

**M e d i c i n s k i   f a k u l t e t**  
**U n i v e r z i t e t   o d b r a n e   u   B e o g r a d u**

*Doktorska teza*

**PROFIL I AKTIVNOST CITOKINA KOD DECE  
SA NEPERFORATIVNIM I PERFORATIVNIM  
AKUTNIM APENDICITISOM**

*mentor:*

Prof. dr sci. Maja Šurbatović

*kandidat:*

Asist. mr sci. Nikola Stanković

*februar 2018.*

## *Sadržaj*

### **Uvod**

- 1. Medicinski značaj i istorijski podaci**
- 2. Anatomske, embriološke i histološke karakteristike crvuljka**
- 3. Definicija akutnog apendicitisa**
- 4. Epidemiologija akutnog apendicitisa**
- 5. Etiopatogeneza akutnog apendicitisa**
  - 5.1. Imunska osnova akutnog apendicitisa**
    - 5.1.1. Neutrofili*
    - 5.1.2. Citokini antigen-prezentujućih ćelija*
    - 5.1.3. Citokini pomoćničkih T limfocita*
    - 5.1.4. Hemokini*
  - 5.2. Patohistološki supstrat kod akutnog apendicitisa**
  - 5.3. Mikrobiološki nalaz kod akutnog apendicitisa**
- 6. Klinička slika akutnog apendicitisa**
- 7. Dijagnostika akutnog apendicitisa**
- 8. Terapija akutnog apendicitisa**

### **Ispitanici i metode**

### **Ciljevi ispitivanja**

### **Hipoteze ispitivanja**

### **Rezultati**

- 9. Demografske karakteristike i socio-epidemiološki kontekst**
- 10. Simptomi i klinički znaci**

## **11. Operativni nalaz**

## **12. Rutinski laboratorijski nalazi**

### **12.1. Neutrofilno-limfocitni odnos (NLR)**

*12.1.1. NLR u tri vremena po patohistološkim grupama*

*12.1.2. Razlike NLR između patohistoloških grupa, u tri vremena*

*12.1.3. Korelacija NLR sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)*

*12.1.4. Korelacija NLR sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)*

*12.1.5. Razgraničavajuće vrednosti NLR između patohistoloških grupa*

### **12.2. C - reaktivni protein (CRP)**

*12.2.1. CRP u tri vremena po patohistološkim grupama*

*12.2.2. Razlike CRP između patohistoloških grupa, u tri vremena*

*12.2.3. Korelacija CRP sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)*

*12.2.4. Korelacija CRP sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)*

*12.2.5. Razgraničavajuće vrednosti CRP između patohistoloških grupa*

### **12.3. Neutrofilni mijeloperoksidazni index (MPXI)**

*12.3.1. MPXI u tri vremena po patohistološkim grupama*

*12.3.2. Razlike MPXI između patohistoloških grupa, u tri vremena*

*12.3.3. Korelacija MPXI sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)*

*12.3.4. Korelacija MPXI sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)*

*12.3.5. Razgraničavajuće vrednosti MPXI između patohistoloških grupa*

### **12.4. Korelacija vrednosti neutrofilno-limfocitnog odnosa i C-reaktivnog proteina**

### **12.5. Korelacija vrednosti neutrofilno-limfocitnog odnosa i mijeloperoksidaznog indeksa**

### **12.6. Korelacija vrednosti C-reaktivnog proteina i mijeloperoksidaznog indeksa**

## **13. Citokini**

### **13.1. Razlike serumskih citokina**

*13.1.1. Serumski citokini u tri vremena na ukupnom broju pacijenata*

*13.1.2. Serumski citokini u tri vremena po patohistološkim grupama*

*13.1.3. Razlike preoperativnih vrednosti serumskih citokina između patohistoloških grupa*

*13.1.4. Razgraničavajuće vrednost IP-10, IL-10 i MIP-1alfa između patohistoloških grupa*

*13.1.5. Razlike serumskih citokina između patohistoloških grupa prvog postoperativnog dana*

*13.1.6. Razlike serumskih citokina između patohistoloških grupa trećeg postoperativnog dana*

### **13.2. Razlike peritoneumskih citokina**

*13.2.1. Razlike peritoneumskih citokina između patohistoloških grupa*

### **13.3. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina**

*13.3.1. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina na ukupnom broju pacijenata*

*13.3.2. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar NEAA grupe*

*13.3.3. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar UAA grupe*

*13.3.4. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar CAA grupe*

### **13.4. Korelacije serumskih i peritoneumskih citokina sa parametrima standardne laboratorije**

*13.4.1. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa NLR*

*13.4.2. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa CRP*

*13.4.3. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa MPXI*

## **Diskusija**

## **Zaključak**

## **Literatura**

*Skraćenice:*

AA – akutni apendicitis  
CAA – komplikovani akutni apendicitis  
CRP – C-reaktivni protein  
CT – kompjuterizovana tomografija  
DIK – diseminovana intravaskularna koagulacija  
GALT – udruženo gastrointestinalno limfno tkivo  
G-CSF – faktor stimulacije kolonija granulocita  
ICAM-1 – intercelularni adhezivni molekul 1  
IFN - interferon  
IL – interleukin  
IP-10 – interferonom inducibilni protein 10  
LAP – peptid latence  
LTBP – latentni vezujući protein za tumorski faktor rasta  
MALT – udruženo mukozno limfno tkivo  
MCP-1 – monocitni hemotaksni protein  
MIP-1 – makrofagni inflamatorni protein 1  
MMP – matriksna metaloproteinaza  
MPO – mijeloperoksidaza  
MPXI – mijeloperoksidazni indeks  
MRI – nuklearna magnetna rezonancija  
NEAA – normalni i rani akutni apendicitis  
NK-ćelija – prirodno ubilačka ćelija  
NLR – neutrofilno-limfocitni odnos  
PAS – pedijatrijski apendicitis skor  
PSD – preoperativno trajanje simptoma  
SIRS – sindrom sistemskog inflamatornog odgovora  
TGF – tumorski faktor rasta  
TNF – faktor nekroze tumora  
UAA – nekomplikovani akutni apendicitis

## *Uvod*

Akutni apendicitis (AA) predstavlja najčešće hitno stanje a apendektomija najčešću hitnu intervenciju u pedijatrijskoj hirurgiji (1). Dijagnoza ovog oboljenja se u pedijatrijskim bolnicama postavlja kod približno jedne trećine svih pacijenata primljenih sa akutnim bolom u trbuhu (2). Nedijagnostikovani i odloženo dijagnostikovani slučajevi su i dalje česti, povećavajući rizik od komplikacija i smrtnog ishoda (3-6). Sa druge strane, brojna gastroenterološka, ginekološka i inflamatorna oboljenja imaju sličnu kliničku prezentaciju, što dovodi do negativnih hirurških eksploracija koje same po sebi nose rizik komplikacija u toku i nakon intervencija.

Uprkos povećanoj upotrebi laboratorijskih pretraga, slikovnih dijagnostičkih metoda i kliničkih scoring sistema u cilju pravovremene dijagnostike, akutni apendicitis ostaje najčešća dilema pedijatrijskog hirurškog tima. Pravovremena i tačna dijagnoza akutnog apendicitisa u dečjem uzrastu je dodatno otežana nedovoljnom saradnjom tokom fizikalnog pregleda i najčešće nepotpunim anamnestičkim podacima. Iz ovih razloga, i dalje se čine napori u smislu traganja za neagresivnim i efikasnijim dijagnostičkim pristupima.

Praćenje specifičnosti imunskog odgovora i citokinskih profila kod akutnog apendicitisa, može biti od značaja u postavljanju dijagnoze, iako je malo ovakvih studija sprovedeno na

pedijatrijskoj populaciji. Ovo potvrđuju ispitivanja u kojima su simultano praćene koncentracije većeg broja citokina u serumu pacijenata (7, 8). Komparacija citokinskih profila u peritonealnoj tečnosti i serumu pacijenata može pružiti dodatne informacije o karakteristikama inflamatornog procesa (9).

## 1. Medicinski značaj i istorijski podaci

Od početka čovekove dominacije, akutni apendicitis je svojom pojavom bitno uticao na ljudske sudbine. Današnja statistika ukazuje na činjenicu da svaki petnaesti čovek oboli od akutnog apendicitisa. Bez lečenja, ovo oboljenje se vrlo često završava letalno. Obzirom da je incidenca apendicitisa najveća kod dece i mlađih osoba, može se zaključiti koliko je ljudi kroz istoriju, pre ere apendektomije, umrlo od apendicitisa u najvitalnijim godinama života. Konzervativno lečenje nije bilo dovoljno i bolest je napredovanjem prelazila u lokalizovani i difuzni peritonitis, čiju kliničku sliku umirućih pacijenata srećemo u spisima starih autora sa tipičnim aspektom označenim kao *Facies Hippocratica*.

Dugo je trebalo kako bi se razjasnio početak patološkog procesa na crvuljku sa posledičnim razvojem bolesti, čija je klinička slika danas jasna i za koju postoji hirurško rešenje.

Iako se crvuljak sreće još na crtežima Leonarda da Vinčija iz 1492. godine, prvi zvanični anatomske opis dao je anatom Giacomo Berengarija da Carpi 1521. godine, smatrajući ga anomalijom jer ga Galen nije spominjao u svojim radovima. Andreas Vesalius (1514-1564 god.), osnivač moderne anatomije, 1543. godine jasno ilustruje crvuljak kao fiziološku anatomske strukturu. Vesalius je svojim anatomskim studijama zasenio veliki autoritet Galena i drugih anatomata koji su svoje studije sprovodili na životinjama. Komparativna anatomija utvrđuje da osim čoveka, samo retke životinje, poput zeca, pacova i čovekolikog majmuna, poseduju crvuljak (10).

Formiranje apscesa u desnoj ilijačnoj jami kao posledica uznapredovalog apendicitisa, čiju je kliničku sliku prvi opisao nemački hirurk Lorenz Heister 1711. godine, dugo je nosilo naziv *tiphilitis*, pogrešno govoreći o poreklu procesa sa cekuma. Još iz tog doba potiče naziv *upala slepog creva*, koji se i danas nepravilno koristi, čak i među medicinskim radnicima.

Razvoj hirurgije u 19. veku određuju uvođenje opšte etarske anestezije od strane Williama Mortona (1819-1868 god.) i postavljanje principa asepse i antiseptice. Tako prvo započinj u drenaže peritiflitičnih apscesa a prvom uspešnom apendektomijom smatra se operacija koju je 1880. godine izveo Robert Lawson Tait u Birminghamu.

Akutni apendicitis je, kao poseban klinički i dijagnostički entitet uveden 1886. godine. Američki patolog Reginald Fitz (učenik Rudolfa Virchova) je tada, po prvi put, prepoznao upalu vermiformnog apendiksa kao razlog infekcije i bola u donjem desnom kvadrantu abdomena (11). Njegove preporuke za hirurško lečenje apendicitisa prvi je, iste godine, sproveo Richard Hall u New Yorku. Od tada apendektomija postaje deo svakodnevne medicinske prakse. Sir Frederick Treves je 1902. godine, dva dana pre krunisanja uspešno operisao engleskog kralja Edwarda VII, čime je doprineo popularnosti operacije. Klinička slika akutnog apendicitisa postaje sve jasnija a pravovremena dijagnoza je prvashodno bazirana na fizikalnom nalazu (12).

Tokom vremena, tehnički i laboratorijski razvoj u medicini omogućuju i sofisticiranije dijagnostičke pristupe. U praksu je uvedena i minimalno invazivna apendektomija. Međutim, pouzdana dijagnostika i pravilno indikovanje hirurške intervencije ostaju izazov u svakodnevnoj medicinskoj praksi.

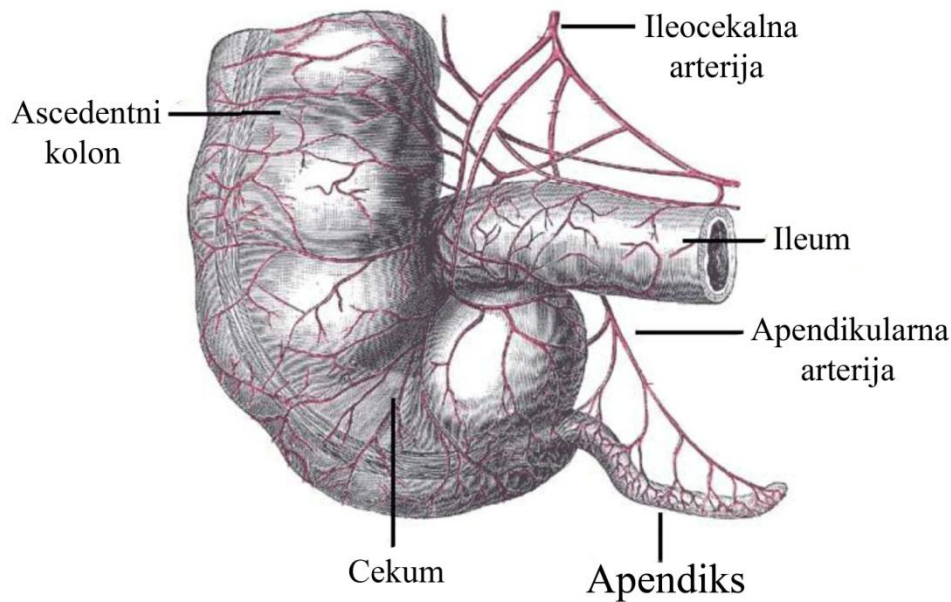
## **2. Anatomske, embriološke i histološke karakteristike crvuljka**

Crvuljak (*Appendix vermiformis*) predstavlja tubularnu strukturu koja polazi sa slepog creva (*Cecum*), neposredno ispod ileocekalne valvule (1 do 2,5 cm), i slepo se završava dostižući dužinu od 2 do 20 cm (prosečno 9 cm kod odraslih) i širinu od 0,5 do 1 cm (13). Mezoapendiksom u kome su sadržani pripadajući krvni, limfni sudovi i nervi, je povezan sa ileumom (Slika 1). Opisuje se pet mogućih položaja crvuljka u trbuhu: retrocekalni (65,3), descendentni/pelvični (31,0%), subcekalni (2,3%), preilealni (1,0%) i postilealni (0,4%), od čega može da zavisi klinička prezentacija apendicitisa (14).

Slepo crevo i crvuljak se razvijaju od srednjeg creva, čijom rotacijom i spuštanjem tokom embriološkog razvoja zauzimaju konačnu poziciju u desnoj ilijačnoj jami. Primordijalna struktura od koje potiču je označena kao *cekalni divertikulum* i predstavljena je slepom kesastom



tvorevinom koja progresivno počinje da se razvija tokom šeste nedelje fetalnog života. Njen proksimalni deo koji je u kontinuitetu sa ostatkom debelog creva se uvećava i širi formirajući pravi cekum, dok se distalni deo elongira bez širenja i formira crvuljak (15).

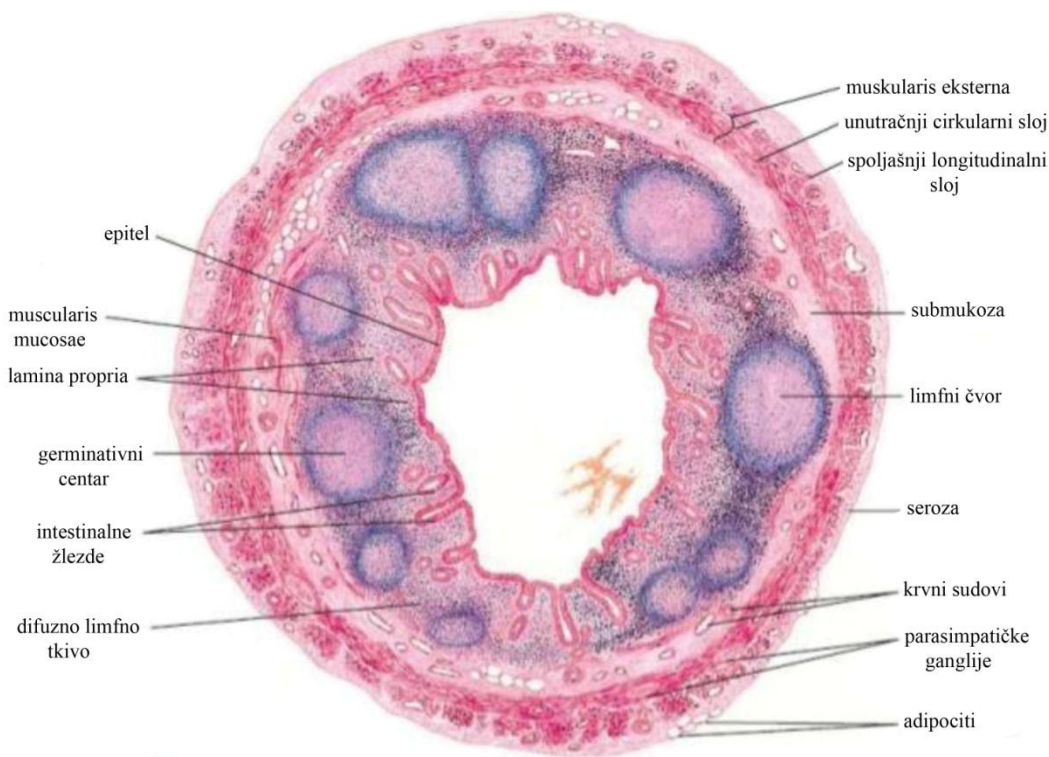


**Slika 1.** Anatomski odnosi apendiksa

Intestinalni trakt sadrži ogromnu količinu bakterija, koje su od limfnog tkiva u zidu creva odvojene samo jednoslojnim epitelom. Sveukupno limfno tkivo creva je označeno kao GALT (engl. gut-associated lymphoid tissue) i deo je sveukupnog mukoznog limfnog tkiva označenog kao MALT (engl. mucosal-associated lymphoid tissue).

Histološka građa crvuljka je slična građi debelog creva i sadrži sve slojeve u pravilnom rasporedu. Idući od lumena ka spolja opisuju se: mukoza sa jednoslojnim epitelom koji leži na lamini proprii formirajući varijabilno raspoređene kripte; submukoza; tunica muscularis; i seroza (Slika 2). Glavno histološko obeležje crvuljka jesu brojni udruženi sekundarni limfni čvorovi koji ispunjavaju veći deo sluznice i submukoze, odakle crvuljku i naziv *tonsilla abdominalis*. Limfno tkivo crvuljka se razvija tokom prve godine života. Lamina propria mucosae sadrži obilje migratornih ćelija, često slivenih u limfoidne agregate, koji se šire u submukozu, narušavajući

kontinuitet laminae muscularis mucosae. Za razliku od raštrkanih limfnih čvorova u zidu debelog creva, crvuljak, naročito kod dece, sadrži organizovane limfoidne agregacije koje se prostiru čitavom cirkumferencijom crvuljka, menjajući konture lumena (16).



**Slika 2.** Histološka građa apendiksa

Migratorne ćelije su predstavljene plazmocitima i T-limfocitima, ređe makrofagima, eozinofilima, B-limfocitima i mastocitima, dok limfoidne agregacije imaju sličnu organizaciju i funkciju kao i Peyerove ploče tankog creva (17). Tako se limfnom tkivu crvuljka opisuju folikuli, interfolikularne zone, mešovite ćelijske zone i folikulima pridruženi epitel. Folikul poseduje germinativni centar sa polimorfnom ćelijskom populacijom od malih i velikih B-limfocita različitog stepena maturacije, T-helper limfocita i makrofaga. Oko germinativnog centra je zona plašta sa malim i okruglim B-limfocitima. Između folikula se nalaze interfolikularne zone koje predominantno sadrže T-limfocite, sa odnosom 8:1 između T-helper i T-regulatornih (supresorskih) limfocita. Između epitela i limfnih folikula je mešovita ćelijska zona koju čine heterogene ćelije sastavljene od T i B-limfocita, makrofaga i plazmocita. Mukoza

crvuljka ima karakterističnu građu, različitu od kolona, sa mnogo većim brojem ćelija koje sadrže IgG (18).

Funkcija crvuljka još uvek nije razjašnjena. Iako postoje stavovi o tome da je u pitanju samo nefunkcionalni rudiment, rasprostranjeno limfno tkivo u zidu crvuljka sugerše značajnu ulogu u mukoznom imunitetu. Postoji teorija o stražarskoj i funkciji uzorkovanja antigenih struktura ingestiranog sadržaja, čemu u prilog govori i strateška pozicija crvuljka neposredno ispod Bauchini-jeve valvule (19). Opisana je i migracija B-limfocita iz crvuljka u laminu propriju udaljenih delova gastrointestinalnog trakta, gde u folikulima dolazi do njihove transformacije u IgA sekretujuće plazmocyte (18). Još jedna predložena funkcija crvuljka je i funkcija rezervoara za koliformne bakterije koje bivaju reinokulirane u kolon u uslovima narušene flore (20).

### **3. Definicija akutnog apendicitisa**

Akutni apendicitis predstavlja naglo nastalu upalu crvuljka, najčešće uzrokovanu bakterijskom infekcijom, koja može biti uslovljena opstrukcijom lumena crvuljka fekalomom; varijabilna klinička slika najčešće sadrži periumbilikalnu bol po tipu kolike i povraćanje praćeno povišenom telesnom temperaturom, leukocitozom i znacima peritonealnog nadražaja u desnom donjem kvadrantu abdomena; perforacija ili formiranje abscesa su česte komplikacije odložene hirurške intervencije.

### **4. Epidemiologija akutnog apendicitisa**

Svetska incidenca akutnog apendicitisa iznosi 86 slučajeva na 100000 stanovnika godišnje. Verovatnoća oboljevanja od akutnog apendicitisa u toku života u razvijenim zemljama je generalno oko 7%, nešto češće kod muškaraca 8,6% sa maksimalnom incidencom u uzrastu između 10 i 14 godina i 6,7% kod ženskog pola sa maksimalnom incidencom u uzrastu između 15 i 19 godina (21). Iako nije otkriven specifični genski marker, rizik za apendicitis kod dece sa pozitivnom porodičnom anamnezom je trostruko veći (22). Istraživanja su pokazala da je

učestalost apendicitisa veća kod pripadnika bele rase (23). Pojedini autori sugerišu veću učestalost apendicitisa tokom letnjih meseci, što govori u prilog uticaja spoljnjih faktora u nastanku apendicitisa (24).

