGF d</b>	-0,054	0,769

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

Utvrđeno je da je kod tri pacijenta (10%) kod kojih nije provedena neoadjuvantna RHT došlo do razvoja postoperativne infekcije. Takođe je utvrđeno da je kod sva tri pacijenta postojala umjerena ekspresija MMP2 i MMP9, od 10% do 50%, gradus dva. Obradom podataka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna korelacija između infekcije rane i ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF kod nezračenih pacijenata.

*Tabela 22: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata bez neo RHT i nastanka postoperativnih infekcija*

INF RANE		
	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>MMP2 a</b>	0,176	0,353
<b>MMP2 b</b>	0,146	0,440
<b>MMP9 a</b>	0,105	0,582
<b>MMP9 b</b>	0,337	0,069
<b>VEGF a</b>	0,325	0,079
<b>VEGF b</b>	0,196	0,299

Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

### 5.15. Povezanost ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF sa razvojem enterokolitisa

U studiji je utvrđeno da je kod pet pacijenta (15,6%) kod kojih je provedena neoadjuvantna radioterapija došlo do razvoja enterokolitisa. Utvrđeno je da je kod tri pacijenta postojala izražena ekspresija MMP2 i MMP9, preko 50%, gradus tri, a kod dva pacijenta umjerena ekspresija, od 10% do 50%, gradus dva. Obradom podataka utvrđeno je da postoji statistički blago pozitivna korelacija između razvoja enterokolitisa i ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF kod zračenih pacijenata.

*Tabela 23: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata sa neo RHT i nastanka enterokolitisa*

RANA KOMPLIK. KOLITISI		
	<i>r</i>	<i>p</i>
<b>MMP2 c</b>	0,206	0,257
<b>MMP2 d</b>	-0,024	0,895
<b>MMP9 c</b>	0,140	0,444
<b>MMP9 d</b>	0,104	0,573
<b>VEGF c</b>	-0,180	0,325
<b>VEGF d</b>	-0,054	0,769

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT.

U studiji je takođe utvrđeno da je kod četiri pacijenta (13,3%) kod kojih nije provedena neoadjuvantna radioterapija došlo do razvoja enterokolitisa. Utvrđeno je da je kod tri pacijenta postojala slaba ekspresija MMP2 i MMP9, do 10%, gradus jedan, a kod jednog pacijenta umjerena ekspresija, od 10% do 50%, gradus dva. Obradom podataka utvrđeno je da nije postojala statistički značajna korelacija između razvoja enterokolitisa i ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF kod pacijenata bez RHT.

*Tabela 24: Korelacija MMP2, MMP9 i VEGF u tumorskom i zdravom tkivu kod pacijenata bez RHT i nastanka enterokolitisa*

KOLITISI		
	r	p
<b>MMP2 a</b>	0,310	0,095
<b>MMP2 b</b>	0,295	0,113
<b>MMP9 a</b>	<b>0,345</b>	<b>0,062</b>
<b>MMP9 b</b>	<b>,470**</b>	<b>0,009</b>
<b>VEGF a</b>	0,287	0,124
<b>VEGF b</b>	0,064	0,737

Legenda: Kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

#### 5.16. Učestalost reintervencija kod pacijenata sa dehiscencijom

Kod pacijenata kod kojih je provedena neoadjuvantna radioterapija dehiscencija se javila se u tri pacijenta (9,4%), a samo kod jednog pacijenta moralo se raditi hirurško zbrinjavanje dehiscencije.

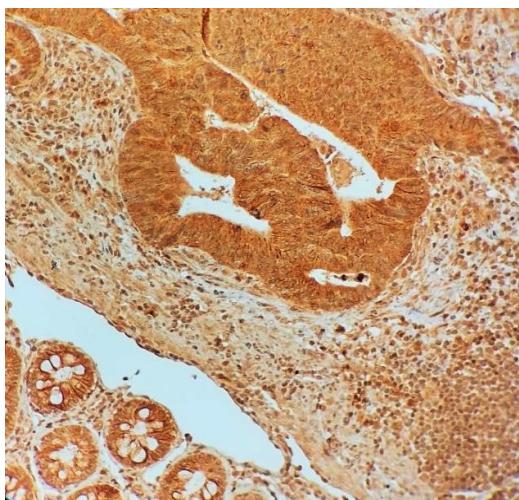
Kod pacijenata kod kojih nije provedena neoadjuvantna radioterapija dehiscencije se javila se kod dva pacijenta (6,7%). Hirurško zbrinjavanje dehiscencije kolorektalne anastomoze moralo se provesti kod jednog pacijenta. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da nije postojala statistička značajna korelacija u reintervenciji između pacijenata kod kojih je provedena neoadjuvantna radioterapija i kod kojih nije provedena.

*Tabela 25: Korelacija pacijenata sa reintervencijom i pacijenata konzervativno tretiranih*

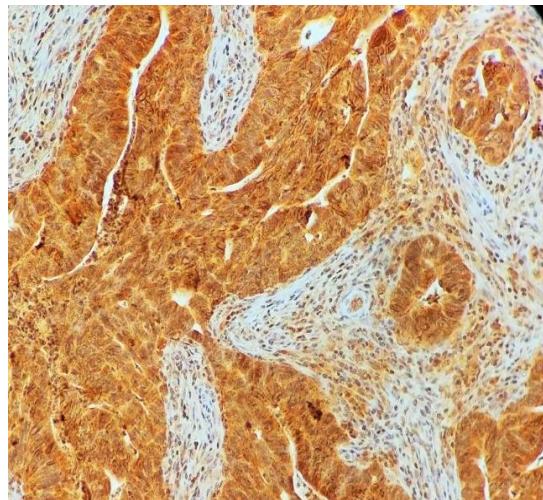
DEHISCENCIJA	Kohorta 1		Kohorta 2		UKUPNO
	REINT_DA	REINT_NE	REINT_DA	REINT_NE	
<b>DA</b>	1	2	1	1	5
<b>NE</b>	0	29	0	28	57
<b>UKUPNO</b>	1	31	1	29	62

Legenda: Kohorta 1 – pacijenti kod kojih je provedena RHT, kohorta 2 – pacijenti bez provedene RHT.

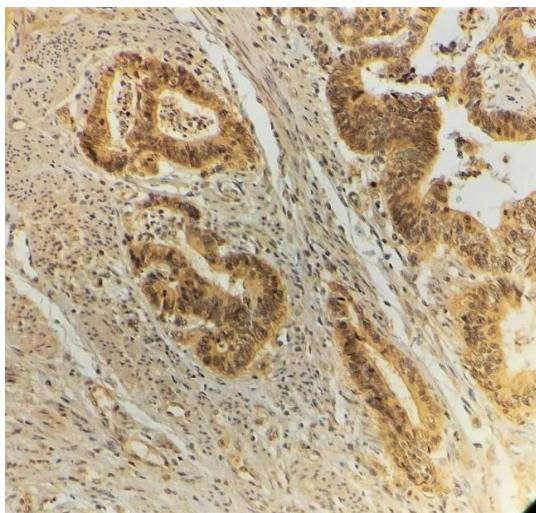
### 5.17. Slikovna prezentacija rezultata imunohistohemijске analize



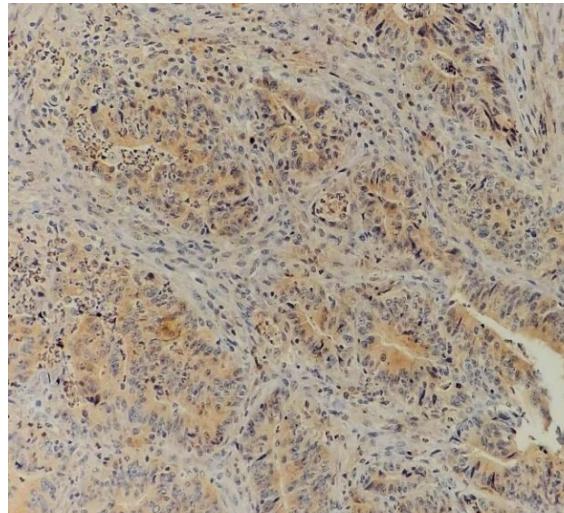
Slika 1 A



Slika 1 B

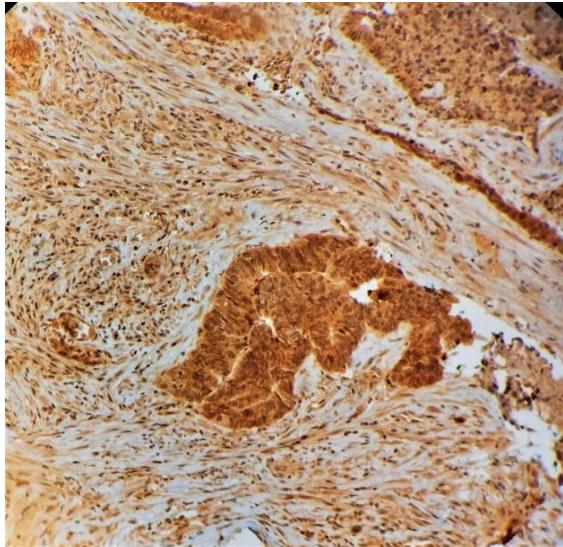


Slika 1 C

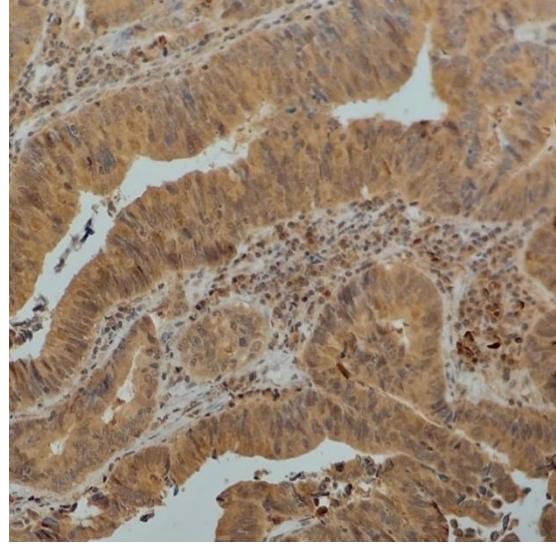


Slika 1 D

Imunohistohemijska interpretacija: *Slika 1 A* pokazuje izraženu ekspresiju VEGF u citoplazmi tumora, te u stromi; *Slika 1 B* prikazuje umjerenu ekspresiju VEGF u citoplazmi, te u stromi; *Slika 1 C* prikazuje nisku ekspresiju VEGF, dok *Slika 1 D* pokazuje potpuno odsustvo ekspresije u citoplazmi tumora i u stromi. Uvećanje je 1:100.

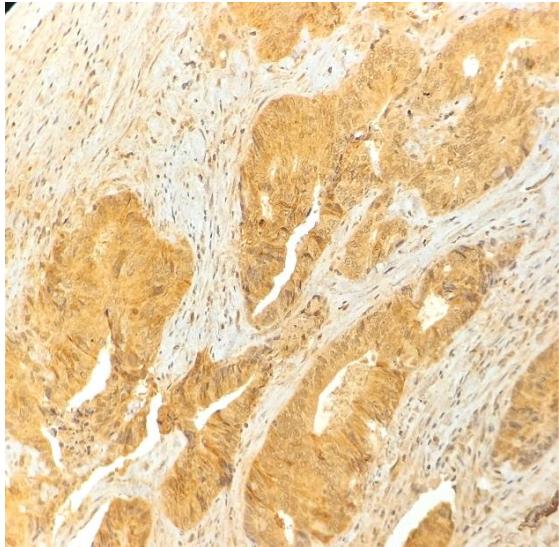


Slika 2 A

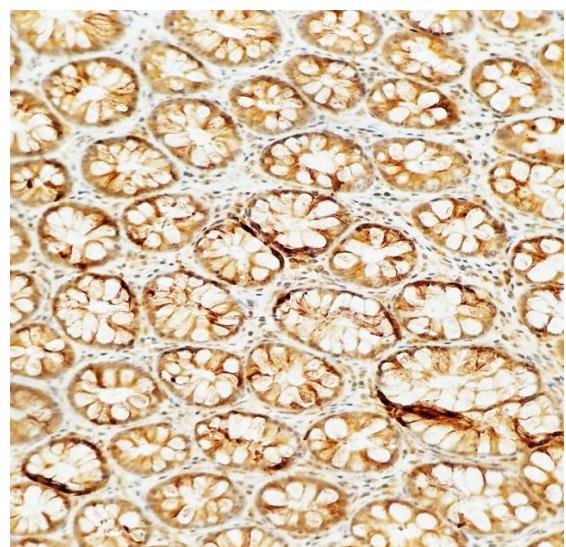


Slika 2 B

Slika 2 A prikazuje izraženu ekspresiju VEGF u tumoru i stromi prije zračenja, dok Slika 2 B pokazuje umjereni stepen ekspresije VEGF u tumoru, te u okolnoj stromi, poslije provedene neo RHT. Uvećanje je 1:100.