## **5. Etiopatogeneza akutnog apendicitisa**

Klasično se etiopatogeneza akutnog apendicitisa opisuje kao dinamični patofiziološki proces koji se razvija unutar 36-48 časova. Inicijalni događaj je predstavljen luminalnom opstrukcijom vermiformnog apendiksa na bilo kom nivou, počev od vrha do apendikularno-cekalnog ušća, a u čijoj osnovi mogu biti brojni faktori, poput fekalita, stranog tela, limfoidne hiperplazije, maligniteta, ekstraluminalne kompresije (25, 26). Opstrukcija lumena rezultuje nakupljanjem mukusa i bakterijskim porastom, što dovodi do distenzije i posledične opstrukcije limfotoka i apendikularnog edema. Rastući intraluminalni pritisak u daljem toku kompromituje cirkulaciju dovodeći do prekida venske drenaže a nakon prevazilaženja perfuzionog kapilarnog pritiska i do ishemije, pre svega mukoze na antemezenterijalnoj strani (27). Anatomske i funkcionalne narušene mukoze postaje nekompetentna u svojoj barijernoj funkciji što dozvoljava bakterijsku invaziju i transmuralno širenje infekcije sa pratećim razbuktavanjem inflamatornog procesa. Po tradicionalnom shvatanju, svaki netretirani apendicitis nastavlja progresiju, preko flegmonozne i gangrenozne faze, do perforacije sa posledičnim peritonitisom i pretećom sepsom. Po ovoj teoriji, broj perforiranih apendicitisa je upravo srazmeran dužini trajanja simptoma akutnog apendicitisa. Novija istraživanja su pokazala da se značajan broj apendicitisa spontano zaustavlja, što objašnjava i patohistološki nalaz rekurentnog apendicitisa. Pojedini autori tvrde da se najveći broj perforacija dešava u ranoj fazi apendicitisa pa se samo mali broj može prevenirati ranim prijemom u bolnicu i operativnim lečenjem. Ovaj stav podržavaju i istraživanja po kojima uzdržani pristup sa odloženim hirurškim intervencijama, ne dovodi do značajnog povećanja nalaza perforativnog apendicitisa a smanjuje broj apendektomija sa normalnim nalazom. Prijavljeni su i slučajevi apendicitisa potvrđenih kompijuterizovanom tomografijom, sa spontanom rezolucijom. Ovi podaci daju osnov za tvrdnju da značajan broj apendicitisa biva spontano zalečen bez medicinskog praćenja i postavljene dijagnoze (28-31).

### ***5.1. Imunska osnova akutnog apendicitisa***

Fiziološka funkcija imunskog sistema je zaštita domaćina od širokog spektra patogenih mikroba i toksina, za koju namenu poseduje kompleksne protektivne mehanizme. Mehanizmi odbrane se sastoje od urođene imunosti koja posreduje u ranoj zaštiti i stečene imunosti koja se razvija sporije i obezbeđuje kasniju ali još efikasniju odbranu. Urođena (nespecifična) imunost je genetski kodirana, prisutna kod svih zdravih jedinki i čine je: fizičke i hemijske barijere organizma kao što su epitel i antimikrobne supstance; fagocitne ćelije (neutrofili i makrofagi) i prirodno-bilačke ćelije (NK-ćelije); proteini krvi, sistem komplemента i drugi medijatori zapaljenja; i proteini koji koordinišu ćelijske aktivnosti, označeni kao citokini. Stečena (specifična, adaptivna) imunost je usmerena na određeni agens ili antigen i predstavlja zapravo reakciju na njegovo prisustvo. Ona se formira tokom života i različita je kod jedinki iste vrste a karakterišu je sem visoke specifičnosti i sposobnost pamćenja i prepoznavanja agenasa. Stečeni imunski odgovor se pokreće samo onda kada agensi zaobiđu nespificičnu barijeru i dospeju do ćelija specifičnog imunskog sistema gde bivaju prepoznati kao strani. Postoje dva tipa stečene imunosti, humoralna i celularna imunost, koje su posredovane različitim ćelijama i molekulima. Humoralni imunski odgovor je posredovan antitelima koje proizvode B limfociti u odgovoru na prisustvo specifičnog antigena. Celularni imunski odgovor pruža zaštitu od intracelularnih agenasa posredstvom T-limfocita. Neki T-limfociti aktiviraju fagocite da unište prethodno fagocitovan agens (pomoćnički T-limfociti ili CD4+ ćelije), dok drugi tip uništava bilo koji tip ćelije domaćina u čijoj je citoplazmi agens prisutan (citotoksični T-limfociti ili CD8+ ćelije). Još jedna važna razlika između B i T-limfocita je da većina T-limfocita prepoznaje samo proteinske strukture, dok su antitela sposobna da prepoznaju veći broj različitih tipova molekula, uključujući proteinske, ugljeno-hidratne i lipidne antigene (32).

#### ***5.1.1. Neutrofili***

Neutrofili su važna vrsta ćelija u apendicitisu, što se potvrđuje i patohistološkim izveštajima. Predstavljaju jednu od prvih linija odbrane organizma protiv prodirućih agenasa kao što su bakterije. Ove ćelije imaju sposobnost fagocitoze, sekrecije litičkih enzima i produkcije slobodnih kiseoničkih radikala sa visokim antimikrobnim potencijalom. Aktivacija neutrofila je

dvostepeni proces i vrše je bakterije i njihovi produkti sa jedne, i citokini i hemokini sa druge strane. Osnovno histološko obeležje neutrofila (kao i bazofila i eozinofila) je postojanje citoplazmatskih granula sa proteinima sposobnim da ubiju bakterije i fagocituju oštećeno tkivo. Neutrofilne granule se, po vrsti proteina koje sadrže, dele na: primarne ili azurofilne, koje sadrže mijeloperoksidazu (MPO); sekundarne ili specifične, koje sadrže kolagenaze, gelatinaze i laktoferin; i tercijarne ili gelatinozne, koje sadrže gelatinaze kakva je matriksna metaloproteinaza (MMP). Aktivirani neutrofilni oslobađaju mijeloperoksidazu katalizujući stvaranje reaktivnih baktericidnih jedinjenja, uključujući i hipohlornu kiselinu, koja se smatra jednim od najjačih baktericidnih jedinjenja. Ova jedinjenja u isto vreme dovode i do tkivnih oštećenja. Matriksna metaloproteinaza je predstavljena grupom enzima koji regulišu sastav ekstracelularnog matriksa vršeći njegovu degradaciju i remodeliranje. Po svom supstratu se dele na elastaze, kolagenaze, gelatinaze, membranski tip, itd (33-35).

#### *5.1.2. Citokini antigen-prezentujućih ćelija*

Antigen-prezentujuće ćelije, kao što su tkivni makrofagi, proizvode citokine koji pojačavaju mehanizme urođenog imunskog odgovora i obezbeđuju važne signale za pokretanje i određivanje prirode adaptivnog imunskog odgovora. Citokini koji se dominantno proizvode od strane antigen-prezentujućih ćelija su TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-23 i IL-27 (36).

#### *5.1.3. Citokini pomoćničkih T-limfocita*

Osnovna podela pomoćničkih T-limfocita je izvršena na osnovu citokina koje proizvode, na Th1 i Th2 subpopulaciju (37). Th1 ćelije proizvode IFN- $\gamma$ , kontrolišući celularni odgovor i aktivirajući mononuklearne fagocite, NK-ćelije i citotoksične T-limfocite za eliminaciju intracelularnih mikroba i viralnih agenasa (38). Th2 ćelije proizvode IL-4, IL-5 i IL-13, stimulišući produkciju antitela, naročito izotipova IgE i IgG, koji su odgovorni za hipersenzitivne reakcije i imunski odgovor na parazite. Po ovoj podeli se i svi imunski odgovori mogu podeliti na Th1 i Th2 posredovane. Ubrzo po uspostavljanju ove teorije, otkriveni su i T regulatorni limfociti (39), koji za razliku od Th1 i Th2 ćelija, imaju važnu ulogu u regulaciji i obuzdavanju imunskog odgovora uz produkciju TGF- $\beta$ , IL-10 i IL-35. Ove ćelije pre svega sazrevaju u timusu, kada govorimo o prirodnim regulatornim T-limfocitima (nTreg), ali je opisana i njihova

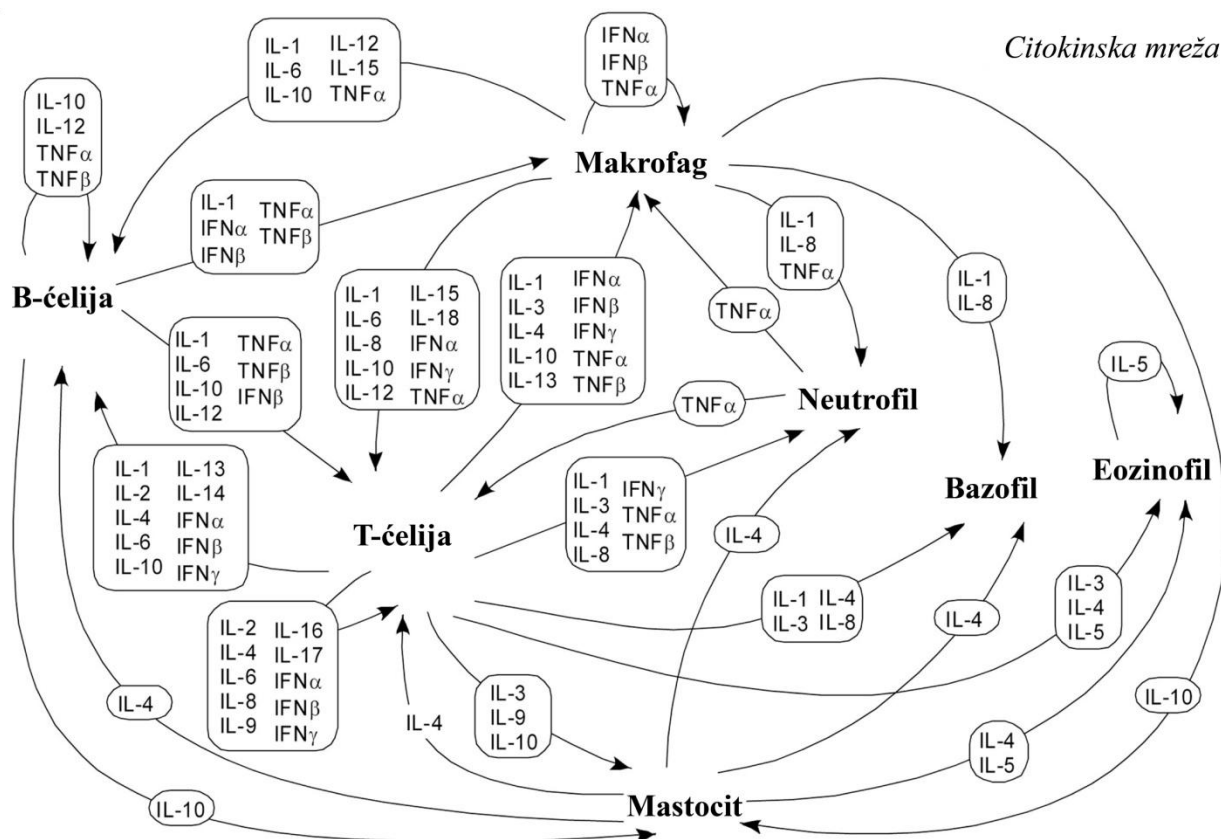
diferencijacija u perifernim limfnim organima, kada se govori o inducibilnim regulatornim T-limfocitima (iTreg) (40). Novootkriveni tipovi regulatornih T-limfocita su i Tip1 regulatorni T-limfociti koji se sreću u intestinalnoj mukozu i Th3 limfociti odgovorni za oralnu antigenu toleranciju (41). Nedavno je otkriven i četvrti tip pomoćničkih T-limfocita označen kao Th17 ćelije koje proizvode IL-17 (IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) i IL-17F (42-45). Ove ćelije se sreću u mukozama i smatraju se važnim u borbi protiv ekstracelularnih bakterija i gljivica (46). Citokini koje stvaraju utiču na mobilizaciju, aktivaciju i produženo preživljavanje neutrofila na mestu inflamacije (47). Potenciranjem produkcije proinflamatornih citokina (TNF, IL-6), hemokina i metaloproteinaze koordinišu tkivnu inflamaciju pojačavajući infiltraciju i tkivnu destrukciju. Nasuprot tome, brojni drugi antiinflamatorni citokini utiču na smanjenje opsega i trajanja inflamatornog procesa. Receptorski antagonist IL-1 (IL-1ra) blokira vezivanje IL-1 za površinu ćelija, a do njegovog stvaranja dolazi mehanizmom negativne povratne sprege uz pomoć TNF- $\alpha$  i IL-6 (48, 49). IL-4 kao glavni stimulans za diferencijaciju Th2 ćelija, u isto vreme suprimira diferencijaciju Th1 ćelija. Njegovi efekti su suprotni od efekata INF- $\gamma$ , smanjujući produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 i pojačavajući produkciju IL-1ra i IL-10 (50,51).

#### *5.1.4. Hemokini*

Hemokini predstavljaju grupu malih proteinskih molekula koji imaju hemoatraktivnu sposobnost i uslovljavaju hemotaksu brojnih ćelijskih tipova, pre svega neutrofila, monocita, limfocita, eozinofila. Većinu hemokina proizvode tkivne ćelije zapaljenjskog žarišta i infiltrisani leukociti. Po rasporedu cisteinskih ostataka, podeljeni su u četiri grupe: C (limfotaktin), CC (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), CXC (IL-8) i CXXXC (fraktalkin). Iako je hemotaksa njihova primarna uloga, značajni su i za sazrevanje leukocita u kostnoj srži i njihovo naseljavanje u afecirane regione (51).

Dakle, imunske ćelije: makrofagi, neutrofil, bazofil, eozinofil, T i B-limfociti, mastociti, su odgovorne za prepoznavanje patogena po proteinskim strukturama koje sekretuju ili nose na svojoj površini (52). Ove ćelije imaju različite uloge u imunskom sistemu i međusobno komuniciraju pomoću citokina koji kontrolišu proliferaciju, diferencijaciju i funkciju ćelija, koordinišući kompleksni imunski odgovor. Ta međućelijska komunikacija uz pomoć medijatora

se označava kao citokinska mreža (Shema 1). Njome je determinisana tkivna homeostaza a njena disregulacija može biti osnova brojnih patoloških stanja (53). Tumačenje aktivnosti unutar citokinske mreže može ukazivati na razvoj pojedinih patofizioloških procesa u organizmu.



**Shema 1.** Prikaz intercelularne komunikacije uz pomoć citokina

### 5.2. Patohistološki supstrat kod akutnog apendicitisa

Na osnovu korelacije kliničkih, laboratorijskih i morfoloških analiza definisani su patološki oblici akutnog apendicitisa koji uključuju gnojni (flegmonozni) apendicitis i nekrotični (gangrenozni) apendicitis sa ili bez perforacije (54). Flegmonozni apendicitis je predstavljen procesom koji zahvata čitav zid crvuljka, od mukoze, preko submukoze, do mišićnog sloja. Na preparatima dominira neutrofilna infiltracija. Kod gangrenoznog oblika, osim transmuralne zahvaćenosti, postoje i polja zahvaćena nekrozom koja nekada rezultuje i perforacijom



(perforativni apendicitis). U literaturi se opisuju i nepotpuno definisana stanja ranog i hroničnog apendicitisa. Rani (fokalni ili kataralni) apendicitisa karakteriše prisustvo neutrofilnih granulocita u lumenu ili fokalno u sluznici (endoapendicitis), često uz odsustvo bilo kakvih kliničkih simptoma. Značaj ovog nalaza je kontroverzan obzirom da se često sreće kod pacijenata kao uzgredni nalaz. Hronični (regresioni) apendicitis karakteriše razvoj granulacionog tkiva, fibroze ili predominacija limfocitnog i eozinofilnog granulocitnog infiltrata (55, 56). Zapaljenska infiltracija mezoapendiksa i peritoneuma (periapendicitis) povezana sa flegmonoznim apendicitisom, uz prisustvo perforacije ili bez nje, može značajno da utiče na simptomatologiju i učestalost postoperativnih komplikacija (57).

Promene kod ranog apendicitisa su često minimalne i diskutabilne u pogledu konfirmacije dijagnoze. Reaktivni folikuli i fokalne nakupine neutrofila u lumenu i lamini propriji se po najvećem broju autora ne smatraju dovoljnim za postavljanje dijagnoze. Ključni nalaz za potvrdu dijagnoze jeste prepoznavanje rane migracije ćelija akutnog zapaljenja u mukozi.

Iako je patohistološki nalaz normalnog apendiksa čest u radu kliničkog patologa, pod “negativnom apendektomijom” se podrazumeva samo normalan patohistološki nalaz nakon prethodno postavljene kliničke dijagnoze akutnog apendicitisa, a ne i u onim slučajevima kada je apendiks odstranjen u toku neke druge hirurške intervencije u abdomenu, a iz razloga prevencije (tzv. “incidentalna apendektomija”).

### ***5.3. Mikrobiološki nalaz kod akutnog apendicitisa***

Bakteriološki nalaz u odstranjenom crvuljku kod potvrđenog apendicitisa pokazuje obilan porast mešavine aerobnih i anaerobnih bakterija među kojima dominiraju *Escherichia coli* i *Bacteroides* spp. (58). Retko se, kada se radi o apendicitisu na terenu druge infekcije koja dovodi do reakcije limfnog tkiva crvuljka i posledične opstrukcije, mogu izolovati bakterije poput onih iz rodova *Yersinia*, *Salmonella* i *Shigella* (59, 60). Uzrok opstrukcije, takođe retko, mogu biti i paraziti kao što su *Ascaris*, *Entamoeba*, *Enterobius* i *Schistosoma* (61).

## 6. Klinička slika akutnog apendicitisa

Kliničku sliku akutnog apendicitisa karakteriše bol u truhu, kao dominantan simptom, koga prate gastroenteralna simptomatologija i sistemski znaci bolesti. Tradicionalno, progresija bolesti se opisuje od blažih simptoma u čijoj je osnovi jednostavna inflamacija do teže kliničke slike sa prostracijom usled perforacije i peritonitisa, do čega dolazi najčešće unutar 36 časova od pojave prvih simptoma. U skladu sa patohistološkim supstratom, klinički se akutni apendicitis deli na nekomplikovanu (jednostavnu) formu sa intraoperativnim nalazom flegmonozno izmenjenog apendiksa i komplikovanu (kompleksnu) formu, predstavljenu gangrenoznim ili perforativnim apendicitisom. Gangrenozno izmenjeni zid apendiksa gubi svoju barijernu funkciju za bakterijsku translokaciju, zbog čega se u kliničkom smislu poistovećuje sa perforativnim oblikom (62).

Bol je u početnoj fazi visceralnog karaktera, periumbilikalno lociran, srednjeg inteziteta i nastaje stimulacijom aferentnih vlakana torakalnih nerava na nivou Th8-Th10, zbog rastezanja apendikularnog zida. U toku 24 časa se intenzivira, poprimajući karakteristike somatskog bola i migrira u donji desni kvadrant abdomena. Opisana migracija bola ne predstavlja pomeranje zapaljenjskog žarišta niti realnog izvora bola, već potiče od progresije apendikularne inflamacije i peritonealnog nadražaja eksudacijom u apendikularnoj loži (62). Gubitak apetita, mučnina i opstipacija najčešće prate početak bolnih senzacija dok se ređe mogu javiti i pre pojave bola. Povraćanje i proliv su najčešće znaci perforativne apendikularne bolesti, uz znake jačeg peritonealnog nadražaja. Povišena telesna temperatura, tahikardija i leukocitoza nastaju kao posledica sistemskih efekata medijatora oslobođenih iz ishemičnog i inflamiranog tkiva, fagocita i limfocita. Komplikovani apendicitis je obično praćen visokom febrilnošću i neutrofilijom sa limfopenijom, uz porast C-reaktivnog proteina u serumu. Međutim, neretko se sreće normalan broj leukocita u krvnoj slici, dok je nivo C-reaktivnog proteina još manje specifičan znak, pogotovo kod mlađe dece (63).

Na kliničko ispoljavanje simptoma može uticati i prisustvo fizioloških položajnih varijacija vermiformnog apendiksa. U slučajevima inkompletne visceralne rotacije i abnormalnog rasporeda unutrašnjih organa može biti smešten bilo gde u abdomenu (63). Kod retrocekalno i pelvično lociranog apendiksa pojava bola peritonealnog nadražaja je odložena zbog kasnijeg

kontakta eksudata sa parijetalnim peritoneumom i nekada se javlja tek nakon perforacije i širenja infekcije po truhu. Kod retrocekalne lokalizacije bol se javlja u leđima dok je kod pelvične lokalizacije moguća pojava urinarnih tegoba kao što su polakisurija, retencija urina, bol niz unutrašnju stranu butine, mikrohematurija i sl. U slučajevima preilealne i postilealne lokalizacije, bol takođe može biti odložen ali se ranije mogu javiti povraćanje ili dijareja (64).

Takođe, klinička prezentacija akutnog apendicitisa kod dece u mnogome zavisi i od uzrasta. Kod mlađe dece zbog mobilnosti (nefiksiranosti) ileocekuma i kratkog omentuma obično ne dolazi do ograničavanja procesa u slučaju perforacije, već ista dovodi do difuznog peritonitisa sa mogućim komplikacijama, uključujući i sepsu. Kod starije dece, slično kao i kod odraslih, veliki omentum svojom funkcijom “čuvara trbuha” može da ograniči gnojni upalni proces nakon perforacije, formirajući absces u truhu. Retko se dešava da akutni apendicitis poprimi hronični tok ili da dođe do formiranja apendikularne mase (plastron) (65). Spontana rezolucija kod akutnog apendicitisa je takođe moguća i po novijim istraživanjima ne tako retka kod nekomplikovanih formi bolesti (66, 67).

## **7. Dijagnostika akutnog apendicitisa**

Nepostojanje dovoljno specifičnih kliničkih i laboratorijskih znakova, položajna varijabilnost apendiksa, nedovoljna pouzdanost ultrazvučnog pregleda kao i nesaradljivost mlađe dece tokom pregleda, dijagnozu akutnog apendicitisa i dalje čine velikim izazovom u kliničkom radu. Moderan dijagnostički princip za cilj ima pre svega potvrdu ili eliminaciju dijagnoze akutnog apendicitisa a nakon toga, kod konfirmativnog nalaza i diferencijaciju komplikovanog od nekomplikovanog oblika bolesti, što određuje i terapijske mogućnosti.