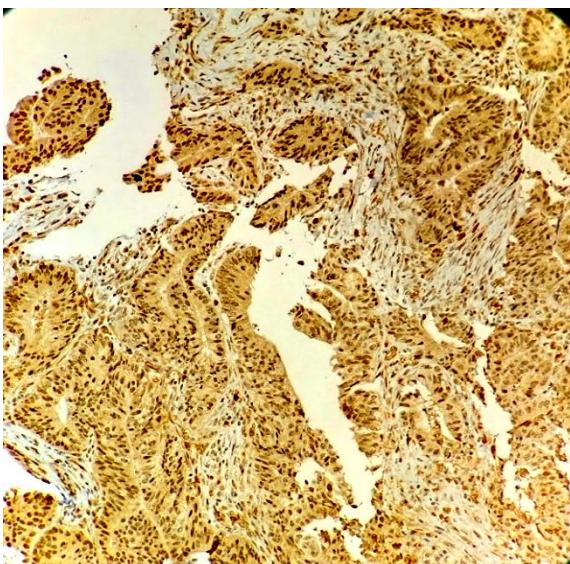


Slika 3 A

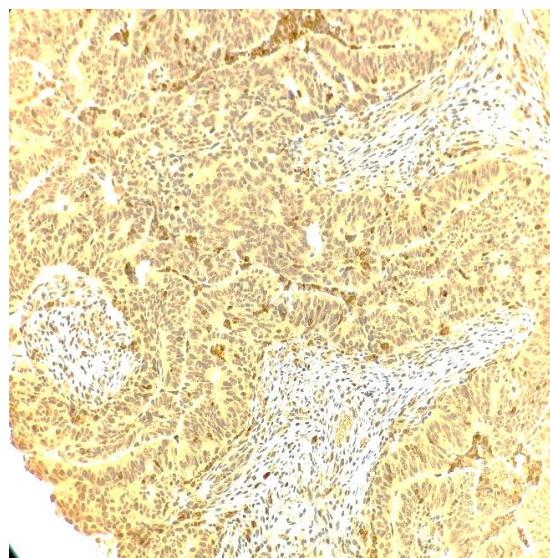


Slika 3 B

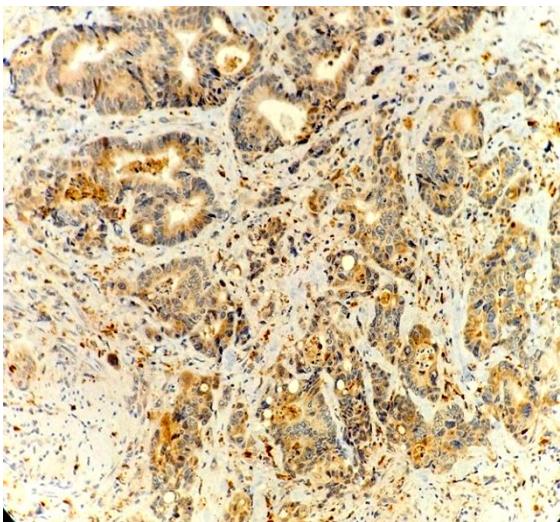
Slika 3 A pokazuje umjerenu ekspresiju VEGF u tumorskom tkivu i stromi, dok Slika 3 B pokazuje umjerenu ekspresiju VEGF u zdravom tkivu rektuma. Uvećanje je 1:100



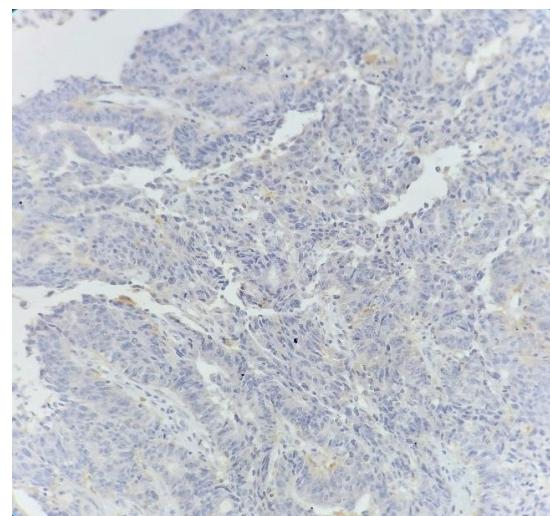
*Slika 4 A*



*Slika 4 B*

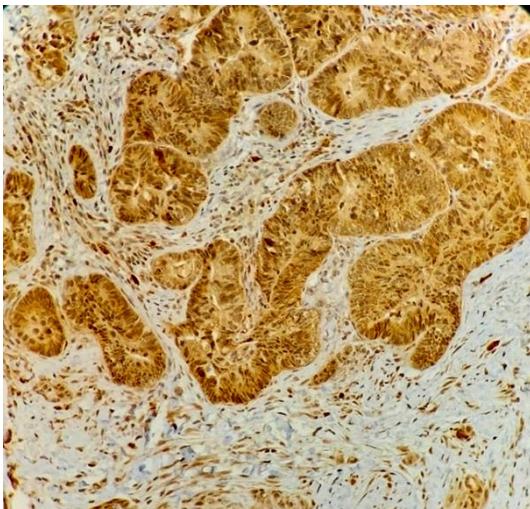


*Slika 4 C*

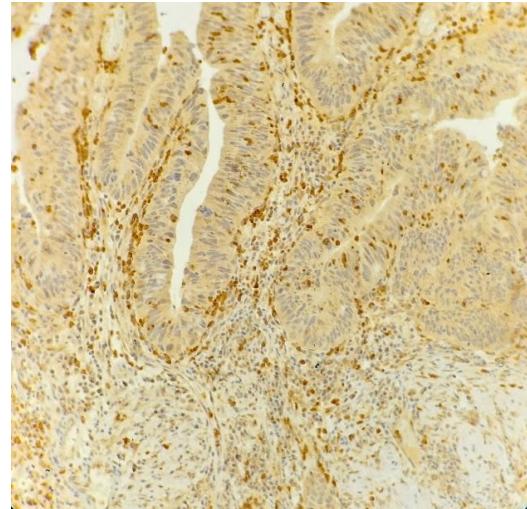


*Slika 4 D*

Imunohistohemijska interpretacija: *Slika 4 A* pokazuje izraženu ekspresiju MMP9 u citoplazmi tumora, te u stromi; *Slika 4 B* prikazuje umjerenu ekspresiju MMP9 u citoplazmi, te u stromi; *Slika 4 C* prikazuje nisku ekspresiju MMP9, dok *Slika 4 D* pokazuje potpuno odsustvo ekspresije MMP9 u citoplazmi tumora i u stromi. Uvećanje je 1:100.

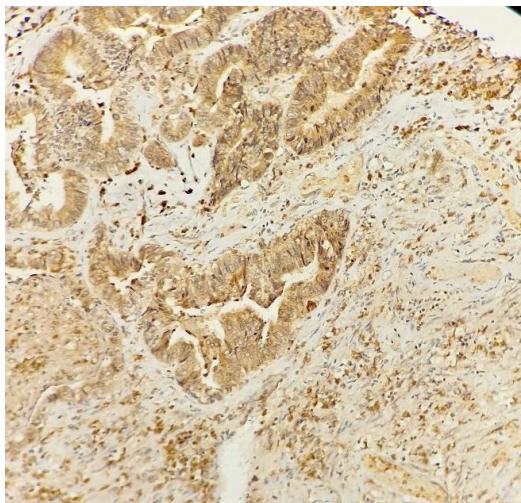


Slika 5 A

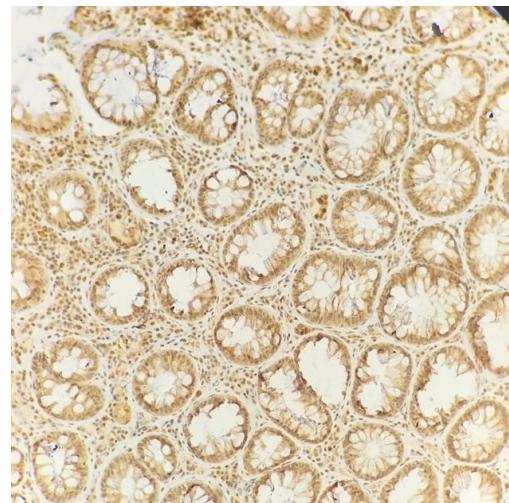


Slika 5 B

*Slika 5 A* prikazuje izraženu ekspresiju MMP9 u tumoru i stromi prije zračenja, dok *Slika 5 B* pokazuje umjereni stepen ekspresije MMP9 u tumoru, te u stromalnom tkivu, poslije provedene neoadjuvantne radiohemoterapije. Uvećanje je 1:100.

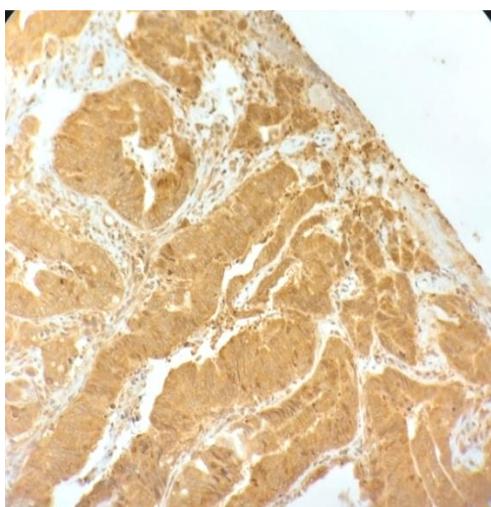


Slika 6 A

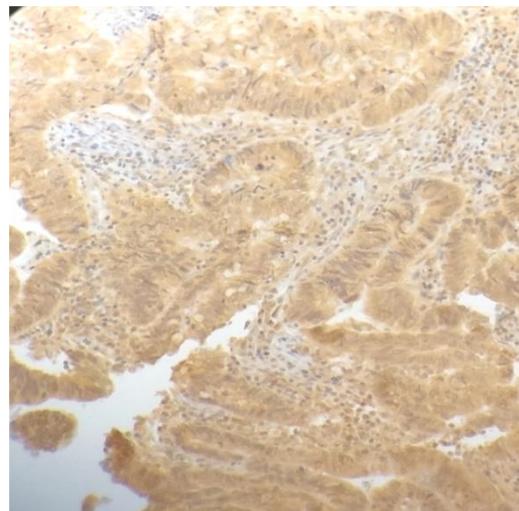


Slika 6 B

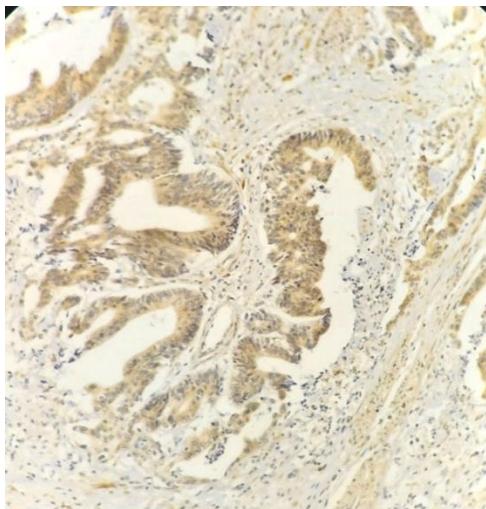
*Slika 6 A* pokazuje izraženu ekspresiju MMP9 u tumorskom tkivu i stromi, dok *Slika 6 B* pokazuje izraženu ekspresiju MMP9 u zdravom tkivu rektuma. Uvećanje je 1:100.



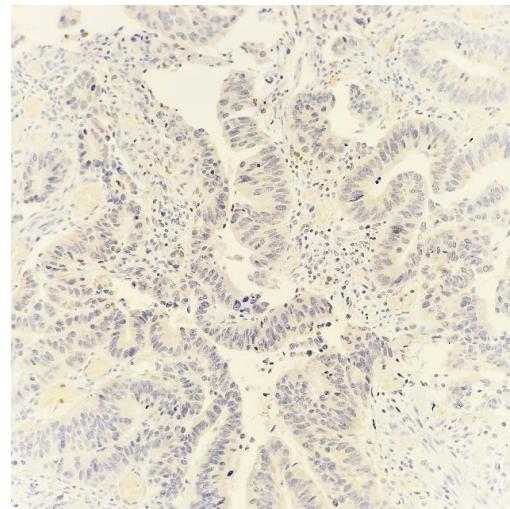
Slika 7 A



Slika 7 B

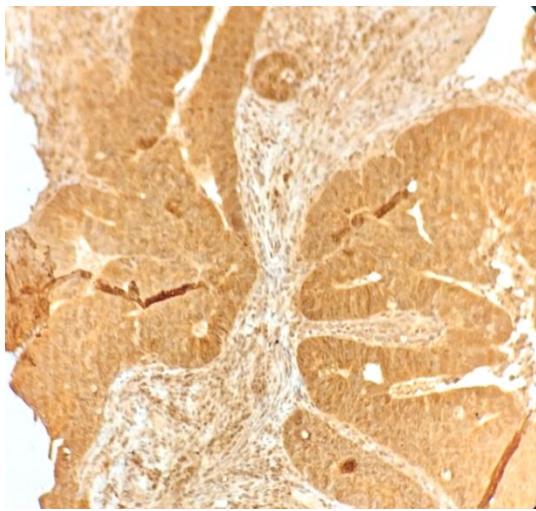


Slika 7 C

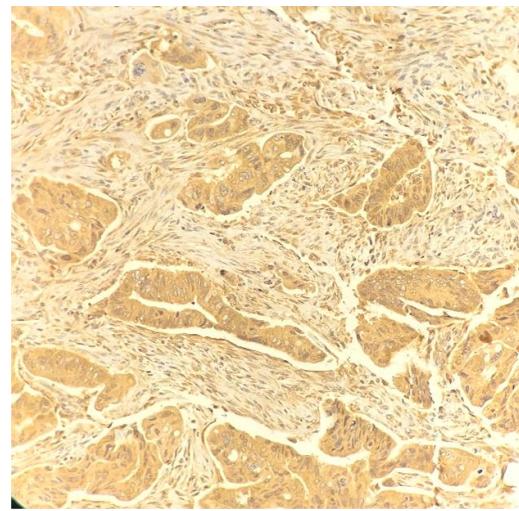


Slika 7 D

Imunohistohemijska interpretacija: *Slika 7 A* pokazuje izraženu ekspresiju MMP2 u citoplazmi tumora, te u stromi; *Slika 7 B* prikazuje umjerenu ekspresiju MMP2 u citoplazmi, te u stromi; *Slika 7 C* prikazuje nisku ekspresiju MMP2, dok *Slika 7 D* pokazuje potpuno odsustvo ekspresije MMP2 u citoplazmi tumora i u stromi. Uvećanje je 1:100.