Prediktivne vrednosti pojedinih subjektivnih i objektivnih kliničkih znakova su nedovoljne zbog preklapanja sa simptomima brojnih drugih abdominalnih, uroloških i ginekoloških poremećaja. Tek njihovo kombinovano sagledavanje, uz dodatne dijagnostičke pretrage, može nešto jače sugerisati dijagnozu. Međutim, vrlo često je i ovakav pristup nedovoljan, pa terapijska odluka ostaje neutemeljena ili iznuđena. Najčešća obolenja koja kod dece mogu klinički imitirati akutni apendicitis i dovesti do “negativne apendektomije” su

infektivni gastroenteritis, mezenterijalni limfadenitis i nepotpuno definisano stanje tzv. “neurogene hiperplazije” u apendiksu (68).

Specifična lokacija i progresija bola uz gubitak apetita, mučninu i febrilnost su klinički najznačajniji parametri praćenja u svrhu dijagnostike. Gubitak apetita predstavlja značajan parametar jer gladno dete vrlo retko može imati apendicitis. Umerena leukocitoza, neutrofilija sa limfopenijom i skok C-reaktivnog proteina se prate laboratorijski, dok brojni ostali biomarkeri predstavljaju vanstandardne parametre praćenja vezane za pojedine centre. Proliv i povraćanje su obično znaci perforacije, dok pojava ozbiljnije gastrointestinalne simptomatologije pre pojave bola umanjuje verovatnoću apendicitisa. Opisani su i brojni drugi klinički znaci koji mogu biti od koristi za dijagnozu, kao što su Rowsing-ov znak, Grassmann-ov, Owing-ov, Horn-ov, Kruger-ov, znak psoasa, osetljivost prilikom rektalnog pregleda, palpabilna masa u desnoj ilijačnoj jami i slično. Ipak, prisustvo ovih kliničkih parametara ne potvrđuje zasigurno dijagnozu, niti je njihovo odsustvo može isključiti. Skoring klinički sistemi, poput PAS (69), modifikovanog Alvarado skora (70, 71) i Kharabanda skora (72) su takođe česti u kliničkom radu, kao pokušaj za sistematizaciju pojedinih kliničkih znakova i dopunsku pomoć dijagnostikovanju. Od slikovnih radioloških metododa, ultrazvučna dijagnostika je najčešća dok su kompijuterizovana tomografija i magnetna rezonanca metode koje se koriste u saglasnosti sa stavovima o štetnosti zračenja (CT) i tehničkim mogućnostima (MRI).

Laboratorijska dijagnostika akutnog apendicitisa delimično olakšava rad kliničara, utoliko što, kao i drugi klinički znaci, nije dovoljno pouzdana. Određivanje broja leukocita i apsolutnog broja neutrofila u leukocitarnoj formuli su parametri iz krvne slike koji se standardno koriste za dijagnozu. Ostali parametri, poput neutrofilno-limfocitnog odnosa (73) i mijeloperoksidaznog indeksa (74), u fazi su testiranja. U pogledu imunodijagnostike, akutni apendicitis predstavlja kaskadu događaja praćenih značajnim angažovanjem imunskog sistema, koji su inicirani opstrukcijom lumena, narušenom cirkulacijom sa posledičnom destrukcijom epitela, bakterijskom invazijom i leukocitnom infiltracijom. Sam proces leukocitne migracije i njihovog naseljavanja u ciljnim tkivima, uključuje složene interakcije posredovane brojnim humoralnim faktorima, kao što su C-reaktivni protein, citokini, hemokini, adhezioni molekuli, proteaze, i većim brojem ćelija, kao što su polimorfonukleari, T-limfociti, monociti i NK-ćelije. Od serumskih determinanti, rutinski je u upotrebi jedino C-reaktivni protein, iako su

prokalcitonin i bilirubin u više navrata ispitivani za ovu svrhu. Pored determinanti iz krvi i seruma ispitivani su i markeri iz urina (75). Nijedan od ispitivanih biomarkera nije pokazao, niti izolovano niti u kombinaciji sa drugim parametrima, dovoljnu kliničku korist kako bi bio implementiran u daljem dijagnostikovanju akutnog apendicitisa kod dece (74, 76). U tom smislu, i dalje postoji istraživačka orijentacija ka pronalaženju biomarkera dovoljne specifičnosti i senzitivnosti koji bi jasnije ukazali na stepen apendikularnog zapaljenja. Ovaj rad, takođe predstavlja deo tih istraživačkih napora.

Iako je primena radioloških dijagnostičkih metoda kod akutnog apendicitisa u porastu, nijedna od njih ne daje potpuno pouzdane informacije (Tabela 1).

<i>metoda</i>	<i>dijagnostički kriterijumi</i>	<i>dijagnostička pouzdanost</i>
nativna radiografija abdomena (RTG)	-	bez značaja u dijagnostici, nekada vidljiv fekolit
transabdominalna ultrasonografija (EHO)	nekompresibilna aperistaltička tubularna struktura promera >6mm	senzitivnost 86%, specifišnost 81%
kompjuterizovana tomografija (CT)	abnormalna struktura apendiksa ili kalcifikovani apendikolit udružen sa periapendikularnom inflamacijom ili promerom apendiksa >6mm	senzitivnost 94%, specifišnost 95%
magnetna rezonanca (MRI)	neustanovljeno	za slučajeve kod kojih je ograničena mogućnost upotrebe CT-a (npr. trudnoća)

**Tabela 1.** Radiološka dijagnostika akutnog apendicitisa (84-87)

Dok nativna radiografija abdomena nema većeg kliničkog značaja, najzastupljenija metoda je transabdominalna ultrasonografija. Tehnološkim napretkom, pouzdanost ove subjektivne metode, je u porastu (77). Dodatne pogodnosti za upotrebu su laka dostupnost ove metode i činjenica da deca imaju tanji muskularni sloj i manje masnih naslaga na trbušnom zidu, što olakšava i čini preciznijom ovu vrstu pregleda (78, 79). Kompjuterizovana tomografija ima najveću pouzdanost i naročito se koristi u razvijenijim zemljama. Međutim, važno ograničenje za

upotrebu je velika doza zračenja kojoj pacijenti, naročito u dečjem uzrastu, ne smeju bez preke potrebe biti izložena. Zbog toga je ova dijagnostička dopuna koristi strogo selektivno (80, 81). Metodom magnetne rezonance se izbegava jonizujuće zračenje kod dece. Međutim, mali broj centara je u mogućnosti da obezbedi tehničke uslove za izvođenje ovakve vrste pregleda u kratkom roku, zbog čega se o koristi ove metode kod akutnog abdomena generalno malo zna. U dijagnostici akutnog apendicitisa, ova metoda, smatra se, nema veću preciznost od transabdominalne ultrasonografije (82). Važan momenat, koji utiče na terapijski pristup, je predstavljen činjenicom da se nijednom od navedenih radioloških dijagnostičkih metoda, ne mogu pouzdano odvojiti perforativni od neperforativnih oblika akutnog apendicitisa (83).

## **8. Terapija akutnog apendicitisa**

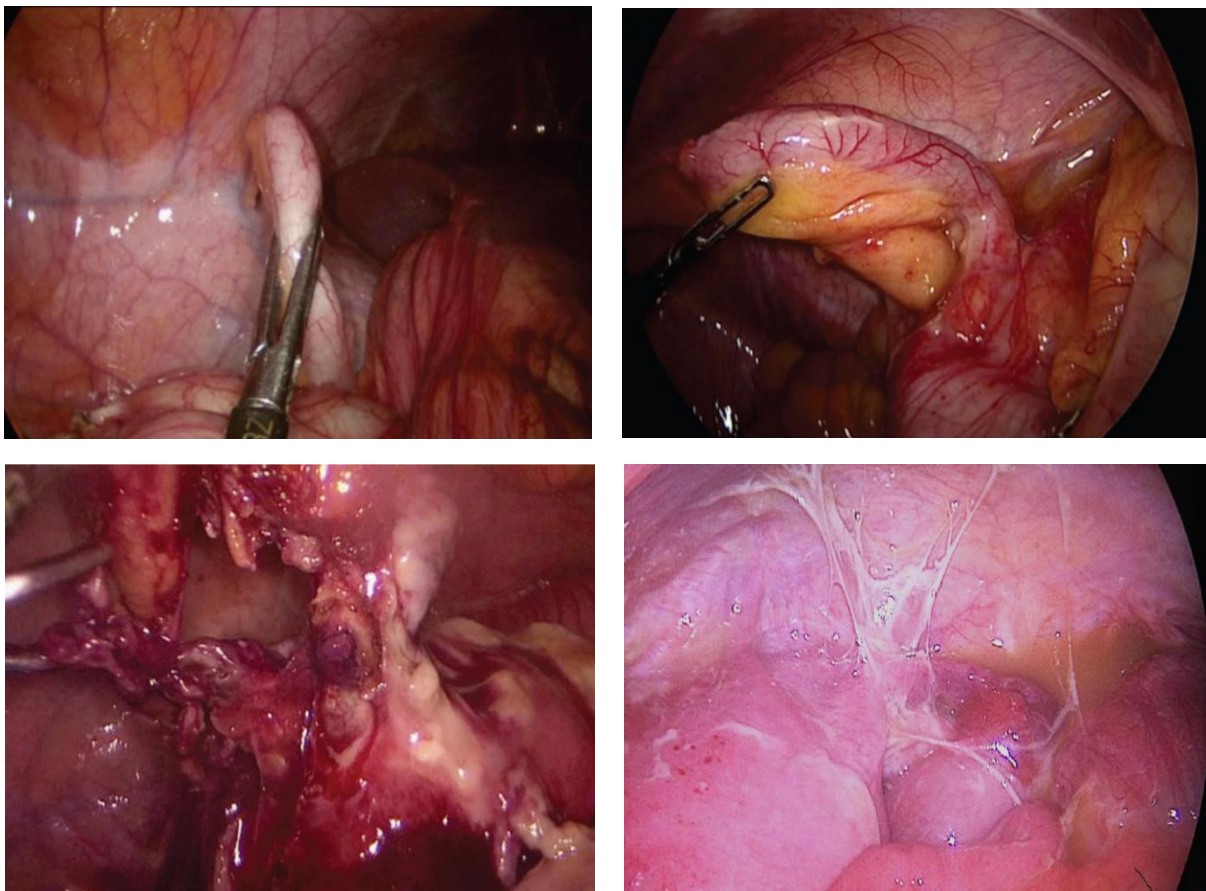
Nepostojanje pouzdanog dijagnostičkog protokola, uslovljava čestu dilemu u terapijskom pristupu. Propuštena ili odložena dijagnoza akutnog apendicitisa povećava verovatnoću perforativne bolesti, čija je najveća učestalost upravo kod mlađe dece (88), i koja rezultuje petostrukim uvećanjem verovatnoće postoperativnih komplikacija (89). Sa druge strane, izvestan broj negativnih eksplorativnih laparotomija je prihvaćen u hirurškoj praksi, upravo zbog teških posledica komplikacija perforativnog oblika. Pogotovo kod devojčica u adolescentnom periodu, negativne apendektomije mogu dostići učestalost i do 30% (90). Ovakve procedure, takođe podrazumevaju rizik od brojnih intraoperativnih i postoperativnih komplikacija.

Tako se kao najvažnije pitanje u kliničkom radu, nameće diferencijacija komplikovanog (gangrenoznog i/ili perforativnog) od nekomplikovanog (flegmonoznog) akutnog apendicitisa, dok se uobičajeno za procenu kvaliteta zbrinjavanja akutnog apendicitisa, uzima odnos između broja slučajeva komplikovane forme bolesti i broja negativnih apendektomija.

Početna terapija nekomplikovanog apendicitisa je konzervativna. Iako je spontana rezolucija nekomplikovanog apendicitisa moguća (tzv. reverzibilne forme apendicitisa), opservacija bez antibiotske terapije se ne praktikuje u kliničkom radu. Sa druge strane, intenzivno praćenje je neophodno, zbog moguće dalje progresije u komplikovanu formu bolesti. Izbor antibiotika treba da pokriva aerobne i anaerobne koliformne sojeve u trajanju od jednog do

tri dana intravenskim putem, sa nastavkom peroralnih antibiotika do deset dana. Oporavak na konzervativni tretman nosi rizik od recidiva u prvoj godini od 25-30% (91).

Operativno rešavanje, u zavisnosti od tehničkih mogućnosti i veštine hirurškog tima, može se sprovesti otvorenom, laparoskopskom ili kombinovanom tehnikom. Preoperativna antibiotska profilaksa i elektrolitna stabilizacija su sastavni deo pripreme pacijenta. Nekomplikovane forme se hirurški zbrinjavaju najčešće unutar osam časova od indikovanja (92), dok se komplikovani slučajevi sa znacima peritonitisa rešavaju po protokolima za hitne procedure. Rutinska postoperativna antibiotska terapija nije potrebna kod nekomplikovanih formi (93), dok se kod komplikovanih slučajeva sprovodi tri do pet dana (94, 95).



**Slika 3.** Laparoskopski prikaz akutnog apendicitisa: a-makroskopski normalan apendiks; b-nekomplikovani inflamirani apendiks; c-komplikovani apendicitis sa perforacijom i gnojnom formacijom; d-perforativni apendicitis sa difuznim peritonitisom

Uvođenje minimalno invazivnih hirurških procedura je značajno unapredilo zbrinjavanje akutnog apendicitisa. Laparoscopska apendektomija je, za uvežbani hirurški tim, metoda izbora kod nekomplikovanih apendicitisa, često je uokvirujući dnevnom hirurgijom. Komplikovane forme je poželjnije, uprkos invazivnosti, rešavati otvorenom procedurom (Slika 3).

---

*Nekomplikovani akutni apendicitis*

---

*stadijum 0* - normalan izgled apendiksa (endoapendicitis / periapendicitis)

*stadijum 1* - upaljeni apendiks (hiperemija, otok i fibrinske naslage ± perikolični infiltrat)

---

*Komplikovani akutni apendicitis*

---

*stadijum 2* - nekroza

*A* - segmentalna nekroza

*B* - bazalna nekroza

*stadijum 3* - inflamatorni tumor

*A* - flegmona

*B* - absces manji od 5 cm bez pneumoperitoneuma

*C* - absces veći od 5 cm bez pneumoperitoneuma

---

*stadijum 4* – perforacija i difuzni peritonitis sa ili bez pneumoperitoneuma

---

**Tabela 2.** Predlog novog ocenjivanja akutnog apendicitisa na osnovu kliničkih, radioloških i laparoscopskih nalaza (2015 god.)

Upotreba laparoskopije u kombinaciji sa kliničkim sagledavanjem i radiološkom dijagnostikom, dovela je do novog pristupa i predloga novog ocenjivanja (Tabela 2) u cilju preciznije klasifikacije i unapređenja zbrinjavanja pacijenata sa akutnim apendicitisom (96).



## ***Ispitanici i metode***

### ***Mesto istraživanja***

Sva ispitivanja obavljena su na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije i na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu.

### ***Ispitanici***

Na osnovu prethodne analize, uz snagu studije od 0,80 (80%) i verovatnoću  $\alpha$  (0,05), u ispitivanje je uključeno 127 konsekutivnih pedijatrijskih pacijenata sa Hirurške klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije, uzrasta od 3 do 16 godina, kod kojih je bila indikovana hirurška procedura otvorene apendektomije u uslovima opšte anestezije.

Pacijenti kod kojih je bio prisutan nalaz nekog drugog akutnog oboljenja i pacijenti sa operativnim nalazom drugih upalnih abdominalnih procesa, nisu uključeni u ispitivanje.

### ***Metode istraživanja***

Ispitivanje je dizajnirano kao prospektivna opservaciona studija, odobrena od strane Etičkog odbora Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije.

### *Obeležja posmatranja*

- demografske karakteristike (uzrast i pol)
- socio-epidemiološki kontekst (ishrana, boravak u kolektivu, izloženost duvanskom dimu) i podaci o hereditetu i komorbiditetu (apendecitis kod roditelja, abdominalna trauma, infekcije)
- prisustvo simptoma (gubitak apetita, mučnina i povraćanje, migracija bola iz periumbilikalne regije u desni donji kvadrant abdomena)
- prisustvo kliničkih znakova (porast telesne temperature, bolna osetljivost na površinsku palpaciju u desnom donjem kvadrantu abdomena, bolna osetljivost u desnom donjem kvadrantu abdomena na kašalj, perkusiju i probu skakanja)
- apsolutni i relativni broj leukocita, neutrofilno-limfocitni odnos, koncentracija C-reaktivnog proteina u serumu i mijeloperoksidazni indeks
- koncentracije citokina: *sE-selektin*, *G-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-alpha*, *IFN-gamma*, *IL-1alpha*, *IL-1beta*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p70*, *IL-13*, *IL-17A*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1alpha*, *MIP-1beta*, *LAP* i *TNF-alpha* u serumu i peritoneumskoj tečnosti
- makroskopske karakteristike reseciranog apendiksa (sadržaj lumena, širina lumena, nekroza (istanjenost) zida, izgled serozne površine)
- mikroskopske karakteristike reseciranog apendiksa (distribucija i ćelijski sastav zapaljenskog infiltrata u odnosu na histološke slojeve zida, cirkumferenciju i dužinu apendiksa; širina i sadržaj lumena apendiksa; ulceracije sluznice, nekroza zida i postojanje perforacije; hiperplazija/atrofija limfoidnog tkiva; prisustvo granulacionog tkiva, fibroze, nervne proliferacije; prisustvo periapendicitisa i sastav periapendikularnog zapaljenskog infiltrata)
- završna patohistološka dijagnoza ili zaključak: normalan (neizmenjen) apendiks; “rani” akutni apendicitis; gnojni (flegmonozni) apendicitis; gangrenozni (nekrotični) apendicitis; i perforativni apendicitis.

Prikupljanje podataka o demografskim karakteristikama, socio-epidemiološkim, hereditarnim, komorbiditetnim parametrima i prisustvu simptoma apendicitisa, vršeno je preoperativno, neposrednim uvidom u postojeću medicinsku dokumentaciju, kroz socio-epidemiološku anketu i anamnezu roditelja i pacijenata.

Detekcija kliničkih znakova apendicitisa vršena je preoperativno, objektivnim fizikalnim pregledom. Telesna temperatura je merena rektalno, digitalnim termometrom Geratherm®.

Uzorak periferne venske krvi za utvrđivanje apsolutnog broja leukocita, leukocitarne formule, i neutrofilnog mijeloperoksidaznog indeksa, obrađivan je hematološkim brojačem Advia 120 Simens u biohemijskoj laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije u Beogradu. Neutrofilno-limfocitni odnos je obračunavan automatski, kao količnik procentualnog udela neutrofila i limfocita, unošenjem podataka u Excel tabelu.

Serumske koncentracije C-reaktivnog proteina određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na aparatu Roche-Hitachi-c501 u biohemijskoj laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije u Beogradu.

Za kliničku ocenu nalaza kod sumnje na akutni apendicitis korišćen je *PAS (Pediatric Appendicitis Score)* sistem kojim je osam kliničkih parametra bodovano na sledeći način: gubitak apetita (1 bod), mučnina/povraćanje (1 bod), migracija bola iz periumbilikalne u desnu ilijačnu regiju (1 bod), osetljivost desne ilijačne regije na površinsku palpaciju (2 boda), bolna osetljivost u desnom donjem abdominalnom kvadrantu na kašalj, perkusiju i probu skakanja (2 boda), porast telesne temperature (1 bod), leukocitoza  $> 10000/\text{mm}^3$  (1 bod), neutrofilija  $> 75\%$  (1 bod).

Koncentracija citokina u serumu i peritoneumskoj tečnosti određivana je metodom protočne citometrije na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Serum dobijen centrifugiranjem periferne venske krvi i centrifugirani uzorci peritonealne tečnosti skladišteni su na  $-70\text{C}^\circ$  radi kasnije analize. Određivanje koncentracija sledećih citokina: *sE-selektin*, *G-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-alpha*, *IFN-gamma*, *IL-1alpha*, *IL-1beta*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p70*, *IL-13*, *IL-17A*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1alpha*, *MIP-1beta*, *LAP* i *TNF-alpha*, vršeno je uz pomoć komercijalnog flow-citometrijskog kita *Human Inflammation 20 plex BMS 819* na protočnom citometru Beckman Coulter FC500.

Patološka obrada preparata reseciranih apendiksa vršena je na Odeljenju za kliničku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije u Beogradu. Patološka analiza reseciranog apendiksa vršena je standardnim merenjem dimenzija i deskripcijom makroskopskih karakteristika apendiksa. Za mikroskopsku analizu uzimani su longitudinalni presek vrha apendiksa i poprečni preseki iz preostalog dela apendiksa i to najmanje jedan presek na svaki preostali centimetar njegove dužine. Uzorci su obrađivani standardnom metodom fiksacije tkiva u 10% formaldehidu, uklapanjem u parafin i standardnim bojenjem hematoksilinom i eozinom (HE) tkivnih preseka debljine 4-5  $\mu\text{m}$ . Pacijenti su na osnovu patohistološkog nalaza podeljeni u pet grupa: normalan nalaz vermiformnog apendiksa, rani apendicitis, flegmonozni apendicitis, gangrenozni apendicitis i perforativni apendicitis.

### *Obrada podataka*

U deskriptivnoj statistici korišćeni su uobičajeni parametri za procenu centralne tendencije podataka (srednja vrednost, medijana) kao i parametri za procenu varijabilnosti grupa (standardna devijacija, raspon, 95%-ne granice poverenja).

Normalnost raspodele proveravana je *Kolmogorov-Smirnov* testom. U zavisnosti od ove procene, za poređenje dve grupe korišćeni su *Mann-Whitney* test ili *Student T* test.

Za procenu značajnosti tri ili više grupa korišćeni su neparametarski *Kruskal-Wallis* test (*post hoc* Mann-Whitney test) ili *ANOVA* test u jednom pravcu (*post hoc* Bonferroni test).

Razlika distribucija obeležja između grupa proveravana je primenom  $\chi^2$ -testa. Za procenu jačine povezanosti različitih parametara korišćeni su *Spearman* ili *Pearson* test korelacije.

Senzitivnost i specifičnost varijabli analizirani su uz pomoć *ROC curve* procedure.

Statistički značajnim smatrane su razlike u slučaju  $p \leq 0,05$ , umereno statistički značajnim u slučaju  $p \leq 0,01$  i visoko statistički značajnim u slučaju  $p \leq 0,001$ . Svi statistički proračuni urađeni su korišćenjem *GraphPad Prism 5 version 5.01* softvera (GraphPad Prism Software Inc. California, USA).