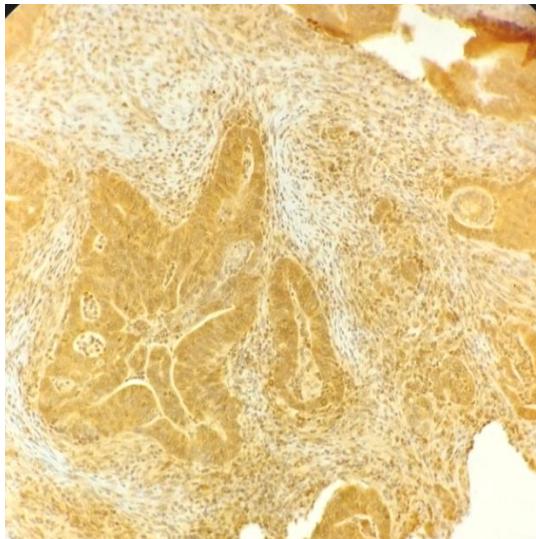


Slika 8 A

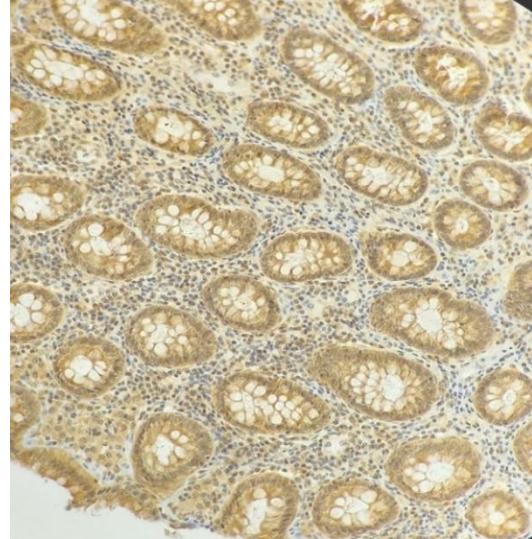


Slika 8 B

Slika 8 A prikazuje izraženu ekspresiju MMP2 u tumoru i stromi prije zračenja, dok Slika 8 B pokazuje umjereni stepen ekspresije MMP2 u tumoru, te u okolnoj stromi poslije provedene neoadjuvantne radiohemoterapije. Uvećanje je 1:100.



Slika 9 A



Slika 9 B

Slika 9 A pokazuje izraženu ekspresiju MMP2 u tumorskom tkivu i stromi, dok Slika 9 B pokazuje nisku ekspresiju MMP2 u zdravom tkivu rektuma. Uvećanje je 1:100.

## 6. DISKUSIJA

Prema dosadašnjim dostupnim podacima broj kolorektalnih karcinoma u stalnom je porastu kod osoba oba pola. Takođe, broj oboljelih od kolorektalnog karcinoma u porastu je u svim industrijski razvijenim zemljama. Brojni faktori rizika mogu uticati na nastanak kolorektalnog carcinoma, kao što su: inflamatorne bolesti crijeva, dijabetes melitus, socijalne navike, gojaznost, godine, pol i primjena radioterapije. Broj oboljelih značajno je veći kod osoba muškog pola nego kod osoba ženskog pola. Takođe, učestalost karcinoma rektuma povećava se kod pacijenata iznad 65 godine života<sup>130</sup>. Brojne studije ukazuju i na veću učestalost kolorektalnog karcinoma kod osoba muškog pola, koja iznosi 0,65%, u odnosu na osobe ženskog pola (0,45%) na 100.000 stanovnika. Takođe, iste studije ukazale su na veću učestalost nastanka kolorektalnog karcinoma kod pacijenata starijih od 50 godina<sup>131,132</sup>. Rawla i autori utvrdili su da je učestalost kolorektalnog karcinoma 30 puta veća kod pacijenata od 50 do 64 godine u odnosu na pacijente od 25 do 49 godina, a prosječne godine dijagnostikovanja kolorektalnog karcinoma su od 68 do 72 godine<sup>133</sup>. Prema Američkom uduženju za borbu protiv kancera utvrđeno je da kod muškaraca postoji 30% veća učestalost za nastanak karcinoma u odnosu na žensku populaciju. Ista je studija utvrdila da osobe muškog pola imaju lošiju prognozu, te 40% veću smrtnost nego osobe ženskog pola<sup>134</sup>. Estva i autori u svojoj studiji utvrdili su da je više od 90% pacijenata oboljelih od karcinoma rektuma bilo starije od 50 godina, s tim da je prevalenca bila izraženija u sedmoj deceniji<sup>135</sup>. Vuik i autori u svojoj studiji takođe su utvrdili da je najveći broj oboljelih od karcinoma rektuma bio preko 50 godina starosti, a u njihovoј studiji broj pacijenata ispod 50 godina kretao se od 1,6% do 7,6%, u zavisnosti od godina<sup>136</sup>.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je utvrđen veći broj pacijenata muškog pola koji su oboljeli od karcinoma rektuma. Naša studija pokazala je i da je kod pacijenata muškog pola postojalo više postoperativnih komplikacija. Međutim, analizom je utvrđeno da nije postojala statistička značajnost povezanosti između pola i učestalosti nastanka karcinoma. Zbog svega navedenog veoma je bitna rana dijagnostika i liječenje kolorektalnog karcinoma.

Liječenje kolorektalnog carcinoma multidisciplinarno je, ali hirurški tretman ipak predstavlja najvažniji metod liječenja. Hirurško liječenje podrazumijeva uklanjanje tumora, te uspostavljanje kontinuiteta digestivnog trakta, uz obavljanje totalne mezorektalne ekscizije.

Osnovnu suštinu operacije čini totalna mezorektalna ekscizija (TME), koja danas predstavlja zlatni standard u kolorektalnoj hirurgiji. Ona se zasniva na činjenici da širenje karcinoma ostaje unutar mezorektalne fascije, a operacija podrazumijeva resekciju tumora i mezorektalnog tkiva do pelvične dijafragme kroz avaskularnu zonu<sup>137,138</sup>.

Zahvaljujući unapređenju hirurške tehnike i primjeni properativne radioterapije značajno se povećao broj pacijenata sa karcinomom rektuma kojima je očuvana funkcija sfinktera. Međutim, i pored unapređenja hirurške tehnike, kao i uvođenja moderne medicinske opreme, i dalje postoji značajan broj postoperativnih komplikacija, koje produžavaju i poskupljuju liječenje, a mogu da dovedu i do smrtnog ishoda<sup>139</sup>. Značajan napredak u liječenju kolorektalnog karcinoma postignut je uvođenjem neoadjuvantne radiohemoterapije i ona se danas smatra zlatnim standardom u liječenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma II i III stadijuma<sup>140</sup>. Sauer i saradnici u svojoj studiji utvrdili su redukciju veličine tumora, kao i povećanje petogodišnjeg preživljavanja kod pacijenata kojima je prije hirurškog tretmana provođena neoadjuvantna radiohemoterapija. Takođe, ova je studija pokazala da postoji poboljšanje rezultata sa povećanjem sfinkter prezervirajućih operacija<sup>141</sup>. Roh i saradnici u svojoj studiji takođe su utvrdili da neoadjuvantna radiohemoterapija povećava stopu sfikter prezervirajućih operacija kao iznačajno bolju lokalnu kontrolu kod pacijenata sa II i III stadijumom karcinoma rektuma. Takođe, u ovoj studiji utvrđeno je da kod pacijenata kod kojih je provedena neoadjuvantna radiohemoterapija dolazi do povećanja petogodišnjeg perioda bez bolesti i povećanja ukupnog broja preživljavanja<sup>142</sup>.

Neoadjuvantna radiohemoterapija dovodi do smanjenja veličine tumora i sniženja tumorskog stadijuma karcinoma rektuma prije hirurškog tretmana (*downsizing i downstaging*), te na taj način omogućuje prevođenje pojedinih tumora iz inoperabilnog stadijuma u operabilni. Zahvaljujući tome obezbjeđuje se resekabilnost tumora i u mnogim slučajevima omogućuje i R0 resekciju<sup>143,144</sup>. Valentini i autori u svojoj studiji utvrdili su da je od 30% do 50% pacijenata

sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma imalo pozitivan odgovor na primljenu neoadjuvantnu radiohemoterapiju, a to se manifestovalo smanjenjem gradusa tumora.

Regresija tumora svakako zavisi i od patohistološkog gradusa tumora, od ukupne doze zračenja, od vrste citostatika, te od vremenskog raspona od primljene neoadjuvantne terapije do operativnog zahvata. Takođe, oni su u ovoj studiji utvrdili smanjenje stope lokalnog recidiva u odnosu na pacijente kod kojih je proveden samo operativni zahvat<sup>145</sup>.

Postoperativne komplikacije mogu se podijeliti na opšte i specifične. Od važnijih postoperativnih komplikacija to su: infekcija operativne rane, paralitički ileus, postoperativno krvarenje, duboka venska tromboza i svakako dehiscencije anastomoze kao jedne od najtežih komplikacija u kolorektalnoj hirurgiji<sup>146</sup>. Postoperativno krvarenje kao komplikacija prisutno je od 1% do 14%, i, iako po svojoj težini predstavlja ozbiljnu komplikaciju, rijetko dovode do smrtnog ishoda. U najvećem broju slučajeva zbrinjavanje se vrši davanjem transfuzija krvi. Golda i autori u svojoj studiji nastojali su da utvrde osnovne uzroke za nastanak postoperativnog krvarenja. Kao faktori krvarenja identifikovani su: pol, godine starosti, nizak nivo hemoglobina preoperativno, komorbiditeti, te dodatne hirurške procedure<sup>147</sup>. Postoperativni ileus takođe je jedna od komplikacija koja se javlja poslije operacija na rektumu. Ova se komplikacija javlja poslije velikih operativnih zahvata na abdomenu, a manifestuje se disfunkcijom i smanjenom pokretljivosti crijeva, što dovodi do otežane pasaže i zastoja crijevnog sadržaja<sup>148</sup>. Učestalost postoperativnog ileusa poslije operacija na rektumu i kolonu kreće se od 10% do 30%. Vather i saradnici su svojoj studiji naveli su da kod pacijenata sa postoperativnim ileusom dolazi do produženja hospitalizacije i značajnog povećanja troškova liječenja. Kod ovih pacijenata postojala je nadutost abdomena, odsustvo crijevnih zvukova, te nemogućnost oralnog uzimanja hrane, a sve to dovelo je do dehidratacije, elektrolitnog disbalansa, a u pojedinim slučajevima i do razvoja respiratornih komplikacija<sup>149</sup>. Pravi razlog nastanka postoperativnog ileusa nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da velika ranjiva površina, manipulacija sa mikrotraumama na crijevima, neadekvatna vertikalizacija pacijenata, te primjena velikih doza anestetika i analgetika mogu biti jedan od razloga za nastanak postoperativnog ileusa.

Grass i autori u svojoj studiji naveli su da povećan parenteralni unos tečnosti može da dovede do edema crijeva, te otežane pasaže crijevnog sadržaja, i na taj način mogu dovesti do razvoja ileusa. Takođe, oni su utvrdili veću učestalost postoperativnog ileusa kod pacijenta muškog pola, što se objašnjava manjom tolerancijom muških pacijenta na bol. To dovodi do pojačanog lučenja kateholamina i do poremećaja u pasaži crijeva<sup>150</sup>.

I u našoj studiji postoperativni ileus predstavlja je značajnu komplikaciju. Registrovan je kod šest pacijenata, jedan od pacijenata zahtjevao je ponovni operativni zahvat, dok je kod ostalih pacijenata na primjenjen konzervativni tretman došlo do poboljšanja i uspostavljanja pasaže crijeva. Kod pacijenta kod kojeg je rađen ponovni operativni zahvat nastupilo je uklještenje vijuga tankog crijeva u maloj karlici. Novonastalo stanje zbrinuto je oslobođanjem slijepljenih vijuga tankog crijeva (adheziolizom), bez potrebe za resekcijom crijeva.

Svakako jedna od najtežih postoperativnih komplikacija jeste dehiscencija kolorektalne anastomose, koja, pored produžavanja vremena hospitalizacije i povećanja troškova liječenja, može značajno uticati na postoperativni kvalitet života pacijenata, a u pojedinim slučajevima može završiti i sa smrtnim ishodom.

Brzo i adekvatno zarastanje hirurške rane predstavlja osnovni cilj svakog hirurškog liječenja, jer svaki poremećaj u zarastanju anastomoza dovodi do ozbiljnih komplikacija koje kasnije utiču na kvalitet života, a mogu dovesti i do smrtnog ishoda. Zarastanje svake rane složen je proces u kojem organizam mora postići hemostazu, dekontaminirati mjesto rane, pokriti ranu i izazvati ćelijsku diferencijaciju, kako bi se stvorili svi slojevi tkiva i na taj način povratio integritet, snaga i funkcija.