## *Ciljevi ispitivanja*

Odrediti koncentracije citokina: *sE-selektin*, *G-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-alpha*, *IFN-gamma*, *IL-1alpha*, *IL-1beta*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p70*, *IL-13*, *IL-17A*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1alpha*, *MIP-1beta*, *LAP* i *TNF-alpha* iz uzoraka peritoneumske tečnosti uzetih neposredno po laparotomiji i uzoraka venske krvi uzetih neposredno pre uvida u anesteziju, prvog i trećeg dana nakon operacije i izvršiti poređenje koncentracija serumskih i peritoneumskih citokina kod dece podvrgnute apendektomiji sa različitim kliničkim, laboratorijskim i patohistološkim nalazima.

Izvršiti analizu demografskih i anamnestičkih podataka kao i analizu patohistoloških nalaza preparata reseciranih apendiksa kod pacijenata obuhvaćenih ovim ispitivanjem, radi korelacije sa ostalim parametrima praćenja.

Izvršiti analizu krvne slike i biohemijskih analiza markera inflamacije kao i skoriranje kliničkih nalaza u ispitivanoj grupi, radi korelacije sa ostalim parametrima praćenja

## *Hipoteze ispitivanja*

Nivoi serumskih i peritoneumskih koncentracija citokina: sE-selektin, G-CSF, ICAM-1, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, LAP i TNF-alpha značajno koreliraju sa kliničkim, laboratorijskim i patohistološkim nalazima kod dece podvrgnute apendektomiji.

Postoji značajna korelacija između vrednosti navedenih citokina u peritonealnoj tečnosti (lokalna inflamacija) i serumu (sistemska inflamacija).

## ***Rezultati***

U periodu od devet meseci (april - decembar 2015. godine), prospektivno je ispitano 129-oro dece, kod kojih je bila indikovana otvorena hirurška intervencija i koja su operisana zbog sumnje na akutni apendicitis.

Nakon patohistološke analize reseciranih apendiksa, svi pacijenti su podeljeni u tri grupe. Prvu patohistološku grupu (NEAA) su predstavljali pacijenti sa nalazom normalnog apendiksa ili ranog (kataralnog) apendicitisa; drugu, grupu nekomplikovanog apendicitisa (UAA), pacijenti sa nalazom flegmonoznog apendicitisa; dok su treću, grupu komplikovanog apendicitisa (CAA), predstavljali pacijenti sa nalazom gangrenoznog (nekrotičnog) i/ili perforativnog apendicitisa. Dve devojčice, kod kojih je patohistološki nađen izolovani periapendicitis, bile su isključene iz ispitivanja.

### ***9. Demografske karakteristike i socio-epidemiološki kontekst***

Ispitivana deca su bila starosnog uzrasta 3 do 16 godina, od čega 77-oro dečaka i 50 devojčica (brojčani odnos između polova 1.54 u korist dečaka), sa prosečnom starošću od  $10.43 \pm 4.02$  (dečaci:  $10.03 \pm 3.90$ ; devojčice:  $11.03 \pm 4.16$ ).

U prvu patohistološku grupu (NEAA) svrstano je 20 pacijenta (9 dečaka i 11 devojčica), u drugu (UAA) je svrstano 30 (18 dečaka i 12 devojčica), dok je u treću grupu (CAA) svrstano 77 pacijenata (50 dečaka i 27 devojčica).

U pogledu uzrasne i polne distribucije, najveći broj operisanih pacijenata se nalazio u uzrasnoj grupi 3 do 8 godina, nešto manji broj u grupi 13 do 16 godina, dok je najmanje pacijenata bilo u uzrasnoj grupi 9 do 12 godina. U sve tri uzrasne grupe dominirali su pacijenti muškog pola (Tabela 3).

	3-8 god.		9-12 god.		13-16 god.		$\Sigma$	
	dečaci	devojčice	dečaci	devojčice	dečaci	devojčice	dečaci	devojčice
NEAA (n = 20)	5	3	2	2	2	6	9	11
UAA (n = 30)	4	6	8	1	6	5	18	12
CAA (n = 77)	22	8	12	9	16	10	50	27
$\Sigma$	31	17	22	12	24	21	77	50
	48		34		45		127	

**Tabela 3.** Demografske karakteristike i distribucija pacijenata po grupama (NEAA – normalan nalaz apendiksa / rani akutni apendicitis; UAA – nekomplikovani akutni apendicitis; CAA – komplikovani akutni apendicitis).

Od ukupnog broja analiziranih pacijenata, njih 6-oro (4.7%) su rođeni prevremeno dok je kod 21 (16.5%) zabeležen anamnestički podatak akutnog apendicitisa u porodici. U kolektivu je boravilo 107-oro (84.3%) ispitivane dece, dok je duvanskom dimu bilo izloženo njih 51 (40.2%). Astma je zabeležena kod 8 (6.2%) dece, dok su hronično uvećane tonzile i/ili adenoidne vegetacije bile prisutne kod njih 29-oro (22.8%).

## ***10. Simptomi i klinički znaci***

Kod pacijenata su analizirani sledeći simptomi i klinički znaci: gubitak apetita, mučnina/povraćanje, migracija bola iz periumbilikalne u desnu ingvinalnu regiju, palpatorna bolna osetljivost desne ingvinalne regije, bolna osetljivost donjeg desnog abdominalnog kvadranta na kašalj, perkusiju i skakanje, i porast telesne temperature.



Najzastupljeniji simptomi su bili palpatorna bolna osetljivost desne ingvinalne regije, prisutna kod 126 (99.2%) pacijenata, i bolna osetljivost donjeg desnog abdominalnog kvadranta na kašalj, perkusiju i skakanje, prisutna kod 104 (81.9%) pacijenata. Svi ispitivani simptomi i klinički znaci bili su najprisutniji u grupi pacijenata sa komplikovanim akutnim apendicitisom. Apsolutna i procentualna zastupljenost pojedinih simptoma i kliničkih znakova, kod ukupnog broja pacijenata i po grupama, prikazana je u Tabeli 4.

Simptomi su se kod ispitivane dece javljali nekoliko sati do sedam dana pre hirurške intervencije, u najvećem broju slučajeva su trajali 1 do 2 dana. Od ukupnog broja pacijenata, kod njih 73-je simptomi su trajali kraće, dok je kod njih 54 trajanje simptoma bilo duže od 24 sata. Prosečno trajanje simptoma do hirurške intervencije bilo je oko 41 sat. Najduže prosečno trajanje simptoma pre intervencije, oko 54 sata, bilo je prisutno u grupi pacijenata sa normalnim nalazom apendiksa ili ranim apendicitisom. Prosečno trajanje simptoma u grupi pacijenata sa nekomplikovanim akutnim apendicitisom bilo je oko 32 sata, dok su u grupi pacijenata sa komplikovanim akutnim apendicitisom simptomi prosečno trajali 38 sati.

	$\Sigma$ (127) <i>n</i> (%)	NEAA (20) <i>n</i> (%)	UAA (30) <i>n</i> (%)	CAA (77) <i>n</i> (%)
gubitak apetita	92 (72,4)	16 (80)	13 (43,3)	63 (81,8)
mučnina/povraćanje	83 (65,4)	10 (50)	15 (50)	58 (75,3)
migracija bola iz PU u DIR	24 (18,9)	3 (15)	3 (10)	18 (23,4)
palpatorna bolnaosetljivist DIR	126 (99,2)	20 (100)	29 (96,7)	77 (100)
bolna osetljivost DDAK na KPS	104 (81,9)	14 (70)	19 (63,3)	71 (92,2)
porast telesne temperature	68 (53,5)	12 (60)	7 (23,3)	49 (63,6)

**Tabela 4.** Zastupljenost simptoma i kliničkih znakova kod ispitanih pacijenata (PU-periumbilikalna; DIR-desna ingvinalna regija; DDAK-donji desni abdominalni kvadrant; KPS-kašalj, perkusija i skakanje)

## ***11. Operativni nalaz***

Od ukupnog broja pacijenata, intraoperativni nalaz normalnog apendiksa ili ranog (kataralnog) apendicitisa (NEAA) imao je 21 (16.5%) pacijent, nalaz nekomplikovanog apendicitisa (UAA), ukupno 50 (39.4%) pacijenata i nalaz komplikovanog apendicitisa (CAA), ukupno 56 (44.1%) pacijenata. Od ukupnog broja pacijenata, 26.8% intraoperativnih

nalaza nije odgovaralo patohistološkom nalazu, gde je nalaz NEEA imalo 20 (15.7%) pacijenata, nalaz UAA 30 (23.6%) pacijenata, dok je nalaz CAA imalo 77 (60.7%) pacijenata (Tabela 5).

nalaz	intraoperativni	patohistološki
NEEA	21	20
UAA	50	30
CAA	56	77

**Tabela 5.** Učestalost operativnih i patohistoloških nalaza

Najveće neslaganje između nalaza bilo je prisutno kod patohistološkog nalaza komplikovanog apendicitisa (CAA), gde je u 27 (35.1%) slučajeva nalaz bio intraoperativno potvrđen, dok je kod 6 (7.8%) pacijenata nalaz bio intraoperativno precenjen (pacijenti su patohistološki pripadali grupi nekomplikovanog apendicitisa). Intraoperativni nalaz kod 1 (1.3%) pacijenta iz grupe nekomplikovanog apendicitisa, bio je potvrđen (Tabela 5).

## ***12. Rutinski laboratorijski nalazi***

Od standardnih laboratorijskih parametara, praćeni su: apsolutni broj leukocita, procentualni udeo neutrofila i limfocita, neutrofilno-limfocitni odnos, mijeloperoksidazni indeks i C-reaktivni protein. Ovi parametri su određivani iz preoperativnog uzorka venske krvi i iz uzoraka venske krvi od prvog i trećeg postoperativnog dana (Tabela 6).

	vreme uzorkovanja	WBC ( $10^9/l$ )	Ne (%)	Ly (%)	NLR	MPXI	CRP (mg/l)
NEAA (n=20)	pre operacije	12,89 ± 4,72	70,97 ± 10,87	18,90 ± 9,48	6,73 ± 8,57	-0,15 ± 5,76	53,85 ± 62,92
	1. postop. dan	12,19 ± 3,15	78,62 ± 7,48	13,30 ± 5,78	7,61 ± 5,10	2,11 ± 3,66	70,78 ± 74,53
	3. postop. dan	8,02 ± 2,33	61,97 ± 7,95	25,82 ± 7,32	2,74 ± 1,39	0,61 ± 5,25	52,12 ± 53,05
UAA (n=30)	pre operacije	13,60 ± 5,25	73,53 ± 14,20	17,44 ± 10,85	8,33 ± 9,05	-2,55 ± 5,30	25,11 ± 39,18
	1. postop. dan	11,00 ± 3,62	75,10 ± 10,18	16,99 ± 7,33	5,46 ± 2,85	-5,38 ± 9,11	37,61 ± 30,08
	3. postop. dan	7,62 ± 2,55	60,20 ± 11,49	27,36 ± 9,45	2,75 ± 1,85	-6,83 ± 9,75	21,95 ± 20,99
CAA (n=77)	pre operacije	19,32 ± 6,44	83,66 ± 6,47	8,48 ± 4,37	13,49 ± 10,24	-1,75 ± 5,88	69,50 ± 68,11
	1. postop. dan	13,14 ± 5,02	78,81 ± 7,65	12,97 ± 6,36	8,14 ± 5,35,95	-2,32 ± 5,70	124,10 ± 85,26
	3. postop. dan	9,47 ± 5,66	64,26 ± 12,87	23,50 ± 11,27	3,89 ± 3,01	-3,78 ± 6,26	74,09 ± 55,79

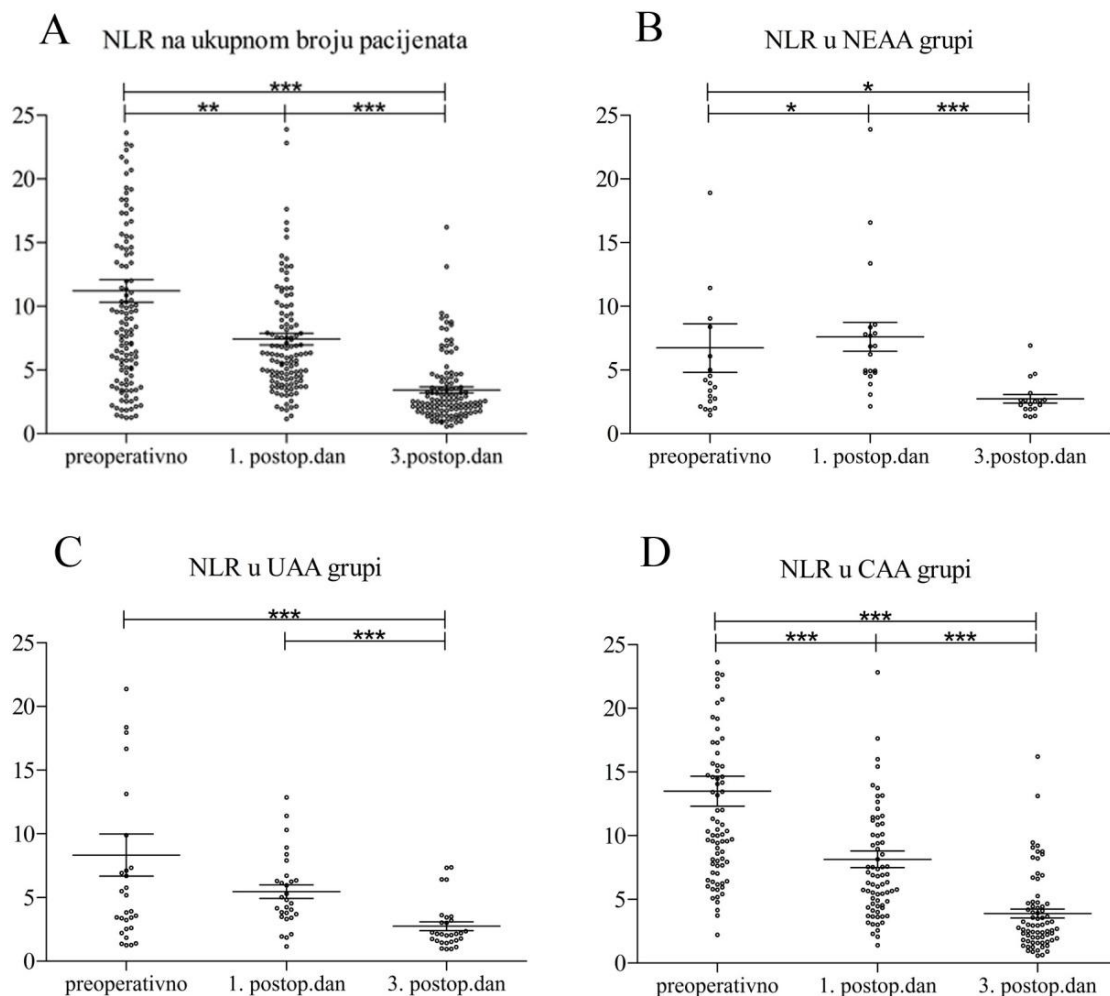
**Tabela 6.** Srednje vrednosti rutinskih laboratorijskih analiza u formiranim patohistološkim grupama pacijenata (WBC-leukociti; Ne-neutrofilni; Ly-limfociti; NLR-neutrofilno-limfocitni odnos; MPXI-mijeloperoksidazni indeks; CRP-C reaktivni protein)

## 12.1. Neutrofilno-limfocitni odnos (NLR)

Na ukupnom broju pacijenata, zabeležena je značajna statistička razlika između preoperativnih vrednosti NLR i vrednosti NLR od prvog i trećeg postoperativnog dana (Figura 1A). Vrednosti NLR su beležile kontinuirani pad od preoperativnih vrednosti ka vrednostima od trećeg postoperativnog dana, pokazujući razliku visoke statističke značajnosti između preoperativnih i vrednosti NLR od prvog postoperativnog dana ( $11.21 \pm 10.07$  vs.  $7.42 \pm 5.43$ ,  $p=0.0016$ ) i razlike veoma visoke statističke značajnosti između preoperativnih i vrednosti NLR od trećeg postoperativnog dana ( $11.21 \pm 10.07$  vs.  $3.44 \pm 2.61$ ,  $p<0.0001$ ), kao i između vrednosti NLR od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $7.42 \pm 5.43$  vs.  $3.44 \pm 2.61$ ,  $p<0.0001$ ).

### 12.1.1. NLR u tri vremena po patohistološkim grupama

Statistički značajne razlike u NLR između preoperativnih i vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana su nađene i u svakoj pojedinačnoj patohistološkoj grupi, ali sa različitim obrascem promene u NEAA grupi (Figura 1B). Naime, vrednosti NLR u NEAA grupi su bile najviše prvog postoperativnog dana, statistički značajno različite od preoperativnih vrednosti ( $7.61 \pm 5.10$  vs.  $6.73 \pm 8.53$ ,  $p=0.041$ ), kao i od vrednosti trećeg postoperativnog dana, sa veoma visokom statističkom značajnosti ( $7.61 \pm 5.10$  vs.  $2.74 \pm 1.39$ ,  $p=0.022$ ). Preoperativne vrednosti su u ovoj grupi, bile značajno više od vrednosti trećeg postoperativnog dana ( $6.73 \pm 8.53$  vs.  $2.74 \pm 1.39$ ,  $p<0.0001$ ). U UAA grupi, zabeležen je kontinuirani pad od preoperativnih ka vrednostima trećeg postoperativnog dana (Figura 1C), pri čemu nije bilo značajne razlike između preoperativnih i vrednosti od prvog postoperativnog dana, dok su razlike između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $5.46 \pm 2.85$  vs.  $2.75 \pm 1.85$ ,  $p<0.0001$ ), kao i između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $8.34 \pm 9.05$  vs.  $2.65 \pm 1.70$ ,  $p=0.0006$ ), bile sa veoma visokom statističkom značajnosti. U CAA grupi, takođe, vrednosti NLR su bile najviše preoperativno a najniže trećeg postoperativnog dana (Figura 1D). Razlike veoma visoke statističke značajnosti, bile su i u ovoj grupi prisutne između preoperativnih i vrednosti od prvog postoperativnog dana ( $13.49 \pm 10.24$  vs.  $8.15 \pm 5.54$ ,  $p<0.0001$ ), između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $8.15 \pm 5.54$  vs.  $3.89 \pm 3.01$ ,  $p<0.0001$ ), kao i između preoperativnih i vrednosti NLR od trećeg postoperativnog dana ( $13.49 \pm 10.24$  vs.  $3.89 \pm 3.01$ ,  $p<0.0001$ ).



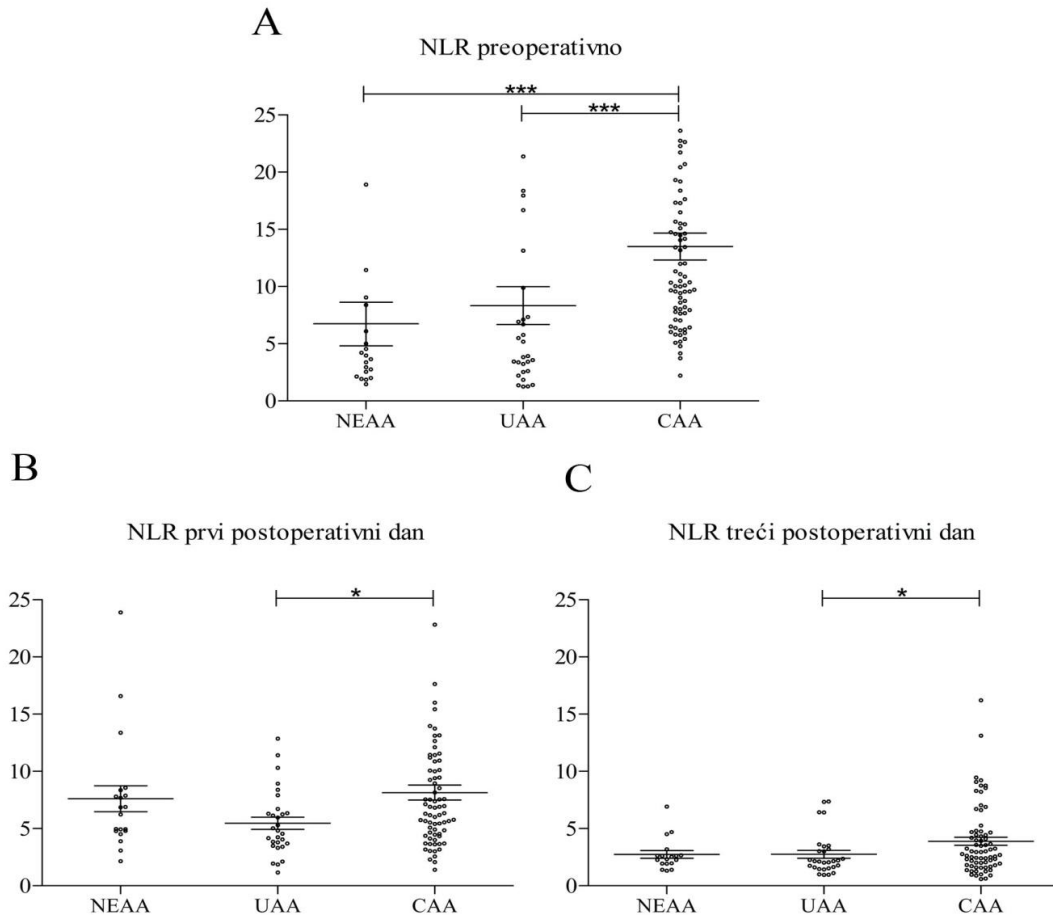
**Figura 1.** Komparacija NLR vrednosti u tri vremena kod ukupnog broja pacijenata (A); u NEAA grupi (B); u UAA grupi (C); u CAA grupi (D). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 12.1.2. Razlike NLR između patohistoloških grupa, u tri vremena

Najniže preoperativne vrednosti NLR su bile prisutne u NEAA grupi (Figura 2A), statistički značajno manje nego u CAA grupi ( $6.73 \pm 8.53$  vs.  $13.49 \pm 10.24$ ,  $p < 0.0001$ ), dok prema UAA grupi statistička značajnost nije dosegnuta. Razlika između UAA i CAA grupe je takođe bila statistički značajna ( $8.33 \pm 9.05$  vs.  $13.49 \pm 10.24$ ,  $p < 0.0001$ ).

Prvog postoperativnog dana, najniže vrednosti NLR su bile prisutne u UAA grupi (Figura 2B), pri čemu je statistička značajnost dosegnuta prema CAA grupi ( $5.46 \pm 2.85$  vs.  $8.14 \pm 5.54$ ,  $p = 0.0106$ ) ali ne i prema NEAA grupi. Statistička značajnost nije dosegnuta u vrednostima NLR između NEAA i CAA grupe.

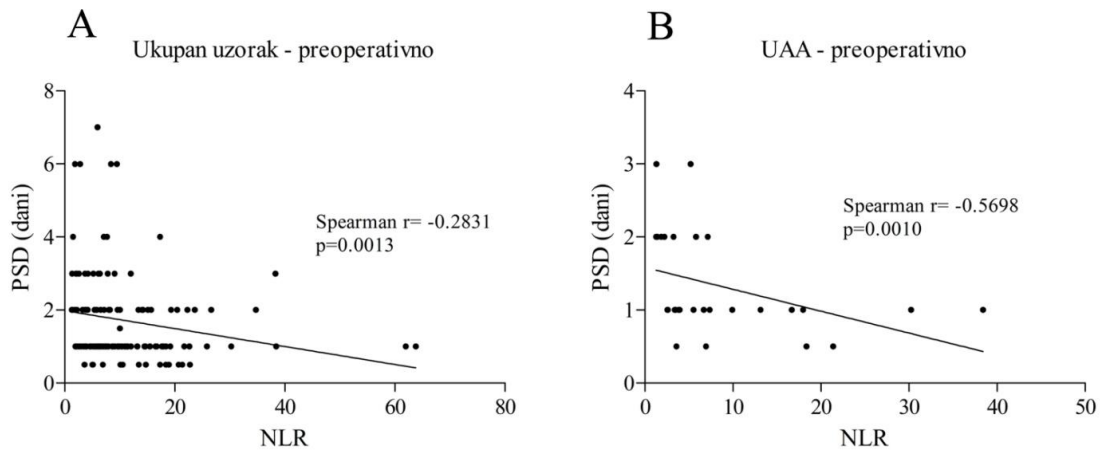
Trećeg postoperativnog dana, vrednosti NLR su bile skoro podjednake u NEAA i UAA grupi, dok su vrednosti u CAA grupi bile najviše (Figura 2C). Statistički značajna različitost je bila prisutna samo između UAA i CAA grupe ( $2.76 \pm 1.85$  vs.  $3.89 \pm 3.01$ ,  $p=0.0488$ ).



**Figura 2.** Komparacija NLR vrednosti između patohistoloških grupa u tri vremena: preoperativno (A); prvog postoperativnog dana (B); trećeg postoperativnog dana (C). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 12.1.3. Korelacija NLR sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)

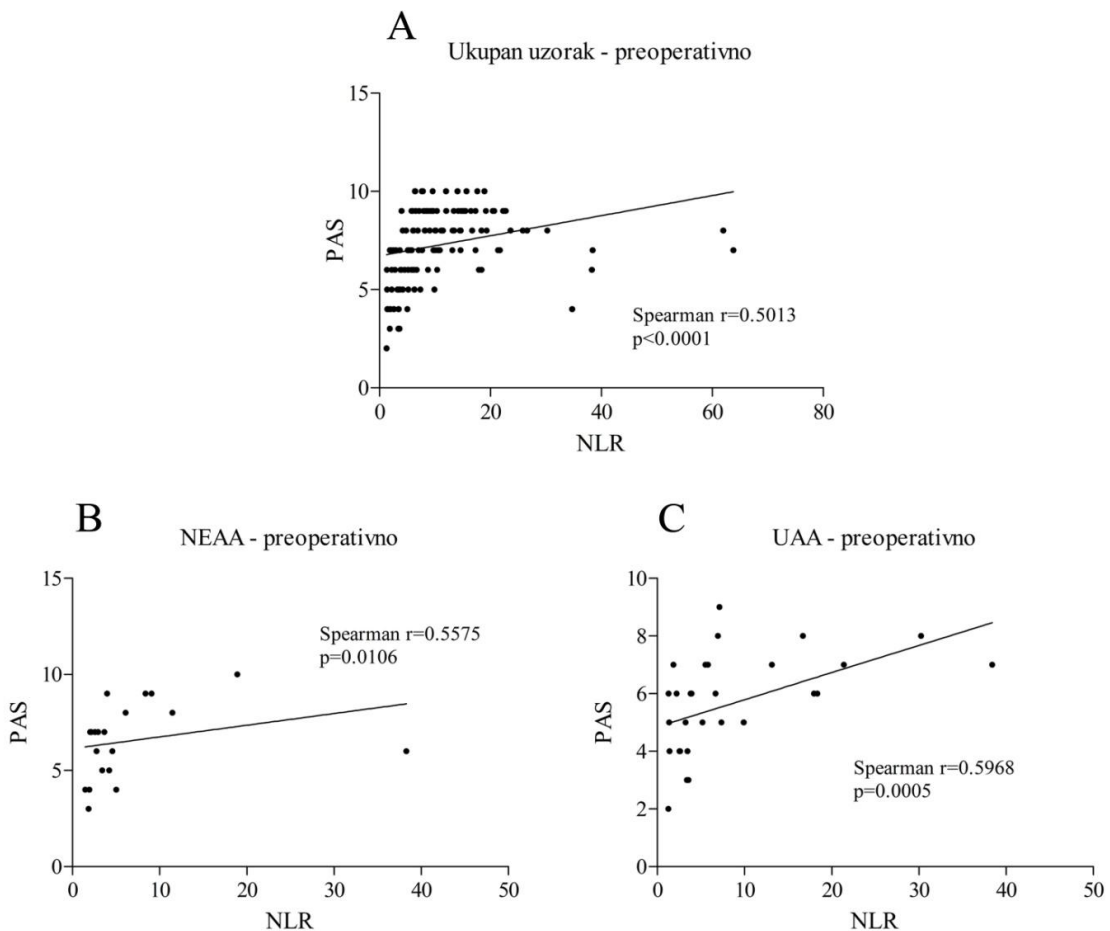
Preoperativne vrednosti NLR su pokazale negativnu korelaciju sa PSD na ukupnom broju pacijenata (Spearman  $r = -0.2831$ ,  $p = 0.0013$ , Figura 3A), kao i u UAA grupi pacijenata (Spearman  $r = -0.5698$ ,  $p = 0.0010$ , Figura 3B). U grupi NEAA i CAA, statistička značajnost korelacije NLR i PSD nije nađena.



**Figura 3.** Korelacija NLR sa preoperativnim trajanjem simptoma: na ukupnom uzorku (A); u UAA grupi (B).

#### 12.1.4. Korelacija NLR sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)

Preoperativno je, na ukupnom uzorku, nađena statistički značajna pozitivna korelacija vrednosti NLR i PAS (Spearman  $r=0.5013$ ,  $p<0.0001$ , Figura 4A).

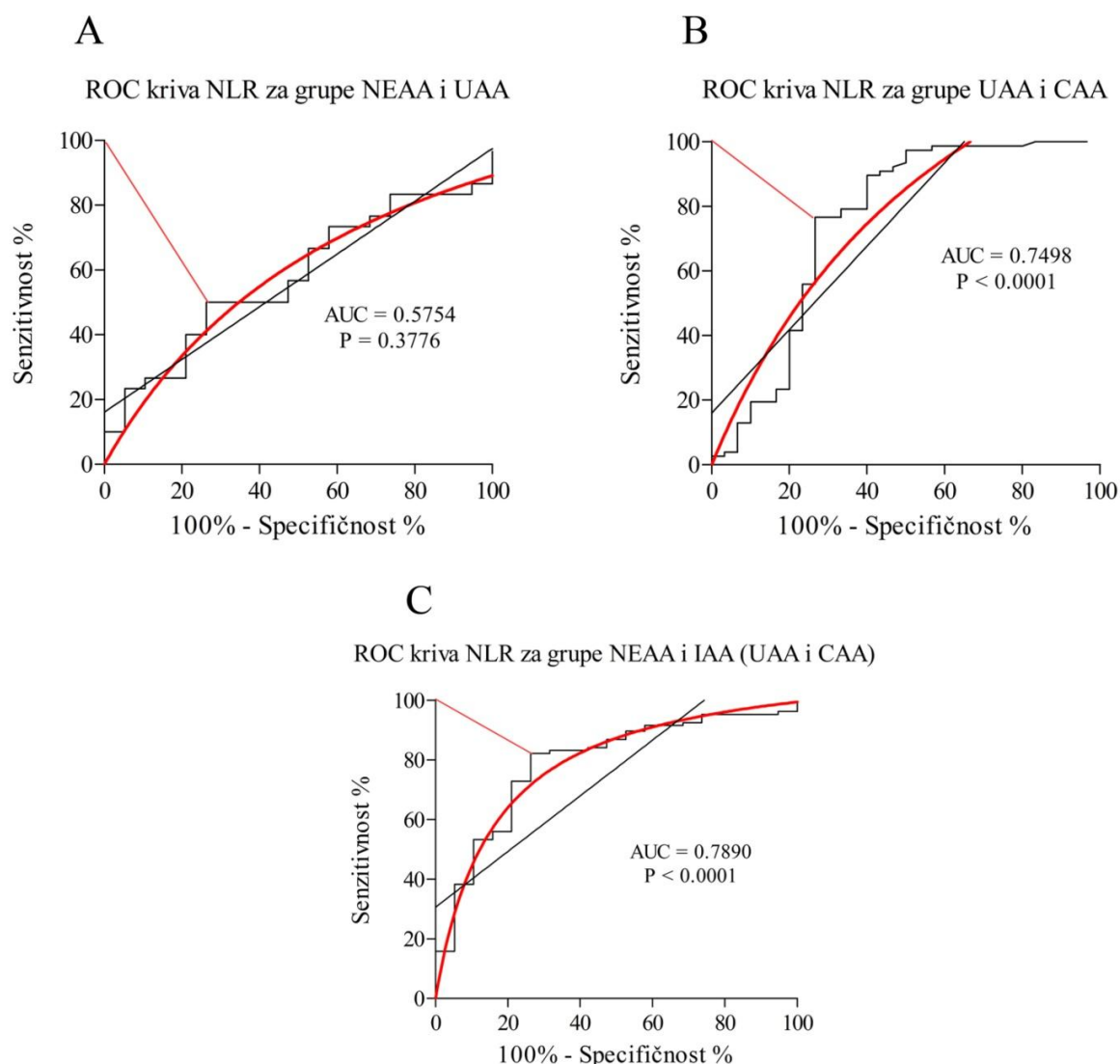


**Figura 4.** Korelacija NLR sa Pedijatrijskim apendicitis skorom: na ukupnom uzorku (A); u NEAA grupi (B); u UAA grupi (C).

Takođe, značajna pozitivna korelacija ovih vrednosti je nađena i u grupama NEAA (Spearman  $r=0.5575$ ,  $p=0.0106$ , Figura 4B) i UAA (Spearman  $r=0.5968$ ,  $p=0.0005$ , Figura 4C). U grupi CAA nije nađena statistički značajna korelacija ovih vrednosti.

#### 12.1.5. Razgraničavajuće (cut-off) vrednosti NLR između patohistoloških grupa

Optimalna razgraničavajuća NLR vrednost između NEAA i UAA grupe pacijenata bila je 5.1, sa senzitivnošću od 50.00% i specifičnošću od 73.78% (AUC=0.5754,  $p=0.3776$ , Figura 5A), što predstavlja nepouzdan test.



**Figura 5.** ROC (Receiver Operating Characteristic) krive formiranih patohistoloških grupa. ROC kriva za NEAA i UAA grupu (A); ROC kriva za UAA i CAA grupu (B); i ROC kriva za NEAA i IAA (UAA + CAA) grupu (C).



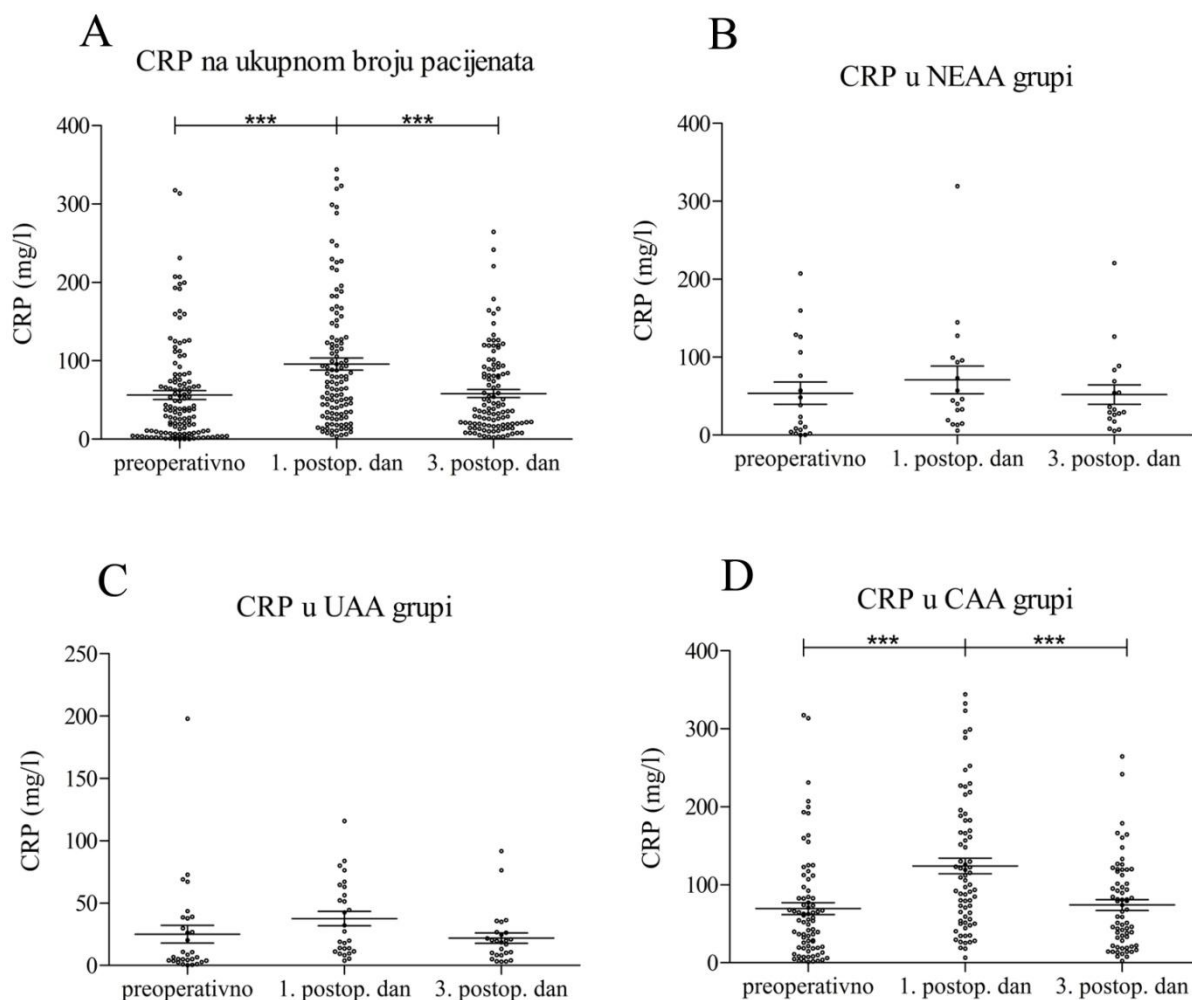
Između grupa UAA i CAA, optimalna razgraničavajuća vrednost NLR je iznosila 7.49, sa senzitivnošću od 76.62% (AUC=0.7948,  $p<0.0001$ , Figura 5B) i specifičnošću od 73.33%, što predstavlja test umerene pouzdanosti. Između grupe NEAA i grupe pacijenata sa inflamiranim apeniksom (združeni pacijenti grupe UAA i grupe CAA), dobijena je optimalna razgraničavajuća vrednost NLR od 5.1, sa senzitivnošću od 82.24% i specifičnošću od 73.68% (AUC=0.7890,  $p<0.0001$ , Figura 5C), što predstavlja test umerene pouzdanosti.

## 12.2. C - reaktivni protein (CRP)

Kod ukupnog broja pacijenata, vrednost CRP je bila najviša prvog postoperativnog dana (Figura 6A). dok su slične vrednosti bile zabeležene preoperativno i trećeg postoperativnog dana. Statistički visoko značajna razlika bila je prisutna između preoperativnih vrednosti i vrednosti CRP od prvog postoperativnog dana ( $56.57\pm 63.94$  vs.  $95.94\pm 82.76$ ,  $p<0.0001$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $95.94\pm 82.76$  vs.  $58.31\pm 53.60$ ,  $p<0.0001$ ). Preoperativne i vrednosti CRP od trećeg postoperativnog dana su bile slične i statistički značajna razlika ovde nije zabeležena.

### 12.2.1. CRP u tri vremena po patohistološkim grupama

Vrednosti CRP po patohistološkim grupama, menjale su se tokom vremena po istom modelu kao i na ukupnom uzorku, pokazujući najviše vrednosti prvog postoperativnog dana (Figure 6B, 6C i 6D). Međutim, ove su se vrednosti značajno razlikovale samo u CAA grupi, i to ponovo sa vrlo visokom statističkom značajnosti, između preoperativnih i vrednosti od prvog postoperativnog dana ( $69.50\pm 68.11$  vs.  $124.10\pm 85.26$ ,  $p<0.0001$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $124.10\pm 85.26$  vs.  $74.09\pm 55.79$ ,  $p=0.0002$ ). Statistička razlika između preoperativnih vrednosti CRP i vrednosti od trećeg postoperativnog dana nije bila prisutna ni u ovoj patohistološkoj grupi.



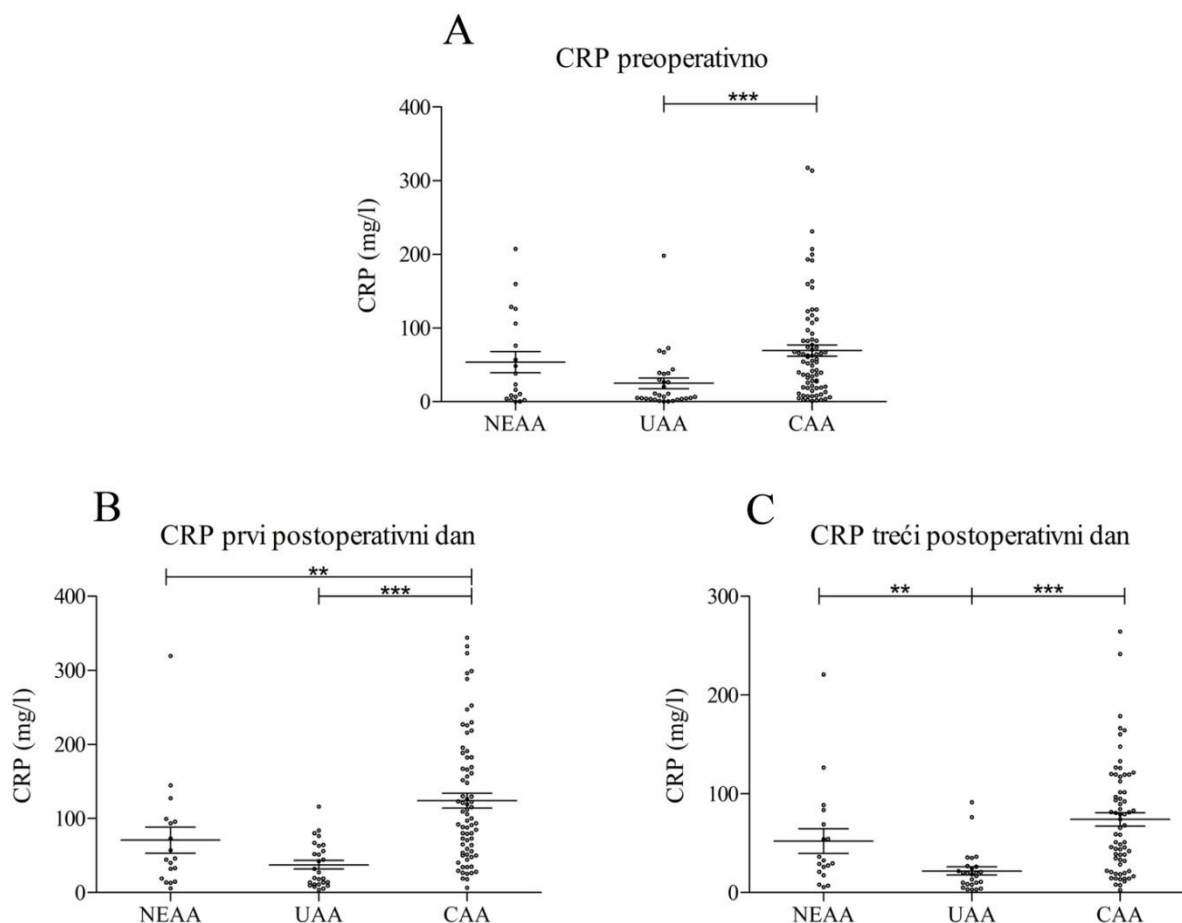
**Figura 6.** Komparacija CRP vrednosti u tri vremena kod ukupnog broja pacijenata (A); u NEAA grupi (B); u UAA grupi (C); u CAA grupi (D). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 12.2.2. Razlike CRP između patohistoloških grupa, u tri vremena

Najniže preoperativne vrednosti CRP su bile prisutne u UAA grupi (Figura 7A), pri čemu su se statistički značajno razlikovale samo od CAA grupe ( $25.11 \pm 39.18$  vs.  $69.50 \pm 68.11$ ,  $p < 0.0001$ ), dok prema NEAA grupi statistička značajnost nije dosegnuta. Razlika između NEAA i CAA grupe takođe nije bila statistički značajna.

Prvog postoperativnog dana, najniže vrednosti CRP su bile prisutne u UAA grupi (Figura 7B), pri čemu je statistička značajnost dosegnuta ponovo samo prema CAA grupi ( $37.61 \pm 30.08$  vs.  $124.10 \pm 85.26$ ,  $p < 0.0001$ ). Statistička značajnost nije dosegnuta u vrednostima CRP između UAA i NEAA grupe ali je bila prisutna između NEAA i CAA grupe ( $70.78 \pm 74.53$  vs.  $124.10 \pm 85.26$ ,  $p = 0.0041$ ).