Takođe, Glover i autori u svojoj studiji utvrdili su da je hipoksija značajan faktor za nastanak dehiscencije. Oni su utvrdili da sva stanja, kao što su infekcije i druge upalne promjene, dovode do povećane potrošnje kiseonika i na taj način do hipoksije tkiva, a što za posljedicu može da ima nastanak dehiscencije anastomoze pojačanim aktiviranjem MMP9<sup>151</sup>. Sun i autori, međutim, u svojoj studiji na životinjama utvrdili su da nije bilo razlike u dehiscenciji i brzini popuštanja gastrointestinalnih anastomoza, koje su bile devaskularizirane i na taj način sugerisali su da pad vaskularizacije i hipoksija nisu dominantni faktori zarastanja anasomoza<sup>152</sup>.

Lokalna primjena kisonika na crijevne anastomoze nije ni do danas u potpunosti ispitana, ali su urađena određena ispitivanja u kojima su primjenjivani biomatrijali kao što su nano kristali kalcijumovog peroksida. Ovi biomaterijali ugrađivani su u šavne materijale kao što su Vicryl, a koji su nakon plasiranja u tkivo i u dodiru sa vodom oslobađali kisonik i na taj način značajno poboljšavali održivost ćelija u hipoksičnim i normoksičnim uslovima<sup>153</sup>. Blanko i autori, međutim, u svojim studijama utvrdili su da hipoksija kao posljedica slabije vaskularizacije može da bude značajan uzrok nastanka dehiscencije anastomoze. Oni su u svojim studijama utvrđivali stepen vaskularizacije na mjestu resekcione linije, tako da su na mjestima resekcione linije gdje je bila slabija vaskularizacija i posljedična hipoksija imali češći nastanak dehiscencije anastomose, u odnosu na slučajeve gdje je na mjestu resekcije bila bolja vaskularizacija. U određivanju stepena vaskularizacije na resepcionoj liniji koristili su indocijaninsko zeleno, koje je u slučaju dobre vaskularizacije postajalo tamnozeleno<sup>154</sup>.

Drugi značajan faktor za koji se smatra da utiče na nastanak dehiscencije anastomoze jeste prisustvo bakterija u rani koja zarasta. U procesu zarastanja rane makrofagi neutrališu patogene, koji u predjelu rane mogu dovesti do poremaćaja fine ravnoteže sinteze i razgradnje proteina. To sve dovodi do povećanja aktivnosti proteaza i do povećane razgradnje proteina, što za onda dovodi do abnormalnog zarastanja rane i time do pojave dehiscencije anastomoze<sup>155</sup>. Shogan i autori u svojoj studiji utvrdili su da fiziološki stres hiruruškog zahavata značajno mijenja ekologiju i sastav crijevnih mikroba, pa mogu u pojedinim slučajevima i do 500 puta povećati brojnost pojedinih sojeva Enterococcus-a. Ove bakterije u predjelu anastomoze mogu aktivirati proteaze domaćina kao što je MMP9, što dovodi do poremećaja u zarastanju rane i do povećanja vjerovatnoće za nastanak dehiscencije anastomoze<sup>156,155</sup>. Nelson i autori u svojoj studiji takođe su utvrdili da poremećaj bakterija crijevne flore mogu dovesti do veće učestalosti nastaka crijevne dehiscencije. Oni su pojedinim eksperimentalnim grupama davali antibiotsku terapiju, pri čemu je došlo do poboljšanja ishemije i do urednog zarastanja anastomoza, dok je u drugim grupama koji su primali samo fiziološku otopinu došlo do pojave dehiscencije anastomoze i razvoja peritonitisa<sup>157</sup>.

Ohigashi i autori u svojoj studiji utvrdili su da prisustvo bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*) u većim količinama mogu, nezavisno od tehnike anastomose,

izazvati dehiscencije anastomoze. Ove bakterije imaju sposobnost da u većim količinama proizvode enzim kolagenazu, koja ima sedam puta veću aktivnost u razgradnji kolagena. Takođe kolagenaze proizvedene od ovih bakterija imaju sposobnost da u tkivima crijeva povećavaju proizvodnju i aktivnost MMP9, a koja ima veliku sposobnost destrukcije tkiva i na taj način dovode do nastanka dehiscencije anastomoze<sup>158</sup>.

Od ostalih faktora koji mogu uticati na zarastanje anastomoze značajna je preoperativna radioterapija. U pojedinim studijama utvrđeno je da preoperativna radioterapija u određenom broju slučajeva može dovesti do parcijalne dehiscencije kolorektalne anastomoze i do ograničenog anastomotskog curenja<sup>159</sup>. Trenchev i autori u svojoj studiji utvrdili su da preoperativna radioterapija dovodi do parcijalne dehiscencije i anastomotskog curenja u 2,80 puta više nego kod pacijenata kod kojih nije provedena preoperativna radioterapija. Oni su svojoj studiji naveli da zbog provedene radioterapije dolazi do vaskulitisa i hronično upalnih promjena na tkivu, što dovodi do poremećaja u zarastanju novonastale anastomoze i anastomotskog curenja<sup>160</sup>. Park i autori u svojoj studiji utvrdili su da, iako preoperativna radioterapija ima veliki značaj u smanjenju lokalnih recidiva i povećanju petogodišnjeg preživljavanja, ona istovremeno ima veliki spektar štetnog djelovanja na crijevno tkivo i na zarastanje rane, i na taj način značajno doprinosi nastanku dehiscencije kolorektalne anastomoze. Pretpostavlja se da je mehanizam nastanka ove perforacije arterijska mikroembolijska bolest, koja dovodi do ishemije crijeva i do posljedične dehiscencije anastomoze<sup>161</sup>. Međutim, danas postoje i brojne studije u kojima je utvrđeno da nema značajne razlike u nastanku dehiscencije kolorektalne anastomoze kod pacijenata kod kojih je provedena preoperativna radioterapija u odnosu na pacijente kod kojih je urađena kolorektalna anastomoza bez prethodne radioterapije. U našoj studiji smo utvrdili da nije postojala statistički veća učestalost nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze kod pacijenata kod kojih je provedena preoperativna radioterapija i operativni zahvat u odnosu na pacijente kod kojih je rađen samo operativni zahvat. U prvoj kohorti, u kojoj su bili zračeni pacijenti, bile su tri dehiscencije kolorektalne anastomoze, dok su u drugoj kohorti, u kojoj pacijenti nisu zračeni, bila dva pacijenta sa dehiscencijom anastomoze.

Dijabetes melitus takođe predstavlja značajan faktor rizika za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze. Dijabetes melitus pogađa sve faze zarastanja rana, i to hemostazu, upalu, proliferaciju i fazu remodeliranja. Sve to u značajnoj mjeri utiče na povećanje rizika za nastanak dehiscencije anastomoze i dovodi nastanka morbiditeta i mortaliteta. Dijabetes melitus izaziva trajnu upalnu fazu sa poremećajem u stvaranju zrelog granualcionog tkiva i smanjenje vlačnaste čvrstoće rane. Sve to dovodi do poremećaja angiogenog odgovora i mikrovaskularnih komplikacija, poremećaja funkcije makrofaga i neutrofila, poremećaja migracije i proliferacije fibroblasta, te poremećaja proizvodnje faktora rasta i faktora zarastanja rana<sup>162</sup>. Ziegler i autori u svojoj studiji utvrdili su da dijabetes melitus ima značajnu ulogu u nastanku dehiscencije anastomoze, a takođe je utvrđeno da kod pacijenta sa dijabetesom melitusom postoji značajno veća smrtnost (26,3%) u odnosu na pacijente bez dijabetesa, kod kojih je smrtnost iznosila 4,5%<sup>163</sup>.

Dinh i autori su u svojoj studiji utvrdili da poremećaj u zarastanju anastomoza nastaje kao posljedica složenih patofizioloških procesa, koje podrazumijevaju vaskularne, neuropatske, imunologičke i biohemijske komponente. Hiperglikemija dovodi do strukturalnih promjena u zidovima krvnih sudova, što dovodi do promjene u vaskularizaciji, te mikrovaskularnih poremećaja sa posljedičnom hipoksijom. Takođe, promjene u zidu krvnih sudova dovode do poremećaja migracije leukocita, a sama hiperglikemija može dovesti do oštećenja funkcije leukocita i drugih elemenata bitnih za zarastanje anastomoza. Periferna neuropatija kao posljedica hiperglikemije dovodi do smanjenja osjetljivosti za bol, što može dovesti do otežane dijagnostike i liječenja<sup>164</sup>. Lyn i autori u svojoj studiji utvrdili su da je dijabetes melitus značajan faktor rizika za nastanak postoperativnih komplikacija u kolorektalnoj hirurgiji. Najznačajnija komplikacija kao posljedica dijabetesa melitusa jeste parcijalna dehiscencija anastomoze i anastomotsko curenje. Pored ovoga, dijabetes dovodi i do nekih drugih postoperativnih komplikacija, i to plućnih komplikacija (kao što su upale pluća), te u manjoj mjeri i do uroloških komplikacija. U ovoj studiji utvrđeno je da dijabetes melitus značajno doprinio povećanju rizika od tridesetodnevne smrtnosti<sup>165</sup>.

U našoj studiji utvrdili smo da je dijabetes melitus imao statističku značajnost u nastanku dehiscencije kolorektalne anastomoze u odnosu na pacijente bez dijabetesa. Dehiscencija

kolorektalne anastomoze javila se kod četiri pacijenta koji su kao komorbiditet bolovali od dijabetes melitusa.

Takođe, važnu ulogu u nastanku dehiscencije anastomoze ima pol pacijenta, jer je utvrđeno da se dehiscencije češće javljaju kod osoba muškog pola. Pojedini autori smatraju da je veća učestalost dehiscencije posljedica same anatomije muške karlice, te vjerovatnoće veće traume rektuma prilikom preparisanja i provođenja totalne mezorektalne ekscizije. Takođe, zbog manipulacije može doći i do trauma vaskularnih struktura bataljka rektuma, što za posljedicu dovodi do ishemijskih promjena u tkivu i stvara uslove za nastanak dehiscencije anastomoze<sup>166</sup>. Tanaka i autori u svojoj studiji takođe su ukazali da pol ima značajnu ulogu u nastanku dehiscencije kolorektalne anastomoze. Oni su u svojoj studiji analizirali faktore rizika za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomose, pri čemu je pol pacijenta bio jedini identifikovani faktor rizika, a dehiscencija je bila 13,2 puta veća kod muškaraca nego kod žena<sup>167</sup>. Međutim, i pored brojnih studija o povezanosti muškog pola sa većom učestalošću dehiscencije anastomose, u našoj je studiji utvrđeno da nije postojala statistički značajna povezanost muškog pola i nastanka dehiscencije anastomoze.

Visina kolorektalne anastomoze po pojedinim studijumima takođe spada u faktore rizika za nastanak dehiscencije anastomose, jer je dokazano da što je anastomoza kreirana niže na rektumu to je veća vjerovatnoća nastanka dehiscencije. Kao razlog ove činjenice mogla bi se u obzir uzeti pažljiva i minuciozna hirurška tehnika, kao i posebna pažnja prilikom zbrinjavanja vaskularnih struktura i obezbjeđivanja adekvatne vaskularizacije crijeva.

Pojedine su studije utvrdile da rizik od nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze opada sa povećanjem visine anastomoze, tako je učestalost dehiscencije na donjoj trećini 14,1%, učestalost dehiscencije na srednjoj trećini 8,7%, a na gornjoj trećini 2,6%. Takođe je utvrđeno da se dehiscencije anastomoze mnogo češće javljaju na rektumu nego na kolonu<sup>168</sup>.

Kao što smo već naveli, dehiscencija kolorektalne anastomoze do današnjih dana ostala je jedna od najtežih i dosad nedovoljno razjašnjenih komplikacija u kolorektalnoj hirurgiji. Iako se najveći broj dehiscencije kolorektalne anastomoze dešava u prvim postoperativnim danima, i to u periodu od trećeg do desetog postoperativnog dana, u pojedenim je studijama utvrđeno da

se dehiscencija anastomoze u 25–40% slučajeva može javiti i do 30 dana poslije operacije<sup>169</sup>. Jutesten i autori u svojoj studiji to objašnjavaju činjenicom da se u brojnim situacijama, zbog asimptomatskih slučajeva ili slučajeva sa blagim simptoma i zbog kasne dijagnostike, minimalne dehiscencije ne dijagnostikuju na vrijeme ili se uopšte ne dijagnostikuju<sup>170</sup>. Zbog činjenice da dehiscencija kolorektalne anastomoze dovodi do značajnog povećanja morbiditeta i mortaliteta, a u nekim slučajevima i do relapse osnovne bolesti, danas se u brojnom studijama pokušavaju izdvojiti odgovarajući prediktivni faktori na osnovu kojih bi se ciljano kod pojedinih pacijenata mogao predvidjeti nastanak dehiscencije. Na taj bi se način kod pacijenata kod kojih postoji povećani rizik za nastanak dehiscencije anastomoze i pratećih komplikacija mogla primijeniti odgovarajuća priprema i terapija, kojom bi se omogućila njena prevencija. U našoj studiji kao prediktivne faktore izdvojili smo matriks metaloproteinaze MMP2 i MMP9, te vaskularni endotelni factor rasta VGEF, čije su vrijednosti mjerene u samom tumorskom tkivu, te u neposrednoj blizini tumora. Brojni autori takođe su koristili MMP2, MMP9 i VGEF kao prediktivne faktore za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze. Hawinkels i autori utvrdili su da su MMP2, MMP9 i VGEF glavni faktori koji olakšavaju invaziju i angiogenezu, odnosno razgradnju ekstracelularnog matriksa, i koji pospješuju angiogenezu.

Krarup i autori utvrdili su da fiziološki i patološki faktori, koji su važni za regeneraciju tkiva na mjestu anastomose, zavise od ravnoteže MMP i tkivnog inhibitora MMP. Utvrdili su da MMP ima značajnu ulogu u razvoju dehiscencije anastomoze kroz inhibiciju sinteze kolagena. U svojoj studiji na ljudima i životinjama utvrdili su da koncentracija gena kolagena tipa I i tipa III na mjestu anastomoze nije dostigla normalne vrijednosti do sedmog dana poslije operacije. Oni su na životinjskim modelima utvrdili da je zarastanje anastomoze na debelom crijevu poboljšano inhibicijom MMP<sup>171</sup>.

Edomskis i autori u svojoj studiji utvrdili su da je tkivo debelog crijeva kod pacijenata sa lošim anastomotskim zarastanjem pokazivalo veću ekspresiju MMP1 i MMP2 u sluznici, te veću ekspresiju MMP2 i MMP9 u submukozi. Takođe, u tkivu debelog crijeva kod pacijenata sa dehiscencijom utvrđene su značajno niže koncentracije kolagena I i III, u odnosu na tkivo debelog crijeva gdje se odvijalo normalno zarastanje. Oni su u svojoj studiji tokom osam dana poslije kolorektalne operacije pratili vrijednosti MMP 1, 2, 3, 8 i 9, te vrijednosti tkivnog

inhibitora matriks proteinase TIMP. Utvrđeno je da njihove vrijednosti variraju u zavisnosti od vrste operacije, dužine trajanja operacije i da su u odnosu sa nastankom komplikacija. Utvrđeno je i da su samo vrijednosti MMP2 i MMP9 imale pozitivnu korelaciju sa nastankom dehiscencije anastomoze, a da su vrijednosti TIMP1 i TIMP2 imali negativnu korelaciju sa nastankom dehiscencije. Oni su sugerisali da vrijednosti MMP i TIMP mogu djelovati kao biomarkeri zarastanja anastomoza i hirurškog ishoda<sup>172</sup>.

Halade i autori u studiji koju su provodili takođe su utvrdili povezanost produkcije MMP i nastanka dehiscencije anastomoze. Oni su utvrdili da poslije resekcije rektuma i formiranja kolorektalne anastomoze dolazi do pojačane produkcije MMP2 i MMP9, što je uzrokovalo pojačanu razgradnju kolagena na mjestu anastomoze i češće dovodilo dehiscencije anastomoze. Takođe utvrdili su da veća količina MMP u biptiranom tkivu tumora kod pacijenata, koja je provedena preoperativno, ukazivala je na veću vjerovatnoću nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze. Takođe, povećane vrijednosti inhibitora MMP bili su parameter koji je ukazivao na veću sigurnost kolorektalne anastomoze i manju vjerovatnoću nastanka dehiscencije<sup>173</sup>.

Schelter i autori u provođenim studijama utvrđivali su značaj povećane aktivnosti MMP u nastanku karcinoma i u postoperativnim komplikacijama. Oni su utvrdili da MMP2 i MMP9 imaju veoma važnu ulogu u procesu angiogeneze, te da nekontrolisana aktivnost MMP dovodi do oštećenja tkiva i funkcionalnih poremećaja. Ravnoteža MMP i TIMP u malignim tumorima poremećena je; tokom progresije tumora dolazi do povećenog lučenja i aktivacije MMP od strane tumorskih ćelija i fibroblasta povezanih sa tumorskim ćelijama, pri čemu se stvara tumorsko mikrookruženje.

U početnoj fazi povećano lučenje MMP inhibirano je TIMP, ali u kasnijoj fazi dolazi do sve većeg lučenja MMP, koje značajno nadmašuje lučenje TIMP, a to pospješuje angiogenezu i napredovanje tumora. Od svih MMP najvažniji za razvoj i napredovanje kolorektalnog karcinoma, kao i za nastanak postoperativnih komplikacija, a prije svega dehiscencije anastomose, jesu MMP2 i MMP9. U imunohistohemijskoj studiji utvrđeno je da je ekspresija MMP2 i MMP9 bila značajno veća kod umjerenog i slabo diferentovanih tumora nego kod dobro diferentovanih tumora<sup>174</sup>. Langers i autori u svojoj studiji ukazali su da je postojanje visoke

ekspresije MMP2 i MMP9 u normalnoj sluznici crijeva na udaljenosti 5–10 cm od tumora povezano sa lošijom prognozom tumora, te sa većom vjerovatnoćom nastanka dehiscencije anastomoze i drugih komplikacija. Takođe, u ovoj je studiji utvrđeno da povećana ekspresija MMP2 i MMP9 može biti koristan prognostički marker i prediktor metastaza u jetri<sup>175</sup>.

Pasternak i autori u svojoj pilot studiji utvrdili su da su povišene vrijednosti MMP kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom bile su povezane sa kasnjim nastankom metastaza u jetri i sa lošom prognozom nakon resekcije rektuma. Oni su takođe utvrdili da povišene vrijednosti MMP2 i MMP9 imaju važnu ulogu markera u razvoju dehiscencije kolorektalne anastomoze i anastomotskog curenja. Oni ukazuju da bi se primjenom farmakoloških faktora kod pacijenata sa visokim vrijednostima MMP mogao zaštititi integritet kolorektalne anastomoze<sup>176</sup>. Krarup i autori ukazali su da bi povišene vrijednosti MMP9 mogli imati važnu ulogu u ranom otkrivanju i u inovativnim strategijama u liječenju dehiscencije kolorektalne anastomoze. Oni su procjenjivali uticaj inhibicije MMP na zarastanje anastomoze. Oni su utvrdili da se nakon inhibicije MMP9 povećava čvrstoća anastomoze, ali u studiji nije pronađeno povećanje vrijednosti kolagena u analiziranim segmentima crijeva. Prepostavlja se da nivo kolagena nije povećan, jer je zahvaćen samo mali dio tkiva crijeva neposredno uz šavove i anastomozu. Takođe se smatra da je, analizom anastomotskog segmenta i susjednog nezahvaćenog tkiva, povećanje kolagena suvišno suptilno da bi se moglo registrovati<sup>177</sup>. Cini i autori u svojoj provedenoj studiji nastojali su da utvrde povezanost rasta vrijednosti MMP i nastanka dehiscencije anastomoze i anastomotskog curenja. Oni su iz bioptiranog segmenta reseciranog crijeva mjerili vrijednosti MMP, a ovi su segmenti bili ugrađeni u parafin. Dehiscencija anastomoze bila je u jednom slučaju sa niskom vrijednošću MMP, dok je u 20 slučajeva dehiscencije anastomoze bila visoka vrijednost MMP. Takođe je utvrđeno da je najviša vrijednost MMP u submukoznom sloju kod pacijenata sa dehiscencijom anastomoze prisutna u neposrednoj blizini anastomoze. Aktivnost MMP značajno je smanjena proksimalno i distalno od anastomoze, dok je minimalna aktivnost ili potpuno odsustvo aktivnosti bilo u neozlijedenom tkivu<sup>178</sup>. U našoj studiji, koju smo proveli na 60 pacijenata, utvrđeno je da su svi pacijenti kod kojih je nastupila dehiscencija anastomoze imali izrazito povišenu vrijednost MMP2 i MMP9 u biopsijama tumorskog tkiva, dok su kod pacijenata bez dehiscencije

anastomoze vrijednosti MMP2 i MMP9 bile izrazito povišene samo u malom broju slučajeva. Takođe, i u biopsijama zdravog tkiva u blizini tumora vrijednosti MMP2 i MMP9 bile su znatno više kod pacijenata sa dehiscencijom u odnosu na pacijente bez dehiscencije anastomoze. U našoj je studiji utvrđeno i da su kod pacijenata kod kojih je provedena neoadjuvantna radiohemoterapija došlo do značajnog smanjenja vrijednosti MMP2 i MMP9 u tumorskom i zdravom tkivu u neposrednoj blizini anastomoze u odnosu na vrijednosti prije provedene neoadjuvantne radiohemoterapije.

Lau i autori u svojoj studiji utvrdili su da je vaskularni endotelni factor rasta (VEGF) jedan od najmoćnijih mitogena endotelnih ćelija, i on se smatra jednim od najjačih faktora angiogeneze. VEGF veoma je važan za invaziju i metastaziranje neoplazmi, kroz stvaranje novih krvnih žila iz zrelih endotelnih ćelija. Ova je studija pokazala da se vrijednosti VEGF mogu koristiti za predviđanje kliničkog ishoda karcinoma rektuma kao nastanka postoperativnih komplikacija<sup>179</sup>. Takođe, Giampieri i autori su u svojoj studiji utvrdili postojanje povišenih vrijednosti VEGF kod bolesnika sa karcinomom rektuma, a koje je povezano sa agresivnjim širenjem i lošjom prognozom. U studiji su utvrdili da je povezanost nivoa ekspresije VEGF i povećane gustoće krvnih sudova u tumorima u korelaciji sa uznapredovalim stadiumom kolorektalnog karcinoma, lošom prognozom, kraćim preživljavanjem i sa većom vjerovatnoćom nastanka postoperativnih komplikacija. Takođe, na osnovu utvrđene ekspresije VEGF u tumoru može se predvidjeti nastanak metastaza u jetri, te širenje tumora u limfne čvorove. Studijom je utvrđena povezanost ekspresije VEGF u tumoru i nastanka dehiscencije anastomoze i drugih postoperativnih komplikacija<sup>180</sup>. Pavlidis i autori su u svojoj studiji ispitivali uticaj VEGF i MMP na preživljavanje pacijenata i nastanak metastaza. Takođe, istraživali su njihov uticaj na nastanak dehiscencije anastomoze i druge postoperativne komplikacije. Oni su utvrdili da angiogeneza i limfna angiogeneza solidnih tumora ima ključnu ulogu u tumorskom rastu i u invazivnom karakteru tumora, te na taj način i u napredovanju bolesti. Takođe su utvrdili da su oni povezani sa metastazama, jer osiguravaju vaskularne i limfne puteve za tumorske ćelije da migriraju i formiraju udaljene metastaze. Budući da je tumore sa visokim vrijednostima VEGF i MMP teže liječiti nego tumore sa nižim vrijednostima ovih gena, oni su pokušali da u liječenju pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ciljaju na VEGF molekule. Jedan od takvih preparata

u liječenju kolorektalnog karcinoma i u smanjenju postoperativnih komplikacija jeste Bevacizumab, koji je monoklonsko anti VEGF antitijelo<sup>181</sup>. Iako je po mnogim studijama utvrđeno da se kod pacijenata kod kojih su preoperativno u tumoru utvrđene visoke vrijednosti VEGF imali lošiju prognozu, kraći period preživljavanja i češće pojavljivanje postoperativnih komplikacija, u pojedinim je studijama utvrđeno da je aktivnost VEGF veoma važna u postoperativnom periodu za process zarastanja kolorektalne anastomoze. Mace i autori su tako u svojoj studiji utvrdili da metabolički poremećaji u okruženju novoformirane anastomoze povećavaju regulaciju VEGF, takođe hipoksija pojačava ekspresiju VEGF u monocitima.

Utvrđeno je da postoji paralela u gradijentu hipoksije i gradijentu ekspresije VEGF, a endotelne ćelije migriraju u zone sa najizraženijom hipoksijom.

Povišene vrijednosti VEGF mogu se naći već prvog postoperativnog dana, a svoj vrhunac ekspresije dostižu 2–3 dana poslije operacije, i nivo ostaje povišen sve dok se epidermalna aktivnost ne završi, a što se obično kreće do sedmog postoperativnog dana. Povećanjem vrijednosti VEGF podstiče se angiogeneza, a na taj se način obnavlja vaskularizacija, ponovo se uspostavljava mikrocirkulacija, a to sve dovodi do povećanja parcijalnog pritiska kiseonika u okruženju rane<sup>182</sup>. Zafirelis i autori ispitivali su ulogu VEGF u napredovanju kolorektalnog karcinoma, preživljavanju, nastanku komplikacija i udaljenih metastaza, kao i ulogu primjene inhibitora VEGF u terapiji kolorektalnog karcinoma. Oni su utvrdili da VEGF ima važnu ulogu u indukciji i progresiji tumora, utvrđeno je da je srednje vrijeme preživljavanja bilo kraće kod pacijenata sa visokom ekspreijom VEGF u odnosu na one sa niskom ekspresijom. Takođe, visoka ekspresija VEGF može se smatrati značajnim markerom za predviđanje recidiva, a često i za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze. Takođe je utvrđeno da postoji povezanost između prekomjerne ekspresije VEGF i slabe ili nikakve reakcije na radioterapiju kod pacijenata sa karcinomom rektuma, a prekomjerna primjena mononuklonskih antitijela protiv VEGF smanjuje gustoću krvnih žila i tako suzbija rast tumora<sup>183</sup>. Takođe, Samuel i autori su u svojoj studiji pokušali da utvrde uticaj VEGF na funkciju tumorskih ćelija. Oni su utvrdili da VEGF ima važnu ulogu u preživljavanju tumorskih ćelija i takođe da oni modeliraju osjeljivost tumorskih ćelija na radiohemioterapiju. Studija je

pokazala da VEGF ima veoma važnu ulogu u migraciji endotelnih ćelija u normalnim fiziološkim procesima i tumorima.