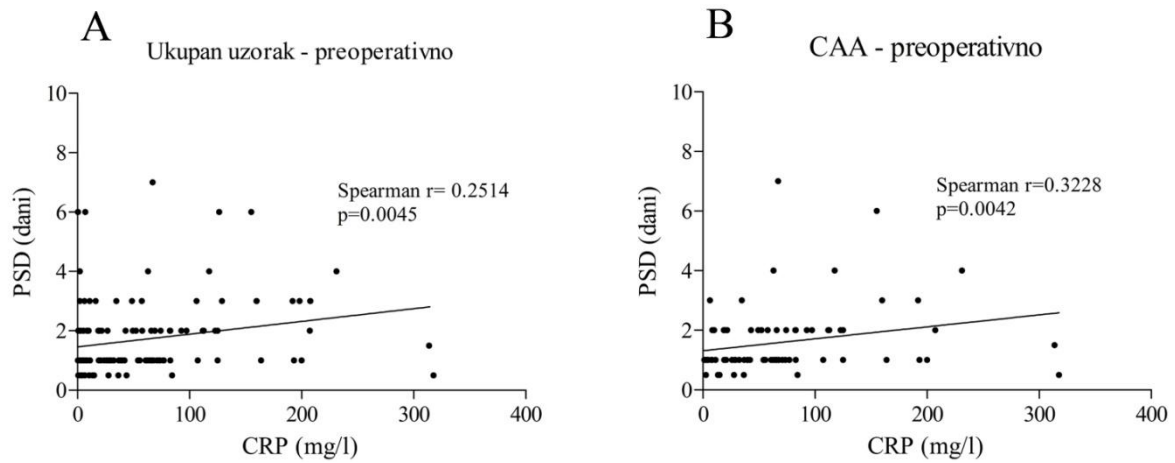
Trećeg postoperativnog dana, ponovo su vrednosti CRP bile najniže u UUA grupi (Figura 7C), dostižući statistički značajnu razliku i prema NEAA grupi ( $37.61 \pm 30.08$  vs.  $70.78 \pm 74.53$ ,  $p=0.0083$ ) i prema CAA grupi ( $37.61 \pm 30.08$  vs.  $124.10 \pm 85.26$ ,  $p<0.0001$ ). Razlika između NEAA i CAA grupe nije zabeležena.



**Figura 7.** Komparacija CRP vrednosti između patohistoloških grupa u tri vremena: preoperativno (A); prvog postoperativnog dana (B); trećeg postoperativnog dana (C). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

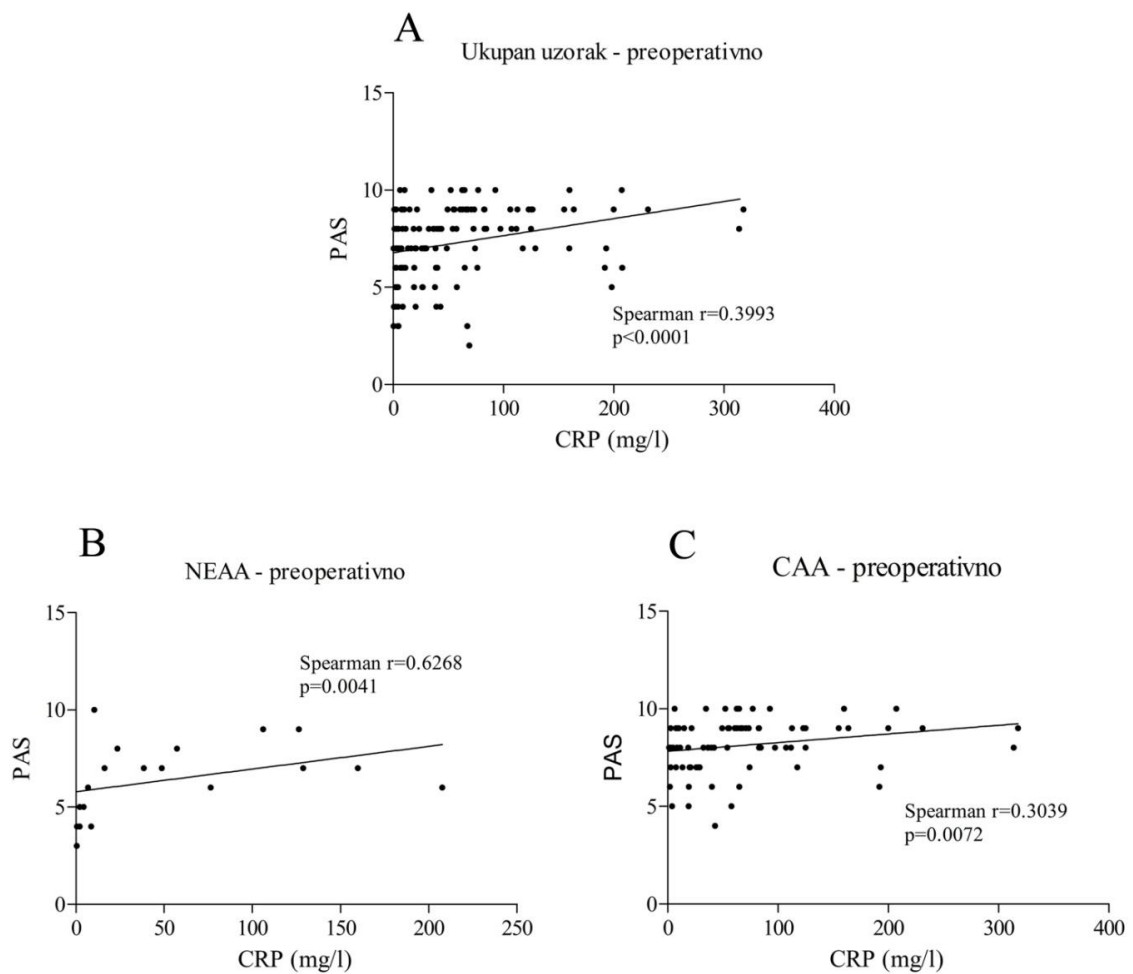
### 12.2.3. Korelacija CRP sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)

Preoperativne vrednosti CRP su pozitivno korelirale sa PSD na ukupnom broju pacijenata (Spearman  $r=0.2514$ ,  $p=0.0045$ , Figura 8A), kao i u CAA grupi pacijenata (Spearman  $r=0.3228$ ,  $p=0.0042$ , Figura 8B). U grupi NEAA i UAA, statistička značajnost korelacije CRP i PSD nije nađena.



**Figura 8.** Korelacija CRP sa preoperativnim trajanjem simptoma: na ukupnom uzorku (A); u CAA grupi (B).

#### 12.2.4. Korelacija CRP sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)

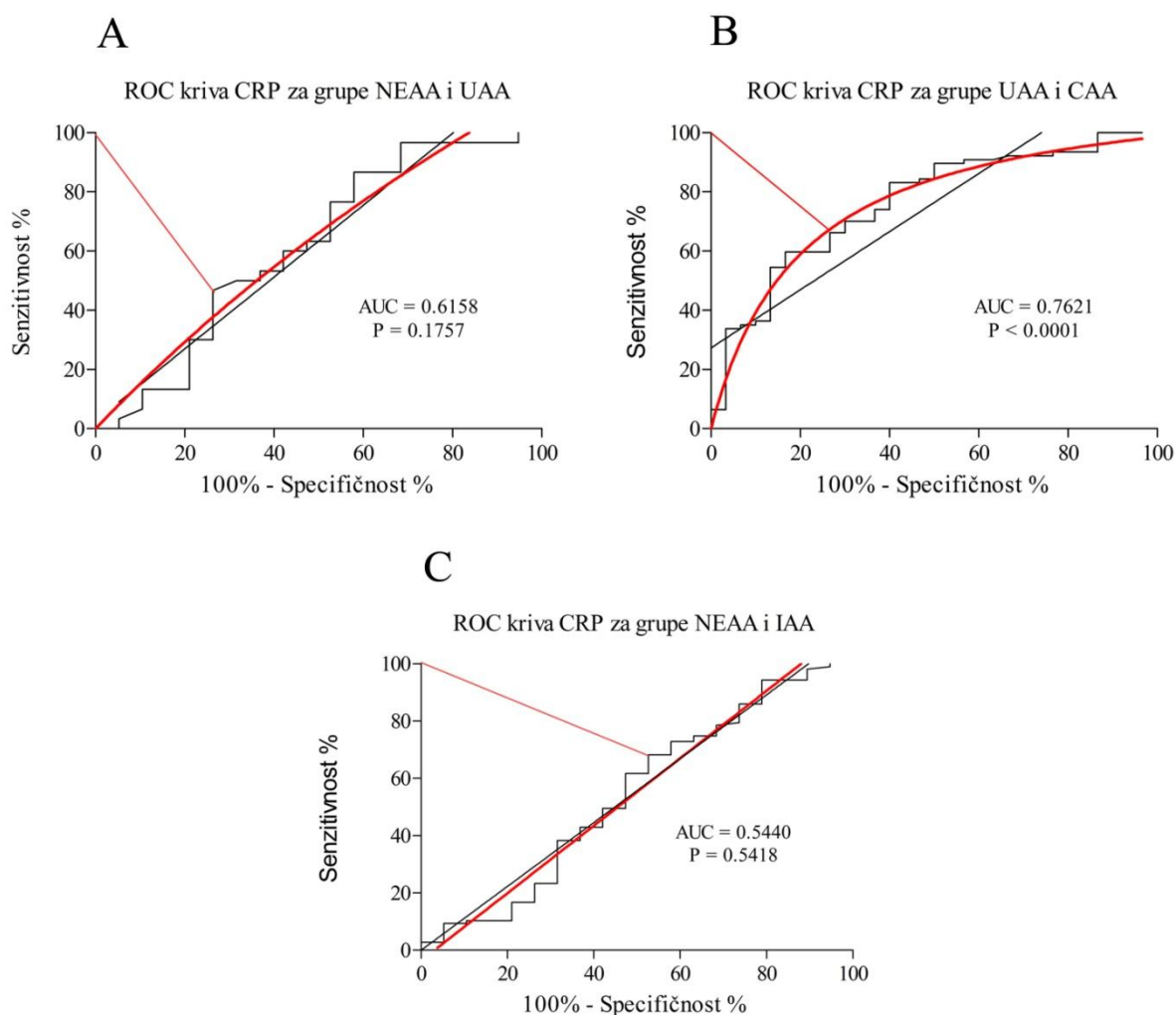


**Figura 9.** Korelacija NLR sa Pedijatrijskim apendicitis skorom: na ukupnom uzorku (A); u NEAA grupi (B); u CAA grupi (C).

Preoperativno je, na ukupnom uzorku, nađena statistički značajna pozitivna korelacija vrednosti CRP i PAS (Spearman  $r=0.3993$ ,  $p<0.0001$ , Figura 9A). Takođe, značajna pozitivna korelacija ovih vrednosti je nađena i u grupama NEAA (Spearman  $r=0.6268$ ,  $p=0.0041$ , Figura 9B) i CAA (Spearman  $r=0.3039$ ,  $p=0.0072$ , Figura 9C). U grupi UAA korelacija ovih vrednosti nije zabeležena.

#### 12.2.5. Razgraničavajuće (cut-off) vrednosti CRP između patohistoloških grupa

Optimalna razgraničavajuća CRP vrednost između NEAA i UAA grupe pacijenata bila je 6.6 mg/l, sa senzitivnošću od 46.67% i specifičnošću od 73.68% (AUC=0.6158,  $p=0.1757$ , Figura 10A), što predstavlja nepouzdan test.

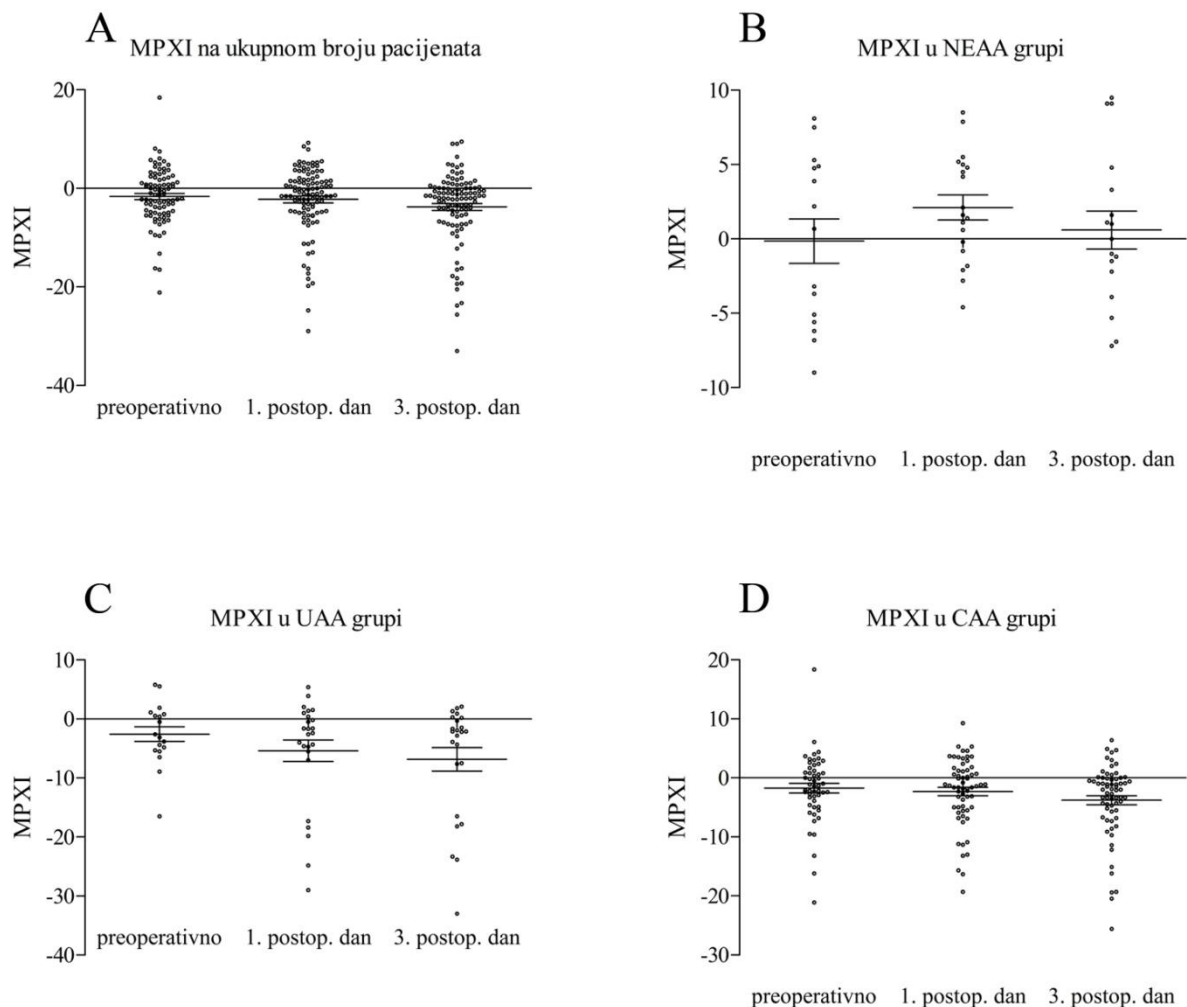


**Figura 10.** ROC (Receiver Operating Characteristic) krive formiranih patohistoloških grupa. ROC kriva za NEAA i UAA grupu (A); ROC kriva za UAA i CAA grupu (B); i ROC kriva za NEAA i IAA (UAA + CAA) grupu (C).

Između grupa UAA i CAA, optimalna razgraničavajuća vrednost NLR je iznosila 27.15 mg/l, sa senzitivnošću od 70.13% i specifičnošću od 70,00% (AUC=0.7621,  $p < 0.0001$ , Figura 10B), što predstavlja test umerene pouzdanosti. Između grupe NEAA i grupe pacijenata sa inflamiranim apeniksom (združeni pacijenti grupe UAA i grupe CAA), dobijena je optimalna razgraničavajuća vrednost CRP od 17.35 mg/l, sa senzitivnošću od 68.22% i specifičnošću od 47.37% (AUC=0.5440,  $p = 0.5418$ , Figura 10C), što predstavlja nepouzdan test.

### 12.3. Neutrofilni mijeloperoksidazni index (MPXI)

Na ukupnom broju pacijenata, nije zabeležena statistički značajna razlika između preoperativnih, vrednosti MPXI od prvog i trećeg postoperativnog (Figura 11A).



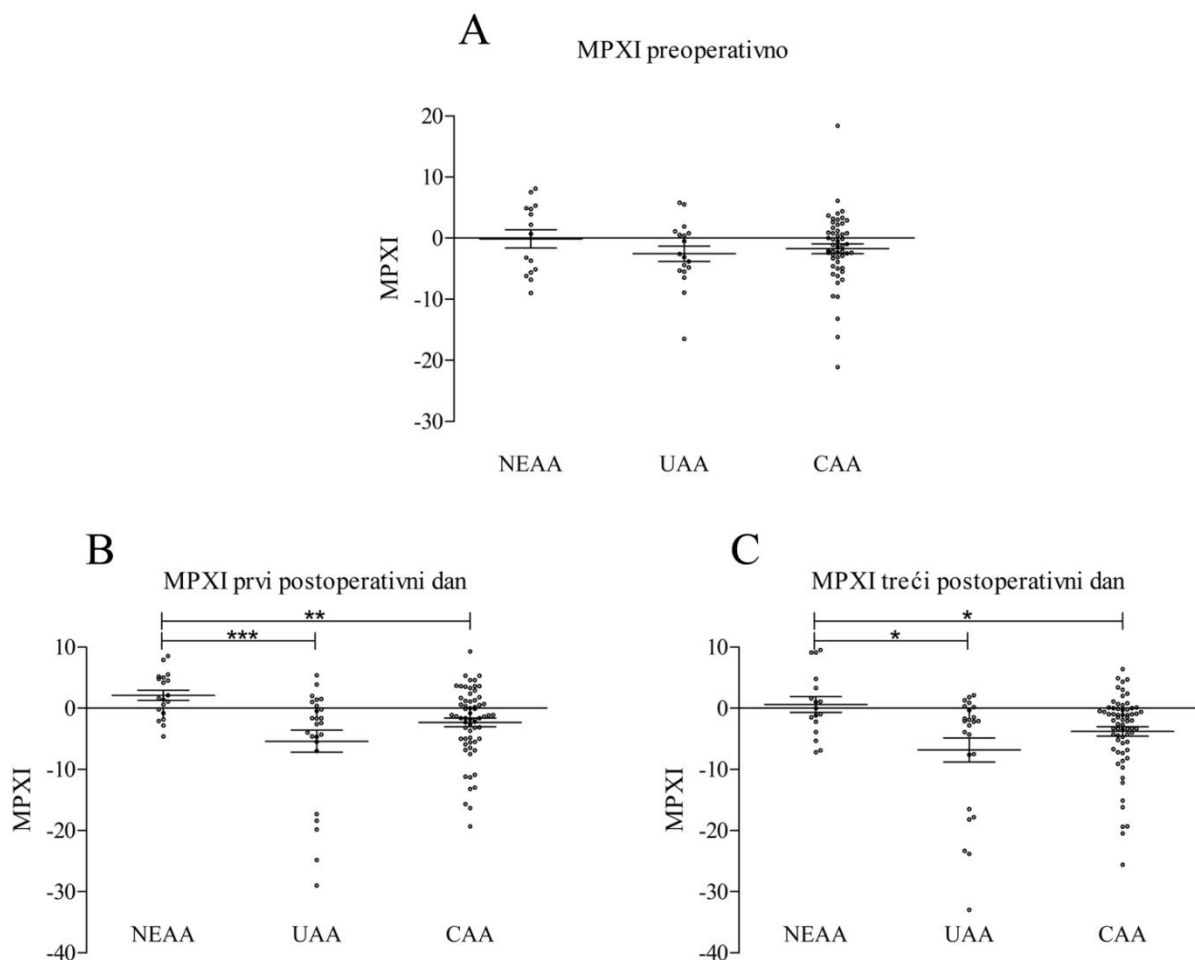
**Figura 11.** Komparacija MPXI vrednosti u tri vremena kod ukupnog broja pacijenata (A); u NEAA grupi (B); u UAA grupi (C); u CAA grupi (D). (Srednja vrednost ± standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 12.3.1. MPXI u tri vremena po patohistološkim grupama

U okviru formiranih patohistoloških grupa, vrednosti MPXI u različitim vremenskim odrednicama, takođe nisu pokazale značajne statističke razlike (Figure 11B, 11C i 11D).

### 12.3.2. Razlike MPXI između patohistoloških grupa, u tri vremena

Iako su u UAA grupi bile prisutne najniže preoperativne vrednosti MPXI, ove vrednosti nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na preostale dve patohistološke grupe. Razlika nije postojala ni između vrednosti NEAA i CAA grupe međusobno (Figura 12A).



**Figura 12.** Komparacija MPXI vrednosti između patohistoloških grupa u tri vremena: preoperativno (A); prvog postoperativnog dana (B); trećeg postoperativnog dana (C). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Prvog postoperativnog dana, najniže vrednosti MPXI bile su prisutne u ponovo u UAA grupi (Figura 12B), ali sa evidentiranom vrlo visokom statističkom značajnosti prema NEAA grupi ( $-5.38 \pm 9.12$  vs.  $2.11 \pm 3.66$ ,  $p=0.0009$ ) i bez statističke različitosti prema CAA grupi. Statistička značajnost razlikovanja je dosegnuta i u vrednostima MPXI između NEAA i CAA grupe, gde je zabeležena veća vrednost kod pacijenata iz NEAA grupe ( $2.11 \pm 3.66$  vs.  $-2.32 \pm 5.70$ ,  $p=0.0016$ ).

I trećeg postoperativnog dana, vrednosti MPXI su bile najniže u UUA grupi (Figura 12C), ponovo dostižući statistički značajnu razliku samo prema NEAA grupi ( $-6.83 \pm 9.75$  vs.  $0.61 \pm 5.25$ ,  $p=0.0138$ ). Razlika između vrednosti NEAA i CAA grupe su takođe evidentirane, sa većim vrednostima u CAA grupi ( $0.61 \pm 5.25$  vs.  $-3.78 \pm 6.26$ ,  $p=0.0228$ ).

### *12.3.3. Korelacija MPXI sa preoperativnim trajanjem simptoma (PSD)*

Preoperativne vrednosti MPXI nisu pokazale korelaciju sa PSD niti na ukupnom broju pacijenata niti u patohistološkim grupama.

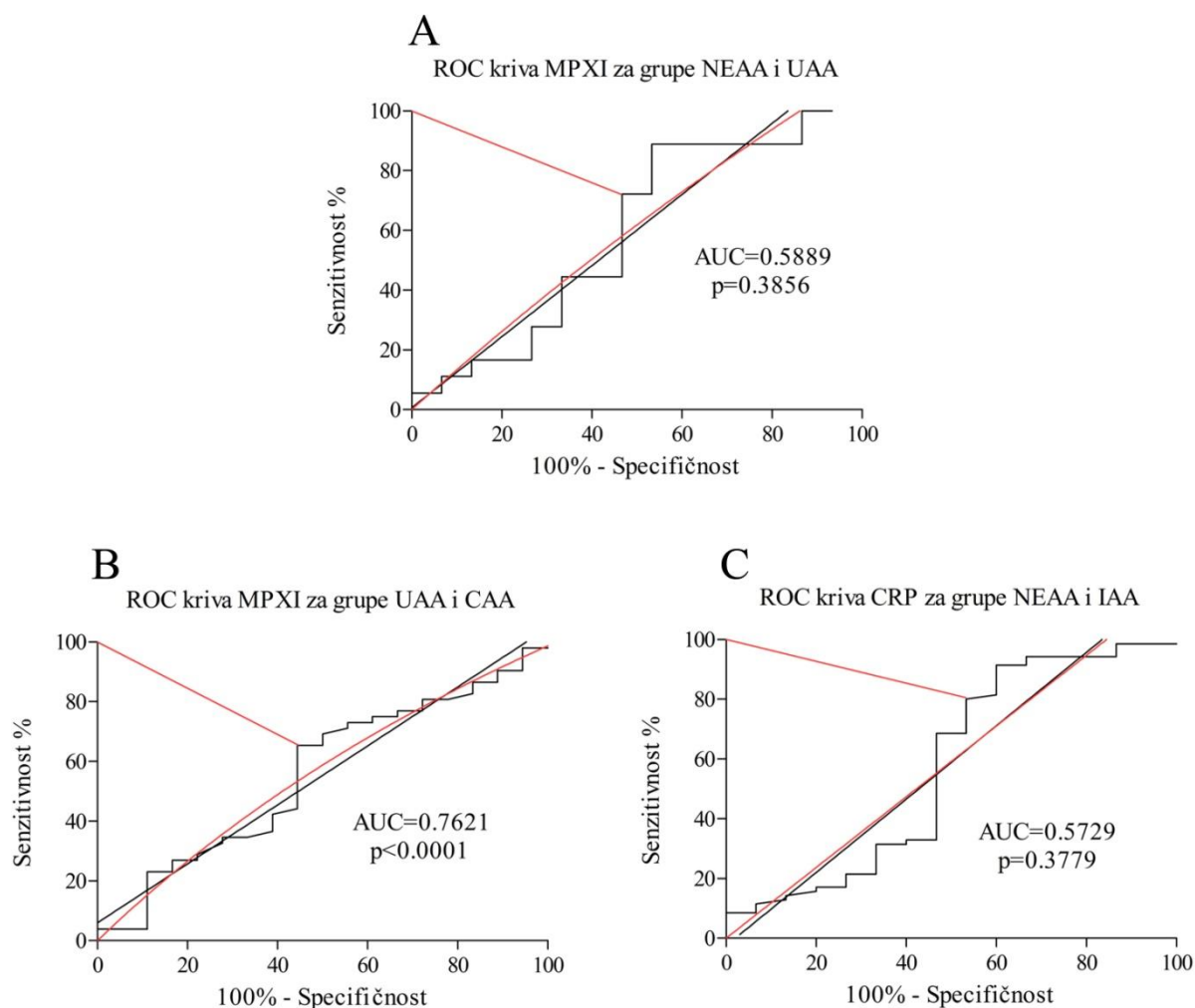
### *12.3.4. Korelacija MPXI sa Pedijatrijskim apendicitis skorom (PAS)*

Preoperativne vrednosti MPXI nisu pokazale korelaciju sa PAS niti na ukupnom broju pacijenata niti u patohistološkim grupama.

### *12.3.5. Razgraničavajuće (cut-off) vrednosti MPXI između patohistoloških grupa*

Optimalna razgraničavajuća MPXI vrednost između NEAA i UAA grupe pacijenata bila je 0.6, sa senzitivnošću od 72.22% i specifičnošću od 53.33% ( $AUC=0.5889$ ,  $p=0.3856$ , Figura 13A), što predstavlja nepouzdan test. Između grupa UAA i CAA, optimalna razgraničavajuća vrednost MPXI je iznosila  $-2.45$ , sa senzitivnošću od 63.46% i specifičnošću od 70,00% ( $AUC=0.7621$ ,  $p<0.0001$ , Figura 13B), što predstavlja test umerene pouzdanosti. Između grupe NEAA i grupe pacijenata sa inflamiranim apeniksom (združeni pacijenti grupe UAA i grupe CAA), dobijena je optimalna razgraničavajuća vrednost MPXI od 2.05, sa senzitivnošću 80.00% specifičnošću od 46.67% ( $AUC=0.5729$ ,  $p=0.3779$ , Figura 13C), što predstavlja nepouzdan test.

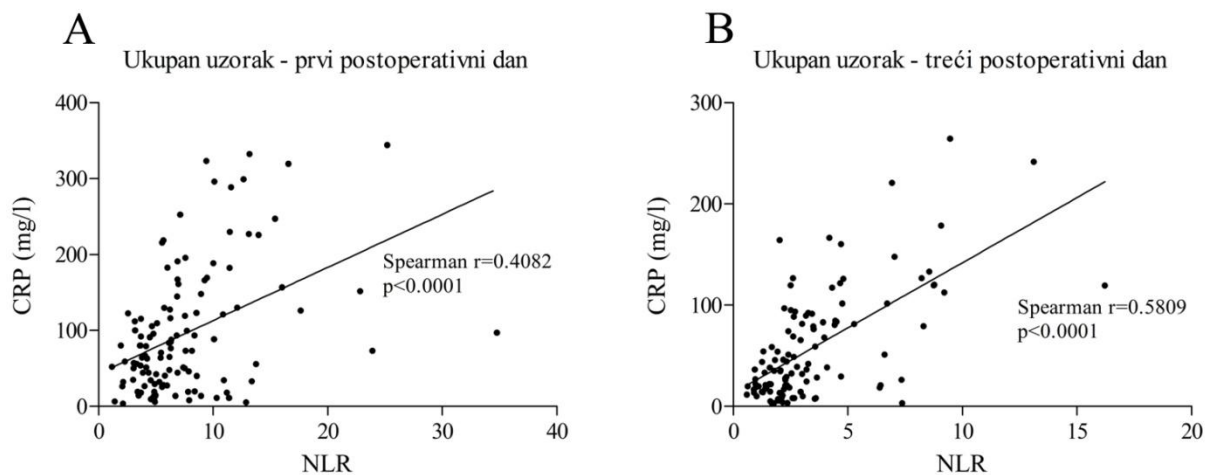




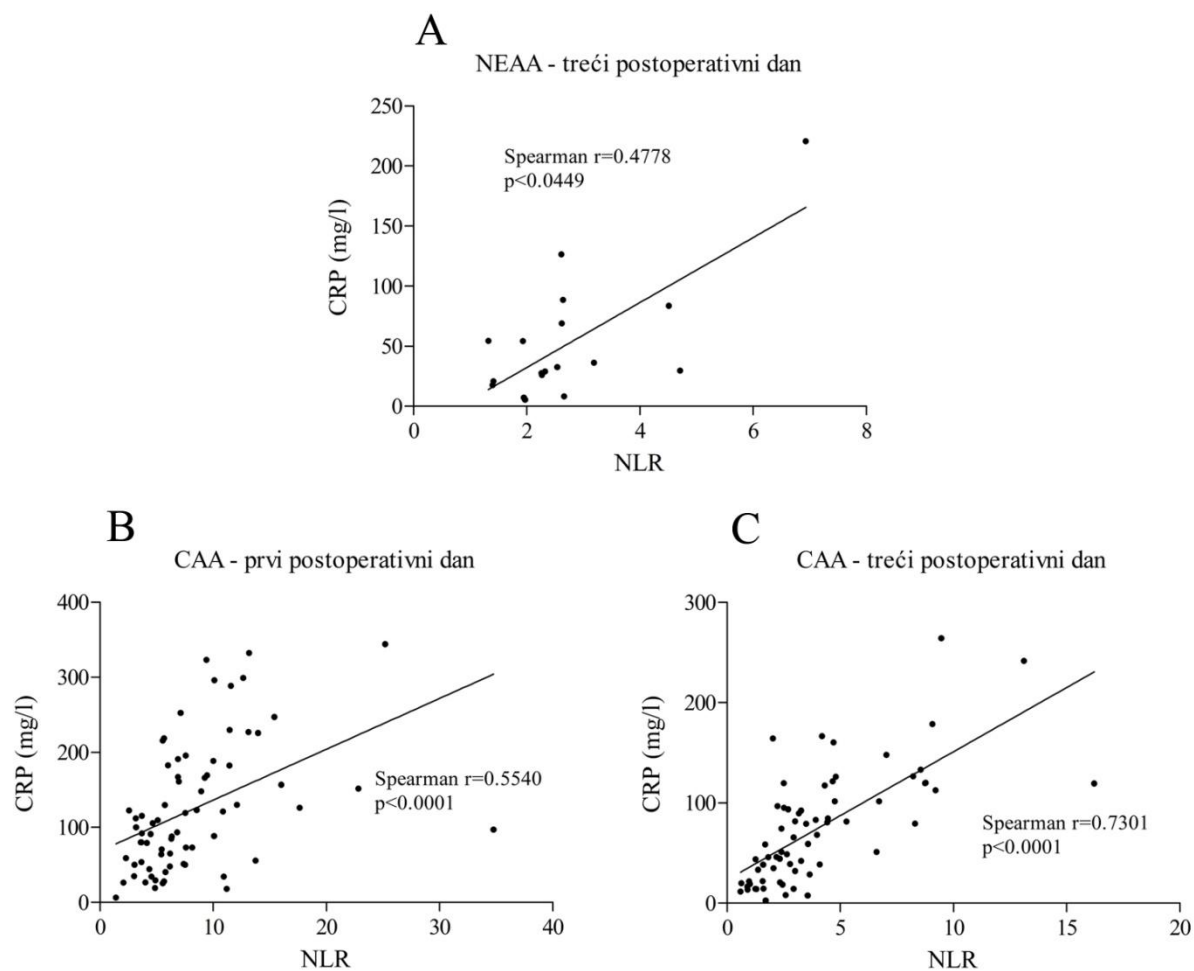
**Figura 13.** ROC (Receiver Operating Characteristic) krive formiranih patohistoloških grupa. ROC kriva za NEAA i UAA grupu (A); ROC kriva za UAA i CAA grupu (B); i ROC kriva za NEAA i IAA (UAA + CAA) grupu (C).

#### 12.4. Korelacija vrednosti neutrofilno-limfocitnog odnosa i C-reaktivnog proteina

Na ukupnom broju pacijenata, dokazana je jaka pozitivna korelacija između vrednosti NLR i CRP, prvog postoperativnog dana (Spearman  $r=0.4082$ ,  $p<0.0001$ , Figura 14A) i trećeg postoperativnog dana (Spearman  $r=0.5809$ ,  $p<0.0001$ , Figura 14B). Statistička značajnost nije doseguta u korelaciji preoperativnih vrednosti na ukupnom uzorku.



**Figura 14.** Korelacija vrednosti NLR i CRP na ukupnom broju pacijenata, prvog postoperativnog dana (A) i trećeg postoperativnog dana (B).

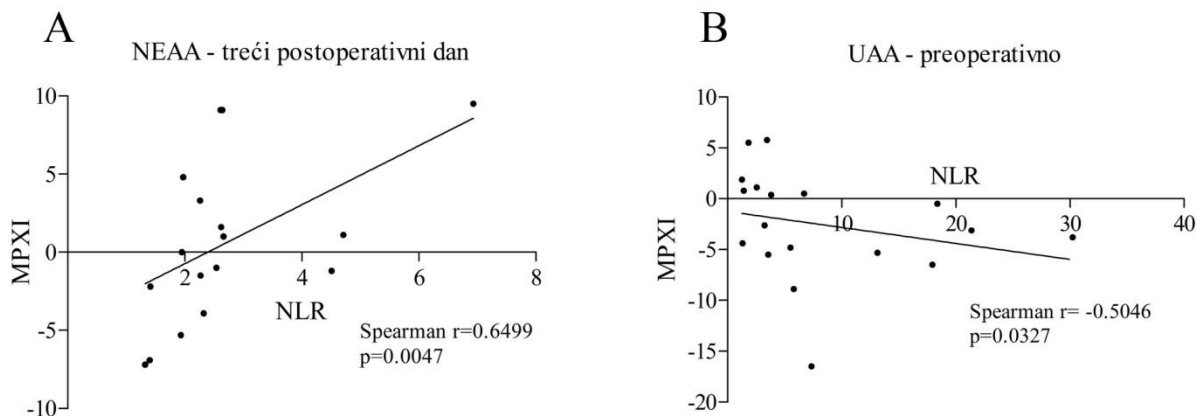


**Figura 15.** Korelacija vrednosti NLR i CRP u grupi NEAA trećeg postoperativnog dana (A); u grupi CAA drugog (B) i trećeg postoperativnog dana (C).

U okviru patohistoloških grupa, značajna korelacija između vrednosti CRP i NLR je nađena u NEAA grupi trećeg postoperativnog (Spearman  $r=0.4778$ ,  $p=0.0449$ , Figura 15A) dana i u CAA grupi drugog (Spearman  $r=0.5540$ ,  $p<0.0001$ , Figura 15B) i trećeg (Spearman  $r=0.7301$ ,  $p<0.0001$ , Figura 15C) postoperativnog dana.

### 12.5. Korelacija vrednosti neutrofilno-limfocitnog odnosa i mijeloperoksidaznog indeksa

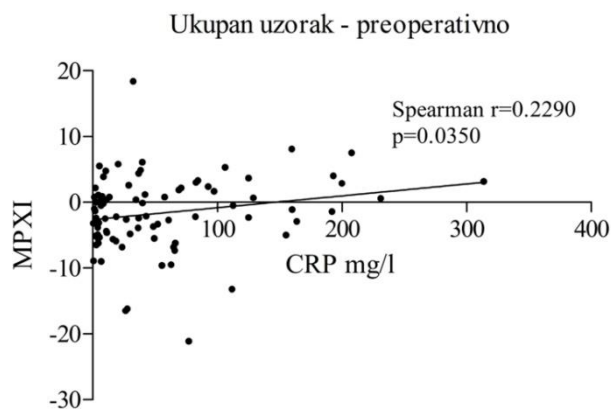
Vrednosti NLR nisu pokazale korelaciju sa vrednostima MPXI na ukupnom broju pacijenata niti u jednoj vremenskoj tački uzorkovanja krvi. Značajna pozitivna korelacija je nađena samo u NEAA grupi trećeg postoperativnog dana (Spearman  $r=0.6499$ ,  $p=0.0047$ , Figura 16A), kod je u grupi UAA preoperativno nađena značajna negativna korelacija (Spearman  $r=-0.5540$ ,  $p<0.0327$ , Figura 16B).



**Figura 16.** Korelacija vrednosti NLR i MPXI u grupi NEAA trećeg postoperativnog dana (A) i u grupi UAA preoperativno (B).

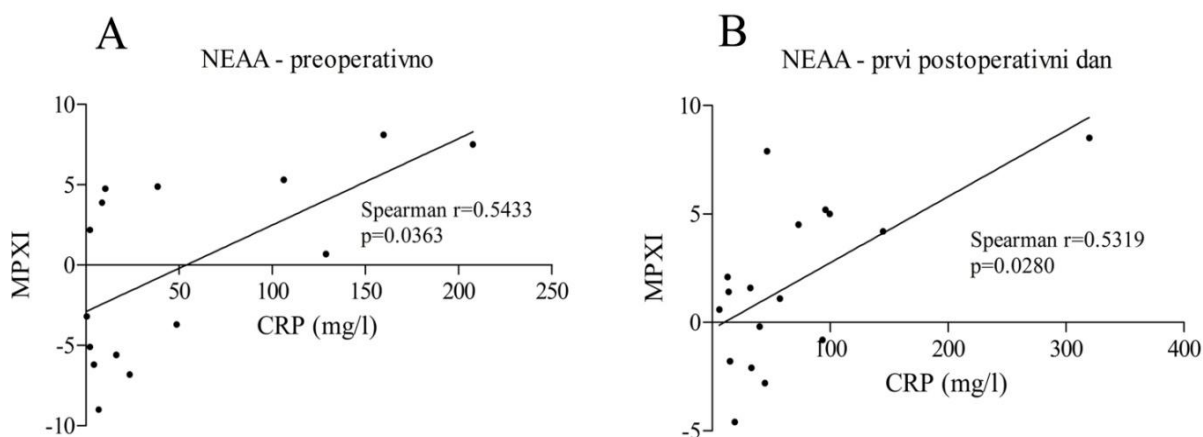
### 12.6. Korelacija vrednosti C-reaktivnog proteina i mijeloperoksidaznog indeksa

Na ukupnom broju pacijenata, potvrđena je pozitivna korelacija između vrednosti CRP i MPXI, preoperativno (Spearman  $r=0.2290$ ,  $p=0.0350$ , Figura 17), dok statistička značajnost nije dosegnuta u korelaciji postoperativnih vrednosti na ukupnom uzorku.



**Figura 17.** Korelacija vrednosti CRP i MPXI na ukupnom broju pacijenata preoperativno.

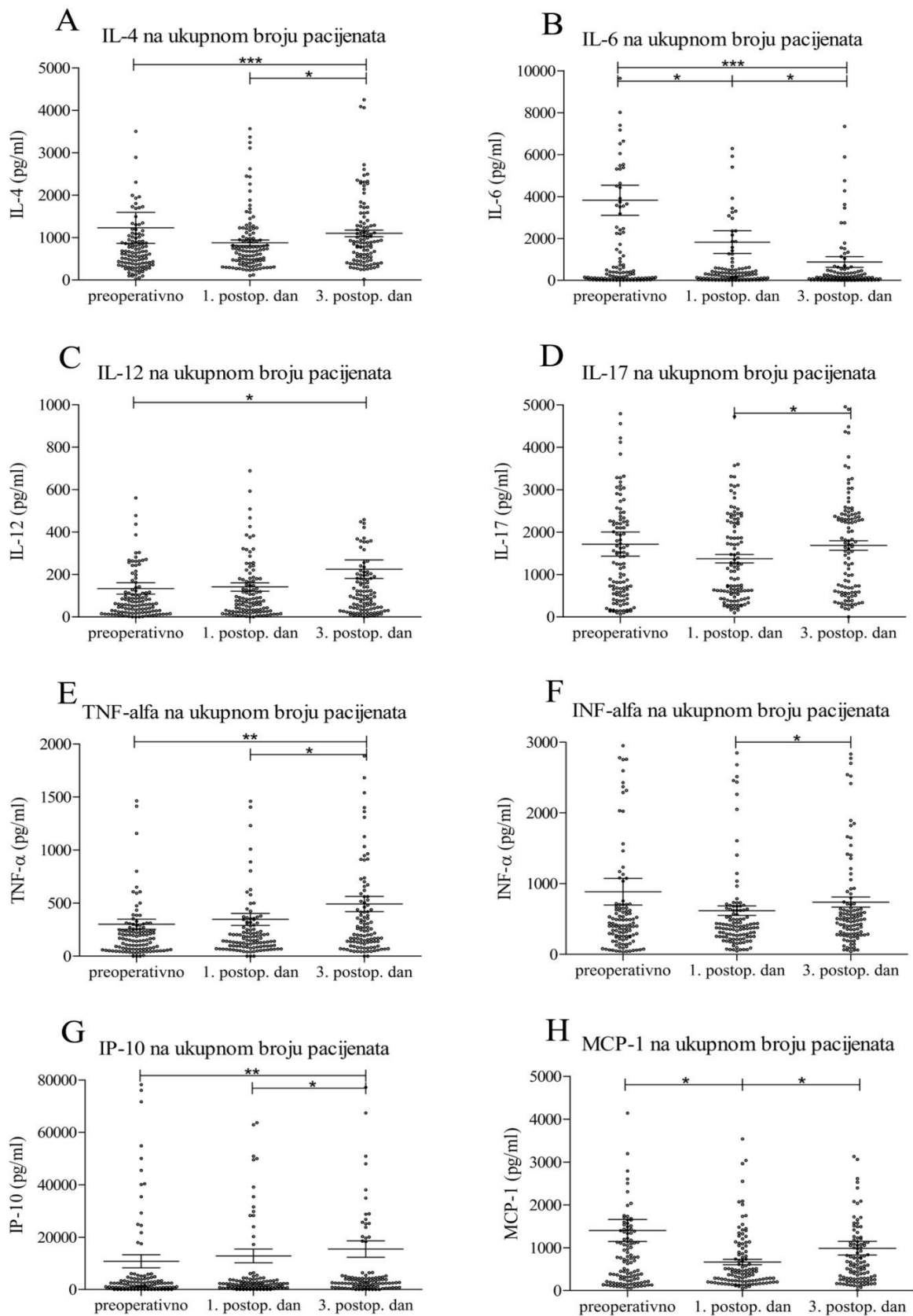
U okviru patohistoloških grupa, pozitivna korelacija između CRP i MPXI je nađena samo u NEAA grupi, preoperativno (Spearman  $r=0.5433$ ,  $p=0.0363$ , Figura 18A) i prvog postoperativnog dana (Spearman  $r=0.5319$ ,  $p=0.0280$ , Figura 18B).



**Figura 18.** Korelacija vrednosti CRP i MPXI u grupi NEAA preoperativno (A) i prvog postoperativnog dana (B).

### 13. Citokini

Testirane su vrednosti sE-selektina, G-CSF, ICAM-1, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, LAP i TNF-alpha u serumu i peritoneumskoj tečnosti, po danima, između grupa, u međusobnoj korelaciji i korelaciji sa laboratorijskim parametrima.



**Figura 19.** Komparacija vrednosti serumskih citokina u tri vremena kod ukupnog broja pacijenata: IL-4 (A); IL-6 (B); IL-12 (C); IL-17 (D); TNF-alfa (E); IFN-alfa (F); IP-10 (G); MCP-1 (H). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 13.1. Razlike serumskih citokina

Testirane su razlike vrednosti citokina u tri vremena na ukupnom broju pacijenata i unutar formiranih patohistoloških grupa. Potom su testirane razlike u citokinskim vrednostima između patohistoloških grupa, preoperativno, prvog i trećeg postoperativnog dana.