Utvrđeno je da inhibicija VEGF signalizacije inhibira pokretljivost endotelnih ćelija, a isto tako smanjuje migraciju i invaziju ćelija kolorektalnog karcinoma. Utvrđeno je da su promjene u migraciji nastale kao posljedica smanjenja aktivnosti proteina povezanih sa pokretljivošću ćelija. Na osnovu svega, utvrđeno je da povišene vrijednosti VEGF u tumorskom tkivu ukazuju na lošiju prognozu, manji period preživljavanja, veći procenat dehiscenci i drugih komplikacija, te na veću vjerovatnoću nastanka kolorektalnih metastaza<sup>184</sup>.

Samani i autori su u studiji koju su proveli na 98 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ispitivali ekspresiju VEGF i korelaciju sa prognozom bolesti, dužinom preživljavanja i nastankom dehiscencije anastomoze. Oni su utvrdili da kod kolorektalnog karcinoma postoje visoke vrijednosti insulinu sličnog receptora faktora rasta I (IGFIR), za koji je dokazano da inducira ekspresiju VEGF. Kako je VEGF najrašireniji i najspecifičniji faktor agiogeneze, on snažno povećava vaskularnu propustljivost i podstiče stvaranje novih krvnih žila u tumorima, te se na taj način smatraju glavnim faktorom stimulacije rasta u tumorskoj angiogenezi.

Rezultati njihove studije pokazali su da je visoka ekspresija IGFIR, te VEGF, povezana sa metastazama u limfnim čvorovima, lošijom prognozom i sa češćim nastankom postoperativnih komplikacija<sup>185</sup>.

Martineli i autori su u svojoj studiji utvrdili da su preoperativno visoke vrijednosti VEGF bile povezane sa većom agresivnošću tumora, lošijom prognozom i sa većom vjerovatnoćom nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze. Oni su ispitivali u kojoj mjeri polimorfizam VEGF gena utiče na odgovor na hemoterapiju kolorektalnog karcinoma i na vrijednost VEGF kao potencijalnog biomarkera za predviđanje kliničkog ishoda, nastanak metastaza i komplikacija. Takođe, oni su uvodili nove biološke terapije, koje koriste antiangiogene agense, kao što su inhibitori vaskularnog endotelnog faktora rasta i receptora epidermalnog faktora rasta; njih su kombinovali sa postojećim režimom hemoterapije. Utvrdili su da je dodavanje antiangiogenih agenasa u režimu prve linije hemoterapije pokazalo efikasnost u terapiji

kolorektalnog karcinoma, uz značajno poboljšavanje ukupnog preživljavanja, preživljavanja bez progresije i smanjenja nastanka dehiscencije anastomoze<sup>186</sup>.

Rast ili progresija ćelija raka smatra se posljedicama prekomjerne ekspresije ili nedostatka različitih faktora, kao što su VEGF i prokinectin (PROK1), od kojih su oba značajno uključena u hematogene metastaze kolorektalnog karcinoma i u nastanak postoperativnih komplikacija. Mihalache i saradnici su zato istovremeno istraživali ova dva faktora. Prema rezultatima studije PROK1 i VEGF povišeni su, i to u približno 20% tumora bio je povišen PROK1, a VEGF u približno 50% tumora, a nijedan faktor u približno 30%. Kliničkopatološki, ekspresija PROK1 i VEGF u odnosu na grupe kojima nedostaje ekspresija oba proteina, ili VEGF, ili PROK1 proteina, značajno se povećala u slučajevima sa pozitivnim metastazama u limfnim čvorovima, pozitivnim hematogenim metastazama i sa tumorima u uznapredovalom stadijumu, što ukazuje na povezanost između ova dva proteina i maligniteta.

Štaviše, stopa recidiva i komplikacija (dehiscencije anastomoze) bila je značajno veća kada su oba proteina bila povišena u primarnim lezijama pacijenata sa kolorektalnim karcinomom stadijuma II i III sa visokim rizikom od recidiva i dehiscencije anastomoze u poređenju sa drugim slučajevima<sup>187</sup>.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Neoadjuvantna radiohemoterapija dovodi do smanjenja veličine tumora i sniženja tumorskog stadijuma karcinoma rektuma (*downsizing i downstaging*), a pri tome ne povećava učestalost dehiscencije kolorektalne anastomoze.
2. Neoadjuvantna radiohemoterapija dovodi do smanjenja ekspresije MMP2, MMP9 i VEGF kod pacijenata kod kojih je provedena preoperativna radioterapija.
3. Dijabetes melitus ne povećava učestalost nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze.
4. Utvrđeno je da su MMP2 i MMP9 značajni prediktori za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze.
5. Utvrđeno je da je VEGF značajan prediktor za nastanak dehiscencije kolorektalne anastomoze.
6. Godine starosti ne dovode do veće učestalosti nastanka dehiscencije kolorektalne anastomoze.

## 8. LITERATURA

1. Benson AB. Epidemiology, disease progression and economic burden of colorectal cancer. JMCP. 2007;13:5-18.
2. Jemal A, Siegal R, Ward E et al. Cancer statistics 2008. CA cancer J Clin. 2008;58:71-96.
3. International Agency for Research on Cancer, Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages. *gco.iarc.fr* (accessed 21 December 2018).
4. American Cancer Sosiety. Global cancer facts and figures 2nd edition. Atlanta: American Cancer Sosiety; 2011.
5. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. CA Cancer J Clin. 2009;97:955-958.
6. Boyle P, Levin B. World cancer report. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer; 2008. Parkin DM BF, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer. 2001;94(2):153-156.
7. Vrdoljak E, Wojtukiewicz MZ, Pienkowski T et al. Cancer epidemiology in Central and South Eastern European countries. CMJ. 2011;52:479.
8. Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. Dig Dis. 2011;29(2):222228.
9. Benson AB, Epidemiology, disease progression and economic burden of colorectal cancer. JMCP. 2007;13:5-18.
10. Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword?, World J Gastroenterol. 2011;17(26):3092-3100.
11. Dugandžija T, Kukić B. Etiologija, distribucija i prevencija raka debelog creva. Novi Sad: Zdravlje u životu; 2014.

12. Otake S, Takeda H, Suzuki Y et al. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with colorectal adenoma: evidence for participation of insulin resistance. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3642-3646.
13. Chan D, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E and Norat T. Red processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *2011;6(6):e20456.*
14. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:556-565.
15. Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2007;121(9):2065-2072.
16. Thompson P. The myology of the pelvic floor. A contribution to human and comparative anatomy. London: McCorquodale; 1899.
17. Elftman HO. The evolution of the pelvic floor of primates. *Am J Anat.* 1932;51:307-346.
18. Ayoub SF. Arterial supply to the human rectum. *Acta Anatomica.* 1978;100(3):317-327.
19. Kecmanović D, Pavlov M, Kovačević P, Čeranić M. Pelvic exenteration. *Acta Chir. Jugoslavica.* 2001;48(3):43-47.
20. Krivokapić Z. Karcinom Rektuma. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012. p 9.
21. Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, and al. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(2):183-189.
22. Cervantes A, Rodrigues-Braun E, Navarro S, et al. Integrative decisions in rectal cancer. *Ann Oncol.* 2007;18:127-131.
23. Micev M, Cosic-Micev M, Todorovic M. Postoperative pathological examination of colorectal cancer. *Acta Chir Jugosl.* 2000;47(4 Suppl 1):67-76.
24. Quirke P, Morris E. Reporting colorectal cancer. *Histopathology.* 2007;50:555-556.

25. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: association of directors of anatomic and surgical pathology. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129(1):13-23.
26. Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: WileyLiss; 2003.
27. Kjellmo A, Drolsum A. Diagnosis and staging of colorectal cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2007; 127(21):2824-2828.
28. Sauer R, Becker H, Hohenberg W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:1731-1740.
29. Edge SB, Byrd DR, Compton, CC et al, eds. AJCC (American Joint Committee on Cancer). Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010. p 143.
30. Sabin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley; 2002.
31. Simić P, Simić A. Istorija hirurgije. Beograd: Službeni glasnik; 2008. p 395.
32. Corman M. Colon & rectum surgery. Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p 1743.
33. Heald RJ, Chir MA, Karanija ND. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg.* 1992;16:848-857.
34. Vekić B, Istorija kolorektalne hirurgije. Beograd: Kolopres; 2011. p 480.
35. Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, et al. Rectal cancer. The Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch surg.* 1998;133:894-898.
36. Radovanović Z. Značaj staplerskih tehnika na pojavu ranih hirurških komplikacija kod pacijenata operisanih od karcinoma rektuma. Doktorska teza. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu; 2011. p 25-40.

37. Enker WE, Merchant N, Cohen AM, et al. Safety and efficacy of low anterior resection for rectal cancer. 681 consecutive cases from a specialty service. *Anal Surgery*. 1999;230(4):544-552.
38. Shihab O, Heald RJ, Rullier E, Brown G, Holm T, Quirke P, Moran B. Defining the surgical planes on MRI improves surgery for rectal cancer in the low rectum. *Lancet*. 2009;10:1207-11.
39. Guillem JG, Diaz-Gonzalez JA, Minsky BD, et al. cT3N0 rectal cancer: potential overtreatment with preoperative chemoradiotherapy is warranted. *J Clin Oncol*. 2008;26:386-373.
40. Kapiteijn E, Marijnen C, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:638-646.
41. Marijnen CA, Van de Velde C, Putter H, et al. Impact of short-term preoperative radiotherapy on health-related quality of life and sexual functioning in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:1847-1858.
42. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman 149 Radiation Oncology Group Trial 01.04. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(31):3827-3833.
43. Glynne-Jones R, Hughes R. Critical appraisal of the 'wait and see' approach in rectal cancer for clinical complete responders after chemoradiation. *British Journal of Surgery*. 2012;99(7):897-909.
44. Poulsen LØ, Qvortrup C, Pfeiffer P, Yilmaz M, Falkmer U, Sorbye H. Review on adjuvant chemotherapy for rectal cancer – why do treatment guidelines differ so much?. *Acta Oncol*. 2015;54(4):437-446.
45. Popov I, Milović M, Jezdić S. Molekularni markeri u prognozi kolorektalnog karcinoma i predikciji odgovora na terapiju. Novine u dijagnostici i terapiji kolorektalnog karcinoma –

Optimizacija protokola lecenja. Ed. Popov I. Beograd: Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog drustva; 2006. p 220-237.

46. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: A historical review. *British Journal of Haematology*. 2005;128(3):303-309.
47. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146:873–887 .
48. Gianni-Barrera R, Bartolomeo M, Vollmar B, Djonov V, Banfi. A Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(6):1637-1642.
49. Gianni-Barrera R, Trani M, Fontanellaz C, Heberer M, Djonov V, Hlushchuk R, Banfi A. VEGF over-expression in skeletal muscle induces angiogenesis by intussusception rather than sprouting. *Angiogenesis*. 2013;16(1):123-136.
50. Nakayama Y, Sako T, Shibao K, et al. Prognostic value of plasma vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2002;22:2437-2442.
51. Banfi A, von Degenfeld G, Gianni-Barrera R, Reginato S, Merchant MJ, McDonald DM, Blau HM. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB J*. 2012;26(6):2486-2497.
52. Gupta N, Duda DG. Role of stromal cell-derived factor 1alpha pathway in bone metastatic prostate cancer. *J Biomed Res*. 2016;30(3):181-185..
53. Chan DLH, Espinoza D, Chan J, Lee A, Faisal W, Segelov E, et al. Adjuvant anti-VEGF therapy for overall survival and relapse-free survival in patients with resected non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016(12).
54. Lieu CH, Tran H, Jiang ZQ, Mao M, Overman MJ, Lin E, Eng C, Morris J, Ellis L, Heymach JV, Kopetz S. The association of alternate VEGF ligands with resistance to anti-VEGF therapy in metastatic colorectal cancer. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77117.

55. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69:562-573.
56. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017;147:1-73.
57. Jackson HW, Defamie V, Waterhouse P, Khokha R, TIMPs: Versatile extracellular regulators in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2017;17:38-53.
58. Yadav L, Puri N, Rastogi V, et al. Matrix metalloproteinases and cancer – roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:1085-1091.
59. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.
60. Lukaszewicz-Zajac M, Szmikowski M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in comparison to other inflammatory proteins in gastric cancer (GC). *Cancer Invest.* 2016;34(7):305-312.
61. Noel A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:52-60.
62. Liu L, Sun J, Li G, Gu B, Wang X, Chi H and Guo F: Association between mmp-12-82A/G polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med-* 2015;8(8):11896-11904.
63. Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, Upadhyay G. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). *Front Mol Biosci.* 2015;2:19.
64. Herszenyi L, Hritz I, Lakatos G, Varga MZ, Tulassay Z. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13:13240-13263.
65. Hrabec E, Naduk J, Strek M, Hrabec Z. Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates – intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. *Post Biochem.* 2007;53:37-45.

66. Bendardaf R, Buhmeida A, Ristamäki R, Syrjänen K, Pyrhönen S. MMP-1 (collagenase-1) expression in primary colorectal cancer and its metastases. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42:1473-1478.
67. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55-71.
68. Rijcken E, Sachs L, Fuchs T, Spiegel HU, Neumann PA. Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J. Surg. Res.* 2014;187:202-210.
69. Krivokapić Z. Mjere prevencije popuštanja anastomoze na debelom crevu. Doktorska disertacija, Beograd: Medicinski fakultet; 1990. p 168-174.
70. Theocharidis G, Drymoussi Z, Kao AP, Barber AH, Lee DA, Braun KM, Connelly JT. Type VI collagen regulates dermal matrix assembly and fibroblast motility. *J. Investig. Dermatol.* 2016;136:74-83.
71. Trackman PC, Saxena D, Bais MV. TGF-beta1 and CCN2-stimulated Sirius red assay for collagen accumulation in cultured cells. *Methods Mol. Biol.* 2017;1498:481-485.
72. Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J. Gastroenterol.* 2009;15:1431-1442.
73. Suding P, Jensen E, Abramson MA, et al. Definitive Risk Factors for Anastomotic Leaks in Elective Open Colorectal Resection. *Arch Surgery.* 2008;143:9:907-912.
74. Marusch F, Koch A, Schmidt U, et al. Impact of age on the short-term postoperative outcome of patients undergoing surgery for colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2002;17(3):177-184.
75. Feng C, Yao RQ, Huang FZ, Nie WP, Liu XY Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011 May; 31(5):908-910.

76. Cong ZJ, Fu CG, Yu ED, Liu LJ, Zhang W, Meng RG, Wang HT, Hao LQ. Factors associated with anastomotic leakage after anterior resection in rectal cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2009 Apr;47(8):594-598.
77. Hammond J, Lim S, Wan Y, et al. The burden of gastrointestinal anastomotic leaks: an evaluation of clinical and economic outcomes. *J Gastrointest Surg*. 2014;18:1176-1185.
78. Fujita F, Torashima Y, Kuroki T, et al. The risk factors and predictive factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: reappraisal of the literature. *Surg Today* 2014;44:1595-1602.
79. Hennessey DB, Burke JP, Ni-Dhonochu T, Shields C, Winter DC, Mealy K. Preoperative hypoalbuminemia is an independent risk factor for the development of surgical site infection following gastrointestinal surgery: A multi-institutional study. *Ann. Surg.* 2010;252:325-329.
80. Hayden DM, Pinzon MCM, Francescatti AB, Saclarides TJ. Patient factors may predict anastomotic complications after rectal cancer surgery: Anastomotic complications in rectal cancer. *Ann. Med. Surg.* 2015;4:11-16.
81. Kwag SJ, Kim JG, Kang WK, Lee JK, Oh ST. The nutritional risk is an independent factor for postoperative morbidity in surgery for colorectal cancer. *Ann. Surg. Treat. Res.* 2014;86:206-211.
82. Kang CY, Halabi WJ, Chaudhry OO, Nguyen V, Pigazzi A, Carmichael J, Mills S, Stamos MJ. Risk Factors for Anastomotic Leakage After Anterior Resection for Rectal Cancer. *JAMA Surg.* 2013;148:65-71.
83. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, Part I. *Microsurgery*. 2006;26:131-136.
84. Enestvedt CK, Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, Part II. *Microsurgery*. 2006;26:137-143.
85. Dubay DA, Franz MG. Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surgery Clin North Am*. 2003;83:3:463-481.

86. Kawada K, Hasegawa S, Hida K, Hirai K, Okoshi K, Nomura A, Kawamura J, Nagayama S, Sakai Y. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic low anterior resection with DST anastomosis. *Surg Endosc*. 2014;28:2988-2995.
87. Park JS, Choi GS, Kim SH, Kim HR, Kim NK, Lee KY, Kang SB, Kim JY, Lee KY, Kim BC, et al. Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic rectal cancer excision: the Korean laparoscopic colorectal surgery study group. *Ann Surg*. 2013;257:665-671.
88. Tortorelli AP, Alfieri S, Sanchez AM, Rosa F, Papa V, Di Miceli D, Bellantone C, Doglietto GB. Anastomotic Leakage after Anterior Resection for Rectal Cancer with Mesorectal Excision: Incidence, Risk Factors, and Management. *Am. Surg*. 2015;81:41-47.
89. Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *BJS*. 2014;101:424-432.
90. Van Rooijen SJ, Huisman D, Stuijvenberg M, et al. Intraoperative modifiable risk factors of colorectal anastomotic leakage: Why surgeons and anesthesiologists should act together. *Int J Surg*. 2016;36:183-200.
91. Hunt S, Silviera ML. The ASCRS Manual of Colon and Rectal Surgery. New York: Springer Science and Business Media LLC; 2019. Anastomotic Construction. p 119-133.
92. Giuratrabocchetta S, Rinaldi M, Cuccia F, et al. Protection of intestinal anastomosis with biological glues; an experimental randomized controlled trial. *Tech Coloproctol*. 2011;15(2):153-158.
93. Bissolati M, Orsenigo E, Staudacher C. Minimally invasive approach to colorectal cancer: an evidence-based analysis. *Updates Surg*. 2016;68:37-46.
94. Hinoi T, Okajima M, Shimomura M, Egi H, Ohdan H, Konishi F, Sugihara K, Watanabe M. Effect of left colonic artery preservation on anastomotic leakage in laparoscopic anterior resection for middle and low rectal cancer. *World J Surg*. 2013;37:2935-2943.

95. Thomas MS, Margolin DA. Management of colorectal anastomotic leak. *Clin. Colon Rectal Surg.* 2016;29:138-144.
96. Nowakowski M, Małczak P, Mizera M, Rubinkiewicz M, Lasek A, Wierdak M, Major P, Budzyński A, Pędziwiatr M. The safety of selective use of splenic flexure mobilization in sigmoid and rectal resections – Systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Med.* 2018;7:392.
97. Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *BJS.* 2014;101:424-432.
98. Rahbari NN, Weitz J, Hohenberger W, et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the international study group of Rectal Cancer. *Surgery* 2010;147(3):339-351.
99. Zhu QL, Feng B, Lu AG, et al. Laparoscopic low anterior resection for rectal carcinoma: Complications and management in 132 consecutive patients. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(36):4605-10.
100. Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA. Anastomotic Leaks after Intestinal Anastomosis: It's Later than You Think. *Ann. Surg.* 2007;245:254-258.
101. Boccola MA, Buettner PG, Rozen WM, Siu SK, Stevenson ARL, Stitz R, Ho YH. Risk Factors and Outcomes for Anastomotic Leakage in Colorectal Surgery: A Single-Institution Analysis of 1576 Patients. *World J. Surg.* 2011;35:186-195.
102. Kingham TP, Pachter HL. Colonic Anastomotic Leak: Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *J. Am. Coll. Surg.* 2009;208:269-278.
103. Kube R, Mroczkowski P, Granowski D, Benedix F, Sahm M, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Anastomotic leakage after colon cancer surgery: A predictor of significant morbidity and hospital mortality, and diminished tumour-free survival. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2010;36:120-124.

104. Mirnezami AH, Mirnezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak. *Ann. Surg.* 2011;253:890-899.
105. Jannasch O, Klinge T, Otto R, Chiapponi C, Udelnow A, Lippert H, Bruns CJ, Mroczkowski P. Risk factors, short and long term outcome of anastomotic leaks in rectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6:36884-36893.
106. Bakker IS, Morks AN, Hoedemaker HO, Burgerhof JG, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Havenga K. The C-seal trial: colorectal anastomosis protected by a biodegradable drain fixed to the anastomosis by a circular stapler, a multi-center randomized controlled trial. *BMC Surg.* 2012;12:23.
107. Maggiori L, Blanche J, Harnoy Y, Ferron M, Panis Y. Redo-surgery by transanal colonic pull-through for failed anastomosis associated with chronic pelvic sepsis or rectovaginal fistula. *Int J Colorectal Dis.* 2015;30:543-548.
108. Westerduin E, Borstlap WAA, Musters GD, et al. Redo coloanal anastomosis for anastomotic leakage after low anterior resection for rectal cancer: an analysis of 59 cases. *Colorectal Dis.* 2018;20:35-43.
109. Doeksen A, Tanis PJ, Wust AFJ, et al. Radiological evaluation of colorectal anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2008; 23(9):863-8.
110. Taggarshe D, Bakston D, Jacobs M, et al. Management of enterocutaneous fistulae: a 10 years experience. *World J Gastrointest Surg.* 2010;2:7:242-246.
111. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis and treatment. *J Am Coll Surg.* 2009; 208(2):269-278.
112. Suding P, Jensen E, Abramson MA, et al. Definitive Risk Factors for Anastomotic Leaks in Elective Open Colorectal Resection. *Arch Surg.* 2008;143(9):907-912.

113. Dahabreh IJ, Steele DW, Shah N, Trikalinos TA. Oral Mechanical Bowel Preparation for Colorectal Surgery: Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Colon Rectum*. 2015;58:698-707.
114. Scarborough JE, Mantyh CR, Sun Z, Migaly J. Combined Mechanical and Oral Antibiotic Bowel Preparation Reduces Incisional Surgical Site Infection and Anastomotic Leak Rates After Elective Colorectal Resection: An Analysis of Colectomy-Targeted ACS NSQIP. *Ann Surg*. 2015;262:331-337.
115. Kim EK, Sheetz KH, Bonn J, DeRoo S, Lee C, Stein I, Zarinsefat A, Cai S, Campbell DA, Englesbe MJ. A statewide colectomy experience: the role of full bowel preparation in preventing surgical site infection. *Ann Surg*. 2014;259:310-314.
116. Roos D, Dijksman LM, Tijssen JG, Gouma DJ, Gerhards MF, Oudemans-van Straaten HM. Systematic review of perioperative selective decontamination of the digestive tract in elective gastrointestinal surgery. *Br J Surg*. 2013;100:1579-1588.
117. Hata H, Yamaguchi T, Hasegawa S, Nomura A, Hida K, Nishitai R, Yamanokuchi S, Yamanaka T, Sakai Y. Oral and Parenteral Versus Parenteral Antibiotic Prophylaxis in Elective Laparoscopic Colorectal Surgery (JMTO PREV 07-01): A Phase 3, Multicenter, Open-label, Randomized Trial. *Ann Surg*. 2016;263:1085-1091.
118. Sajid MS, Siddiqui MR, Baig MK. Single layer versus double layer suture anastomosis of the gastrointestinal tract. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;1. article CD005477.
119. Luglio G, Corcione F. Stapled versus handsewn methods for ileocolic anastomoses. *Tech Coloproctol*. 2019;23:1093-5.
120. Kim CW, Baek SJ, Hur H, Min BS, Baik SH, Kim NK. Anastomotic Leakage After Low Anterior Resection for Rectal Cancer Is Different Between Minimally Invasive Surgery and Open Surgery. *Ann Surg*. 2016;263:130-137.

121. Kawada K, Hasegawa S, Hida K, Hirai K, Okoshi K, Nomura A, Kawamura J, Nagayama S, Sakai Y. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic low anterior resection with DST anastomosis. *Surg Endosc*. 2014;28:2988-2995.
122. Shiomi A, Ito M, Maeda K, Kinugasa Y, Ota M, Yamaue H, Shiozawa M, Horie H, Kuriu Y, Saito N. Effects of a diverting stoma on symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection for rectal cancer: a propensity score matching analysis of 1,014 consecutive patients. *J Am Coll Surg*. 2015;220:186-194.
123. Chude GG, Rayate NV, Patris V, Koshariya M, Jagad R, Kawamoto J, Lygidakis NJ. Defunctioning loop ileostomy with low anterior resection for distal rectal cancer: should we make an ileostomy as a routine procedure? A prospective randomized study. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:1562-1567.
124. Lei WZ, Zhao GP, Cheng Z, Li K, Zhou ZG. Gastrointestinal decompression after excision and anastomosis of lower digestive tract. *World J Gastroenterol*. 2004;10:1998-2001.
125. Antiel RM, Hashim Y, Moir CR, Rodriguez V, Elraiyah T, Zarroug AE. Intra-abdominal venous thrombosis after colectomy in pediatric patients with chronic ulcerative colitis: incidence, treatment, and outcomes. *J Pediatr Surg*. 2014;49:614-617.
126. Herbert G, Perry R, Andersen HK, et al. Early enteral nutrition within 24 hours of lower gastrointestinal surgery versus later commencement for length of hospital stay and postoperative complications. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;10. article CD004080.
127. Turrentine FE, Denlinger CE, Simpson VB, et al. Morbidity, mortality, cost, and survival estimates of gastrointestinal anastomotic leaks. *Journal of the American College of Surgeons*. 2015;220(2):195-206.
128. Genser L, Manceau G, Karoui M, Breton S, Brevart C, Rousseau G, et al. Postoperative and long-term outcomes after redo surgery for failed colorectal or coloanal anastomosis: retrospective analysis of 50 patients and review of the literature. *Dis Colon Rectum*. 2013;56:747-755.

129. Pitel S, Lefèvre JH, Tiret E, Chafai N, Parc Y. Redo coloanal anastomosis: a retrospective study of 66 patients. *Ann Surg.* 2012;256:806-810.
130. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF. SEER Cancer Statistics Review. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2016. p 1975-2013.
131. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66:683-691.
132. Wong MCS, Huang J, Lok V, Wang J, Fung F, Ding H, Zheng ZJ. Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2020;19(5):955-966.
133. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol. Rev.* 2019;14:89-103.
134. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017–2019. Atlanta, GA, USA: American Cancer Society; 2017.
135. Esteva M, Ruiz A, Ramos M, Casamitjana M, Sánchez-Calavera MA, González-Luján L, et al. Age differences in presentation, diagnosis pathway and management of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol.* 2014;38:346-353.
136. Vuik FE et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut* 68. 2019;1820-1826.
137. Biondi A, Grossi G, Mistretta A, Marventano S, Toscano C, Drago F, Gangi S, Basile F. Laparoscopic vs. open approach for colorectal cancer: evolution over time of minimal invasive surgery. *BMC Surg.* 2013;13(2):S12.
138. Morneau M, Boulanger J, Charlebois P, Latulippe JF, Lougnarath R, Thibault C, Gervais N. Laparoscopic versus open surgery for the treatment of colorectal cancer: a literature review and recommendations from the Comité de l'évolution des pratiques en oncologie. *Can J Surg J Canadien de Chirurgie.* 2013;56:297-310.

139. Heriot A, Platell C, Byrne C, Chapuis P, Doudle M, McMurrick P, et al. The Bi-National Colorectal Cancer Audit Report. Colorectal Surgical Society of Australia and New Zealand; 2018. p 454-458.
140. McCarthy K, Pearson K, Fulton R, Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2012;12. article CD008368.
141. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H, Wittekind C, Beissbarth T, Rodel C. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. J Clin Oncol. 2012;30:1926-1933.
142. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, Kahlenberg MS, Baez-Diaz L, Ursiny CS, Petrelli NJ, Wolmark N. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. J Clin Oncol. 2009;27:5124-5130.
143. Capirci C, Valentini V, Cionini L, et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal Cancer: long-term analysis of 566 ypCR patients. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 2008;72(1):99-107.
144. Lee JH, Kim SH, Kim JG, Cho HM, Shim BY. preoperative chemoradiotherapy (CRT) followed by laparoscopic surgery for rectal cancer: predictors of the tumor response and the long-term oncologic outcomes. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics; 2010.
145. Valentini V, Beets-Tan R, Borras JM, et al. Evidence and research in rectal cancer. Radiotherapy and Oncology. 2008;87:449-474.
146. Artinyan A, Orcutt ST, Anaya DA, et al. Infectious postoperative complications decrease

long-term survival in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2015;261:497-505.

147. Golda T, Zerpa C, Kreisler E, Trenti L, Biondo S. Incidence and management of anastomotic bleeding after ileocolic anastomosis. *Colorectal Disease*. 2013;15:1301-1308.
148. Chapuis PH, Bokey L, Keshava A, Rickard MJFX, Stewart P, Young CJ, et al. Risk factors for prolonged ileus after resection of colorectal cancer: an observational study of 2400 consecutive patients. *Ann Surg*. 2013;257:909-915.
149. Vather R, Josephson R, Jaung R, Robertson J, Bissett I. Development of a risk stratification system for the occurrence of prolonged postoperative ileus after colorectal surgery: a prospective risk factor analysis. *Surgery*. 2015;157:764-773.
150. Grass F, Lovely JK, Crippa J, Hübner M, Mathis KL, Larson DW. Potential association between perioperative fluid management and occurrence of postoperative ileus. *Dis Colon Rectum*. 2020;63:68-74.
151. Glover LE, Colgan SP. Epithelial barrier regulation by hypoxia-inducible factor. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(suppl 3):S233-S236.
152. Sun Z, Sessler DI, Dalton JE, Devereaux PJ, Shahinyan A, Naylor AJ et al. Postoperative Hypoxemia Is Common and Persistent: A Prospective Blinded Observational Study. *Anesth Analg*. 2015;121(3):709-715.
153. Benz S, Nötzli S, Siegel JS, Eberli D, Jessen HJ. Controlled oxygen release from pyridone endoperoxides promotes cell survival under anoxic conditions. *J Med Chem* 2013;56:10171-10182.
154. Blanco-Colino R, Espin-Basany E. Intraoperative use of ICG fluorescence imaging to reduce the risk of anasto-motic leakage in colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Tech Coloproctol*. 2018;22:15-23.

155. Shogan BD, Belogortseva N, Luong PM, Zaborin A, Lax S, Bethel C et al. Collagen degradation and MMP9 activation by Enterococcus faecalis contribute to intestinal anastomotic leak. *Sci Transl Med.* 2015;7(286):286-268.
156. Shogan BD, Smith DP, Christley S, Gilbert JA, Zaborina O, Alverdy JC. Intestinal anastomotic injury alters spatially defined microbiome composition and function. *Microbiome.* 2014;15(2):35.
157. Nelson RL, Gladman E, Barbateskovic M. Antimicrobial prophylaxis for colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;5. article CD001181.
158. Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi T, Nomoto K, Onodera H. Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(9):1657-1664.
159. Chang JS, Keum KC, Kim NK, Baik SH, Min BS, Huh H, et al. Preoperative chemoradiotherapy effects on anastomotic leakage after rectal cancer resection: a propensity score matching analysis. *Ann Surg.* 2014;259(3):516-521.
160. Trencheva K, Morrissey KP, Wells M, Mancuso CA, Lee SW, Sonoda T, et al. Identifying important predictors for anastomotic leak after colon and rectal resection: prospective study on 616 patients. *Ann Surg.* 2013;257(1):108-113.
161. Park JS, Choi GS, Kim SH, Kim HR, Kim NK, Lee KY, Kang SB, Kim JY, Lee KY, Kim BC, et al. Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic rectal cancer excision: the Korean laparoscopic colorectal surgery study group. *Ann Surg.* 2013;257:665-671.
162. Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, et al. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- $\beta$ 1 and impairs wound healing in streptozotocin induced diabetic mice, *Biomed Pharmacother.* 70. 2015. p 317-325.

163. Ziegler MA, Catto JA, Riggs TW, Gates ER, Grodsky MB, Wasvary HJ. Risk Factors for anastomotic leak and mortality in diabetic patients undergoing colectomy. *Arch. Surg.* 2012;147:600-605.
164. Dinh T, Elder S, Veves A. Delayed wound healing in diabetes: Considering future treatments. *Diabetes Manag.* 2011;1:509-519.
165. Lin X, Li J, Chen W, Wei F, Ying M, Wei W, Xie X. Diabetes and risk of anastomotic leakage after gastrointestinal surgery. *J Surg Res.* 2015;196(2):294-301.
166. Yamamoto S, Fujita S, Akasu T, et al. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic surgery for rectal cancer using astapling technique. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2012;22:239-243.
167. Tanaka K, Okuda J, Yamamoto S, Ito M, Sakamoto K, Kokuba Y, Yoshimura K, Watanabe M. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic surgery with the double stapling technique for stage 0/I rectal carcinoma: a subgroup analysis of a multicenter, single-arm phase II trial. *Surg Today.* 2017;47:1215-1222.
168. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis and treatment. *J Am Coll Surg.* 2009;208(2):269-278.
169. Lim SB, Yu CS, Kim CW, Yoon YS, Park IJ, Kim JC. Late anastomotic leakage after low anterior resection in rectal cancer patients: clinical characteristics and predisposing factors. *Colorectal Dis.* 2016;18(4):135-140.
170. Jutesten H, Draus J, Frey J, Neovius G, Lindmark G, Buchwald P, Lydrup ML. Late leakage after anterior resection: a defunctioning stoma alters the clinical course of anastomotic leakage. *Colorectal Dis.* 2018;20(2):150-159.
171. Krarup PM, Eld M, Jorgensen LN, Hansen MB, Ågren MS. Selective matrix metalloproteinase inhibition increases breaking strength and reduces anastomotic leakage in experimentally obstructed colon. *Int. J. Colorectal Dis.* 2017;32:1277-1284.

172. Edomskis P, Goudberg MR, Sparreboom CL, Menon AG, Wolthuis AM, D'Hoore A, Lange JF. Matrix metalloproteinase-9 in relation to patients with complications after colorectal surgery: A systematic review. *Int. J. Colorectal Dis.* 2021;36:1-10.
173. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* 2013;139:32-40.
174. Schelter F, Halbwachs B, Bäumleer P, Neu C, Görlach A, Schrötzlmaier F, Krüger A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Clin. Exp. Metastasis*. 2011;28:91-99.
175. Langers AMJ, Verspaget HW, Hawinkels LJAC, Kubben FJGM, van Duijn W, Van der Reijden JJ, Hardwick JCH, Hommes DW, Sier CFM. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer*. 2012;106:1495-1498.
176. Pasternak B, Matthiessen P, Jansson K, Andersson M, Aspenberg P. Elevated intraperitoneal matrix metalloproteinases-8 and -9 in patients who develop anastomotic leakage after rectal cancer surgery: A pilot study. *Colorectal Dis.* 2010;12:e93-e98.
177. Krarup PM, Eld M, Heinemeier K, Jorgensen LN, Hansen MB, Ågren MS. Expression and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9 and MMP-12 in early colonic anastomotic repair. *Int J Color Dis.* 2013;28(8):1151-1159.
- 178 Cini C, Wolthuis A, D'Hoore A. Peritoneal fluid cytokines and matrix metalloproteinases as early markers of anastomotic leakage in colorectal anastomosis: a literature review and meta-analysis. *Color Dis.* 2013;15(9):1070-1077.
179. Lau TP, Roslani AC, Lian LH, Lee PC, Hilmi I, Goh KL, Chua KH. Association between EGF and VEGF functional polymorphisms and sporadic colorectal cancer in the Malaysian population. *Genet Mol Res.* 2014;13:5555-5561.

180. Giampieri R, Salvatore L, Del Prete M, Prochilo T, D'Anzeo M, Loretelli C, Loupakis F, Aprile G, Maccaroni E, Andrikou K, et al. Angiogenesis genotyping and clinical outcome during regorafenib treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:25195.
181. Pavlidis ET, Pavlidis TE. Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:5051-5060.
182. Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM. Sustained expression of Hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen.* 2007;15:636-645.
183. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res* 2008;147:99-107.
184. Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2011;30(10):1205-1212.
185. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev.* 2007;28:20-47.
186. Martinelli E, Troiani T, Morgillo F, Orditura M, De Vita F, Belli G, et al. Emerging VEGF-receptor inhibitors for colorectal cancer. Expert opinion on emerging drugs. 2013;18:25-37.
187. Mihalache A, Rogoveanu I. Angiogenesis factors involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Health Sci J.* 2014;40:5-11.

## 9. BIOGRAFIJA

Doktor Jugoslav Đeri rođen je u Banjoj Luci 18. 11. 1970. godine, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet sa prosječnom ocjenom 8,4 završio je 2000. godine u Banjoj Luci.

Po završetku fakulteta radio je kao ljekar opšte prakse u privatnoj zdravstvenoj ustanovi „Intermedik” (do 2002. godine). Potom je radio u stanici Hitne medicinske pomoći u Banjoj Luci, a od 2003. godine stalno je zaposlen u Univerzitetskom kliničkom centru Republike Srpske u Banjoj Luci.

U periodu od 2003. do 2008. godine radio je na Klinici za specijalne hirurške djelatnosti – vaskularni odjel. Od 2008. godine do danas stalno je zaposlen na Klinici za opštu i abdominalnu hirurgiju.

Godine 2010. položio je specijalistički ispit i stekao zvanje specijaliste opšte hirurgije na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci.

Od 2013. godine radi kao stručni saradnik na Katedri za hirurgiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Po potrebi, volonterski je angažovan u hirurškoj ambulanti Srpske pravoslavne crkve u Banjoj Luci.

Postdiplomske studije – Biomedicinska istraživanja – završio 2013. godine sa prosječnom ocjenom 9,2. Magistarsku tezu pod naslovom „Značaj protektivne ileostome kod niskih kolorektalnih anastomoza” odbranio je 2015. godine.

Učesnik je odbrambeno-otadžbinskog rata u periodu od 1992. do 1995. godine.

Posjeduje licence sa više stručnih edukacija iz zemalja u okruženju, a kao autor i koautor pojavljuje se u osamnaest naučnih radova. Član je i projektnog tima u tri projekta sufinansirana od strane Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srpske.

Oženjen je i otac je dvoje djece.

## Izjava 1

### IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem  
da je doktorska disertacija**

" PREDIKTIVNI ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I Matriks  
METALOPROTEINAZA U RAZVOJU DEHISCENCIJE NISKIH KOLOREKTALNIH  
ANASTOMOZA KOD BOLESNIKA LIJEČENIH NEOADJUVANTNOM RADIOTERAPIJOM"

" PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF VASCULAR ENDOTHELIC GROWTH FACTOR  
AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE DEVELOPMENT OF DEHISCENCE  
OF LOW COLORECTAL ANASTOMOSIS IN PATIENTS TREATED WITH  
NEOADIUTIVE ADAPTER "

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, mart 2022.

Potpis doktoranta

Jugoslav Đeri



## Izjava 2

### **Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom**

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom

" PREDIKTIVNI ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I MATRIKS METALOPROTEINAZA U RAZVOJU DEHISCENCIJE NISKIH KOLOREKTALNIH ANASTOMOZA KOD BOLESNIKA LIJEČENIH NEOADJUVANTNOM RADIOTERAPIJOM"

"

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, mart 2022.

Potpis doktoranta

Jugoslav Đeri



### Izjava 3

#### **Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora Jugoslav Đeri

Naslov rada " PREDIKTIVNI ZNAČAJ VASKULARNOG ENDOTELNOG  
FAKTORA RASTA I Matriks METALOPROTEINAZA U RAZVOJU  
DEHISCENCIJE NISKIH KOLOREKTALNIH ANASTOMOZA KOD  
BOLESNIKA LIJEČENIH NEOADJUVANTNOM RADIOTERAPIJOM"

Mentor Prof. dr Nikica Grubor

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, mart 2022.godine

Potpis doktoranta  
Jugoslav Đeri