#### 13.1.1. Serumski citokini u tri vremena na ukupnom broju pacijenata

Na ukupnom broju pacijenata, kod serumskih citokina, statistički značajna razlika između preoperativnih i vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana nađena je za: IL-4, IL-6, IL-12, IL-17A, TNF-alpha, IFN-alpha, IP-10 i MCP-1 (Figura 19).

Na ukupnom uzorku, IL-4 je imao najvišu vrednost preoperativno a najnižu prvog postoperativnog dana (Figura 19A). Statistička razlika je zabeležena između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $877 \pm 696$  vs.  $1097 \pm 817$ ,  $p=0.0137$ ), kao i između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $1228 \pm 3895$  vs.  $1097 \pm 817$ ,  $p=0.0006$ ).

Vrednosti IL-6 su beležile kontinuirani postoperativni pad (Figura 19B). Statistička razlika je bila prisutna između vrednosti iz sve tri vremenske tačke, značajna između preoperativnih i vrednosti od prvog dana ( $3821 \pm 7592$  vs.  $1823 \pm 5726$ ,  $p=0.0276$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg dana ( $1823 \pm 5726$  vs.  $876 \pm 2664$ ,  $p=0.0266$ ) i vrlo visoko značajna između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $3821 \pm 7592$  vs.  $876 \pm 2664$ ,  $p=0.0006$ ).

Vrednosti IL-12 su beležile kontinuirani postoperativni rast (Figura 19C), sa statistički zabeleženom razlikom između preoperativnih i vrednosti od trećeg dana ( $134 \pm 285$  vs.  $224 \pm 457$ ,  $p=0.0185$ ).

IL-17 je imao najnižu vrednost prvog postoperativnog dana, dok su preoperativne i vrednosti od trećeg postoperativnog dana bile ujednačene (Figura 19D). Statistički značajna razlika je dosegnuta između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $1373 \pm 1065$  vs.  $1685 \pm 1153$ ,  $p=0.0448$ ).

Vrednosti TNF-alfa su zabeležile kontinuirani postoperativni rast (Figura 19E), sa dosegnutim statističkim razlikama između prvog i trećeg ( $347 \pm 598$  vs.  $492 \pm 751$ ,  $p=0.0168$ ) i

između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $301\pm 506$  vs.  $492\pm 751$ ,  $p=0.0022$ ).

INF-alfa je beležio najviše vrednosti preoperativno a najniže prvog dana (Figura 19F), sa evidentiranom statističkom značajnosti u razlikovanju vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $618\pm 715$  vs.  $739\pm 747$ ,  $p=0.0486$ ).

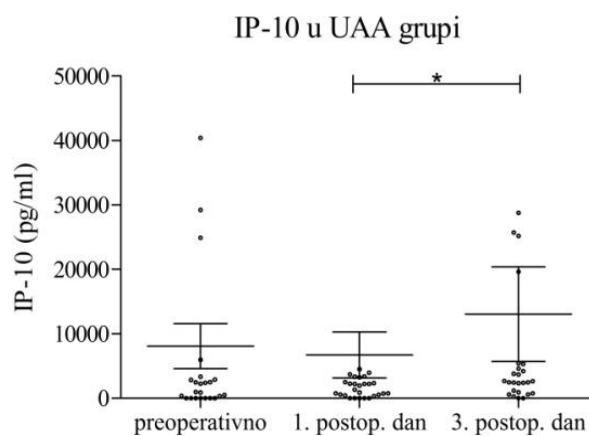
Vrednosti IP-10 su postoperativno kontinuirano rasle (Figura 19G), sa zabeleženim razlikama između prvog i trećeg dana ( $12809\pm 27691$  vs.  $15424\pm 32721$ ,  $p=0.0400$ ) i preoperativnih i vrednosti od trećeg dana ( $10778\pm 26590$  vs.  $15424\pm 32721$ ,  $p=0.0080$ ).

MCP-1 vrednosti su bile najviše preoperativno i najniže prvog dana (Figura 19H). Statistička razlika je postojala između preoperativnih i vrednosti od prvog dana ( $1401\pm 2733$  vs.  $664\pm 688$ ,  $p=0.0475$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $664\pm 688$  vs.  $986\pm 1672$ ,  $p=0.0378$ ).

### 13.1.2. Serumski citokini u tri vremena po patohistološkim grupama

U NEAA grupi, nije pronađena statistički značajna razlika između preoperativnih i vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ni kod jednog od 20 testiranih serumskih citokina.

U UAA grupi, statistički značajna razlika je bila prisutna samo u slučaju IP-10 (Figura 20) i to u vrednostima između prvog i trećeg dana ( $6735\pm 19309$  vs.  $13065\pm 37348$ ,  $p=0.0422$ ).



**Figura 20.** Komparacija vrednosti serumskih citokina u tri vremena u UAA grupi. (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

U CAA grupi, statistički značajna razlika između preoperativnih i vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana nađena je za: IL-4, IL-6, IL-12p70, TNF-alfa, IFN-alfa, IP-10, MCP-1 i MIP-1beta (Figura 21).

IL-4 je imao najvišu vrednost trećeg postoperativnog dana a najnižu prvog postoperativnog dana (Figura 21A). Statistička razlika je zabeležena između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $885 \pm 695$  vs.  $1158 \pm 854$ ,  $p=0.0131$ ), kao i između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $980 \pm 1976$  vs.  $1158 \pm 854$ ,  $p=0.0010$ ).

Vrednosti IL-6 su beležile kontinuirani postoperativni pad (Figura 21B). Statistička razlika je bila prisutna između vrednosti iz sve tri vremenske tačke, značajna između preoperativnih i vrednosti od prvog dana ( $3782 \pm 7261$  vs.  $1551 \pm 5452$ ,  $p=0.0401$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg dana ( $1551 \pm 5452$  vs.  $610 \pm 1379$ ,  $p=0.0415$ ) i vrlo visoko značajna između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $3782 \pm 7261$  vs.  $610 \pm 1379$ ,  $p=0.0004$ ).

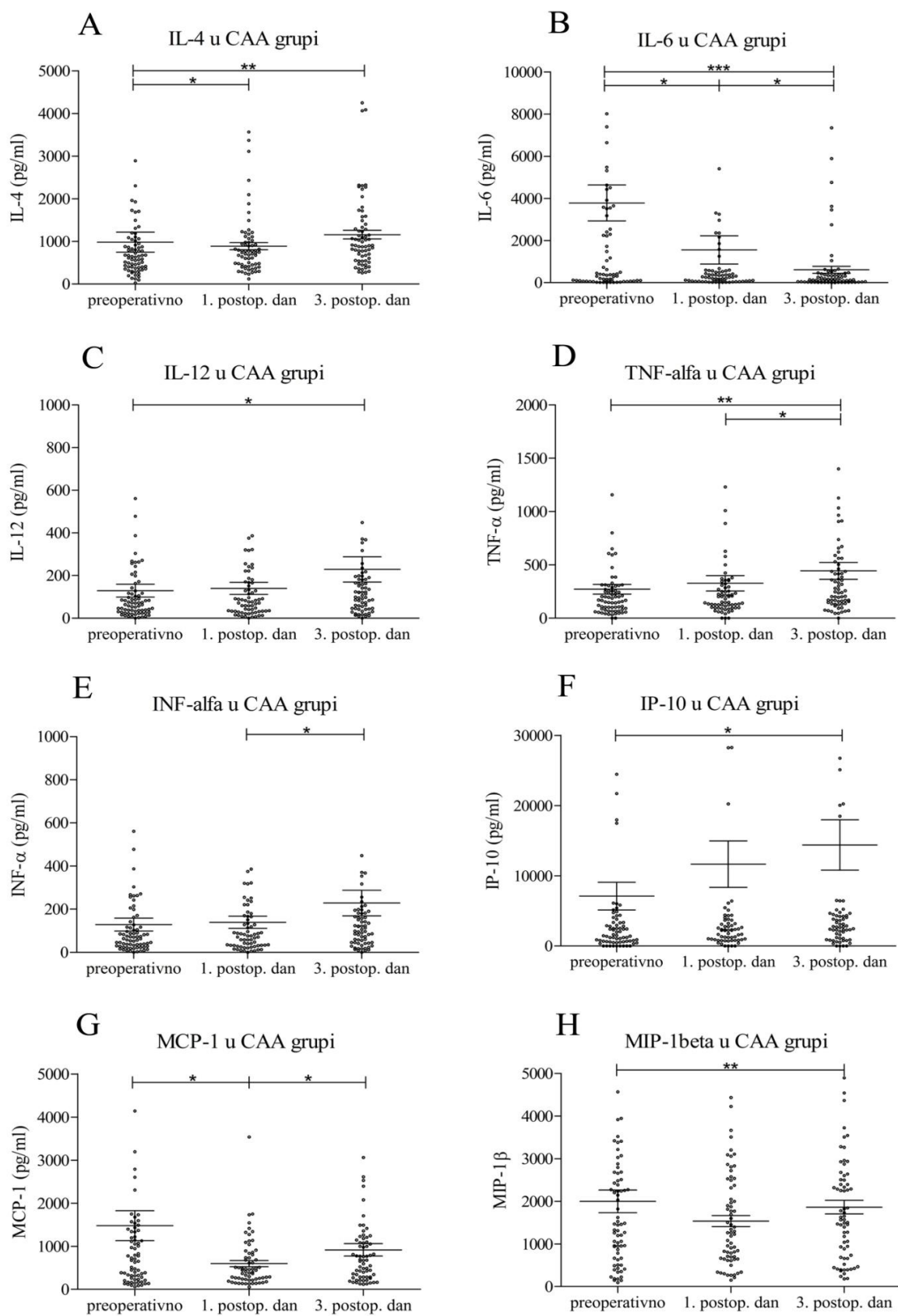
Vrednosti IL-12 su beležile postoperativni rast (Figura 21C), sa statistički zabeleženom razlikom između preoperativnih i vrednosti od trećeg dana ( $128 \pm 254$  vs.  $228 \pm 487$ ,  $p=0.0297$ ).

Vrednosti TNF-alfa su zabeležile kontinuirani postoperativni rast (Figura 21D), sa dosegnutim statističkim razlikama između prvog i trećeg ( $327 \pm 586$  vs.  $443 \pm 653$ ,  $p=0.0179$ ) i između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $272 \pm 391$  vs.  $443 \pm 653$ ,  $p=0.0047$ ).

INF-alfa je beležio postoperativni rast (Figura 21E), sa evidentiranom statističkom značajnosti u razlikovanju vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $589 \pm 614$  vs.  $771 \pm 726$ ,  $p=0.0375$ ).

Vrednosti IP-10 su postoperativno kontinuirano rasle (Figura 21F), sa zabeleženim razlikama između preoperativnih i vrednosti od trećeg dana ( $7117 \pm 16751$  vs.  $14391 \pm 29408$ ,  $p=0.0121$ ).





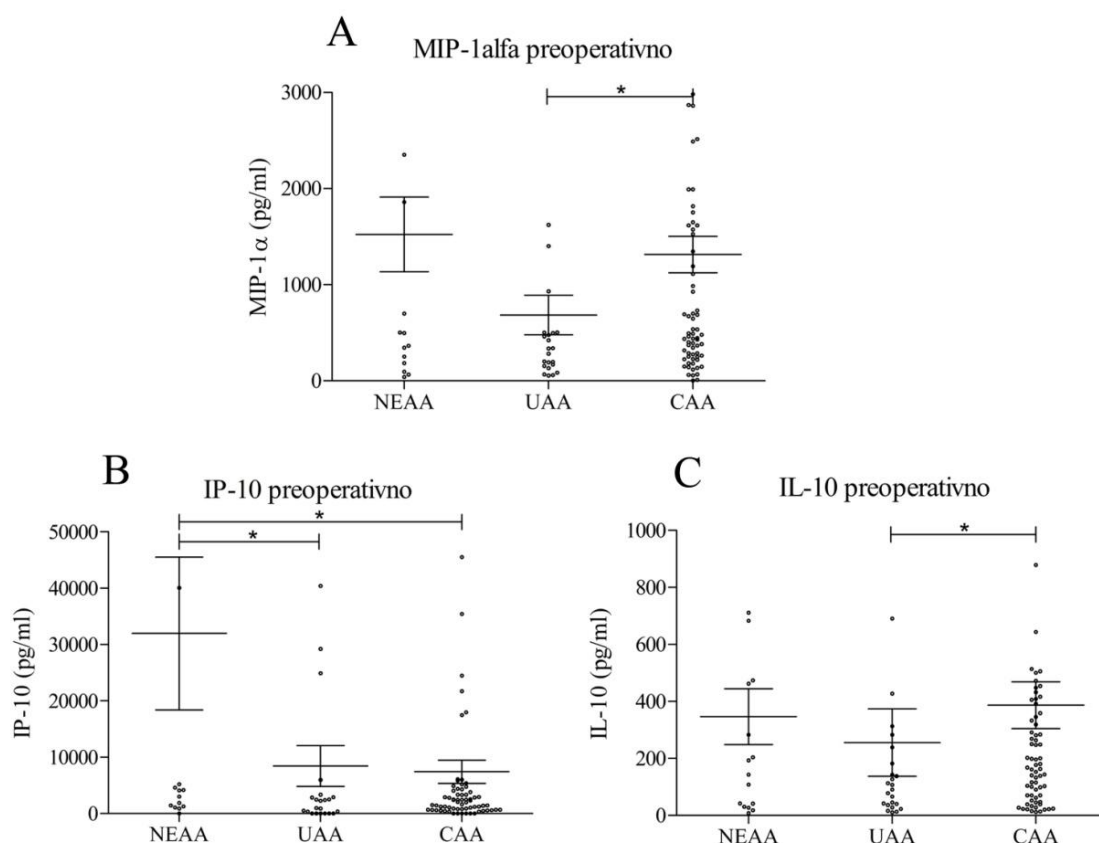
**Figura 21.** Komparacija vrednosti serumskih citokina u tri vremena u CAA grupi: IL-4 (A); IL-6 (B); IL-12 (C); TNF-alfa (D); INF-alfa (E); IP-10 (F); MCP-1 (G); MIP-1b (H). (Srednja vrednost $\pm$ standardna greška, Mann-Withney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

MCP-1 vrednosti su bile najviše preoperativno i najniže prvog dana (Figura 21G). Statistička razlika je postojala između preoperativnih i vrednosti od prvog dana ( $1477 \pm 2944$  vs.  $598 \pm 564$ ,  $p=0.0322$ ), kao i između vrednosti od prvog i trećeg postoperativnog dana ( $598 \pm 564$  vs.  $915 \pm 1176$ ,  $p=0.0462$ ).

MIP-1beta je imao najnižu vrednost prvog postoperativnog dana, dok su preoperativne i vrednosti od trećeg postoperativnog dana bile ujednačene (Figura 21H). Statistički značajna razlika je dosegnuta između preoperativnih i vrednosti od trećeg postoperativnog dana ( $1999 \pm 2266$  vs.  $1862 \pm 1323$ ,  $p=0.0081$ ).

### 13.1.3. Razlike preoperativnih vrednosti serumskih citokina između patohistoloških grupa

Statistički značajna razlika kod preoperativnih vrednosti serumskih citokina između patohistoloških grupa zabeležena je za: MIP-1alfa, IP-10 i IL-10 (Figura 22).



**Figura 22.** Komparacija preoperativnih vrednosti serumskih citokina između patohistoloških grupa MIP-1alfa (A); IP-10 (B); IL-10 (C). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

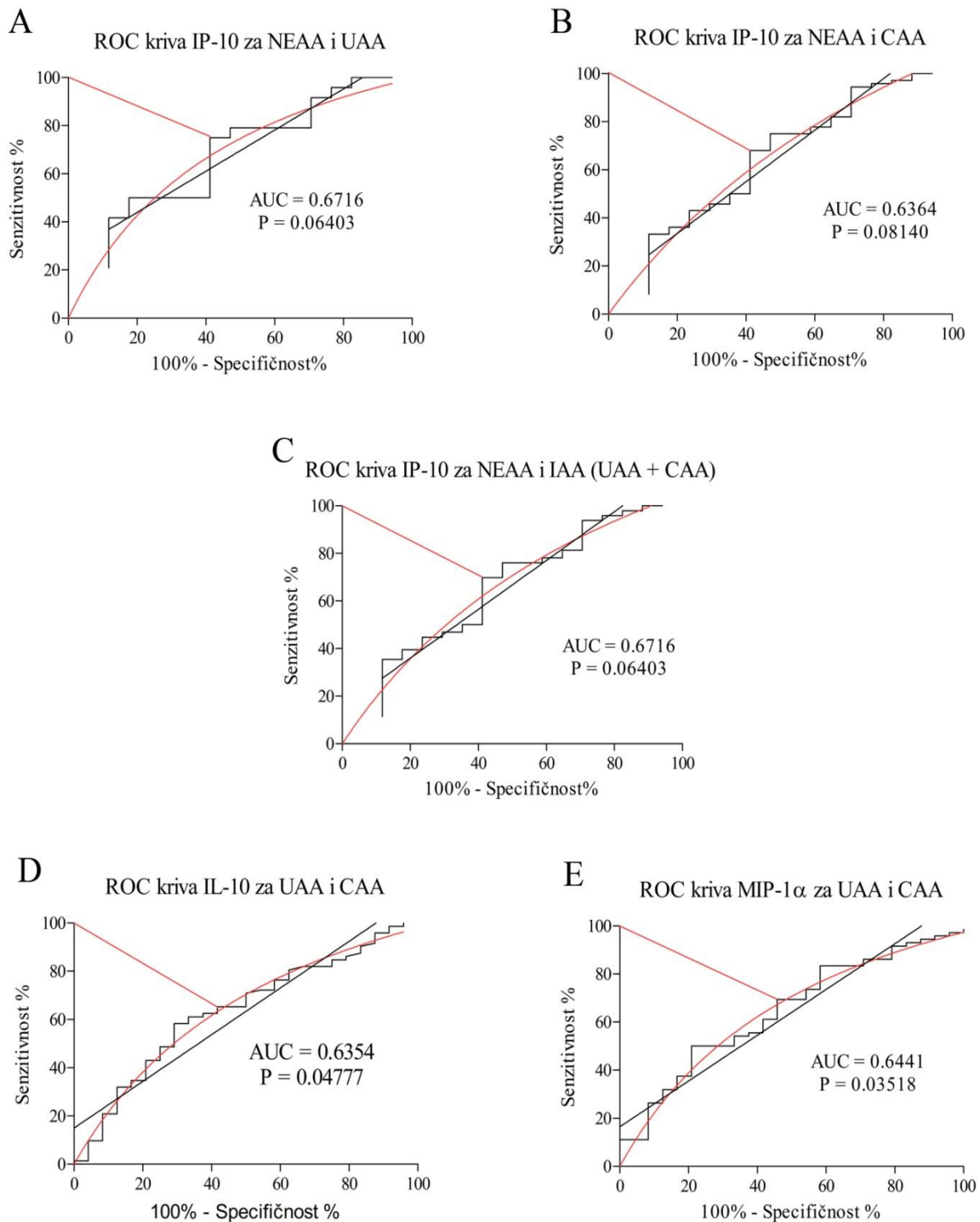
MIP-1alfa je bio najviši u NEAA grupi a najniži u UAA grupi (Figura 22A), diferencirajući sa statističkom značajnosti UAA od CAA grupe pacijenata ( $684 \pm 1004$  vs.  $1113 \pm 618$ ,  $p=0.0482$ ).

Vrednosti IP-10 bile su najviše u grupi NEAA a najniže u grupi CAA (Figura 22B), dosežući statistički značajnu razliku između NEAA i UAA ( $31962 \pm 54209$  vs.  $8437 \pm 17431$ ,  $p=0.0410$ ), kao i između NEAA i CAA ( $31962 \pm 54209$  vs.  $7427 \pm 17049$ ,  $p=0.0466$ ).

IL-10 je imao najniže preoperativne vrednosti u UAA grupi (Figura 22C), statistički značajno manje nego u CAA grupi ( $255 \pm 580$  vs.  $386 \pm 695$ ,  $p=0.0482$ ), dok prema NEAA grupi, kao i između NEAA i CAA, statistička značajnost nije dosegnuta.

#### *13.1.4. Razgraničavajuće vrednost IP-10, IL-10 i MIP-1alfa između patohistoloških grupa*

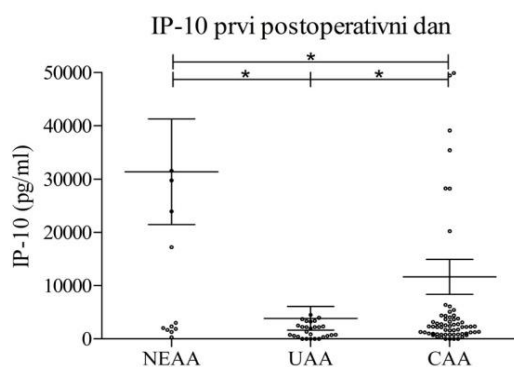
Optimalna razgraničavajuća vrednost IP-10 između NEAA i UAA grupe pacijenata bila je  $2956$  pg/ml, sa senzitivnošću od  $75.00\%$  i specifičnošću od  $58.82\%$  ( $AUC=0.6716$ ,  $p=0.0640$ , Figura 23A). Između grupa NEAA i CAA, optimalna razgraničavajuća vrednost IP-10 je iznosila  $2994$  pg/ml, sa senzitivnošću od  $68.06\%$  i specifičnošću od  $58.82\%$  ( $AUC=0.6364$ ,  $p=0.0814$ , Figura 23B). Između grupe NEAA i grupe pacijenata sa inflamiranim apeniksom (združeni pacijenti grupe UAA i grupe CAA), dobijena je optimalna razgraničavajuća vrednost IP-10 od  $2994$ , sa senzitivnošću od  $69.79\%$  i specifičnošću od  $58.82\%$  ( $AUC=0.6452$ ,  $p=0.0570$ , Figura 23C). Optimalna razgraničavajuća vrednost IL-10 između UAA i CAA grupe pacijenata bila je  $114$  pg/ml, sa senzitivnošću od  $65.28\%$  i specifičnošću od  $58.33\%$  ( $AUC=0.6354$ ,  $p=0.0477$ , Figura 23D). Optimalna razgraničavajuća vrednost MIP-1 $\alpha$  između UAA i CAA grupe pacijenata bila je  $354,5$  pg/ml, sa senzitivnošću od  $68.06\%$  i specifičnošću od  $54.17\%$  ( $AUC=0.6441$ ,  $p=0.0352$ , Figura 23E). Svih pet testiranja razgraničavajućih vrednosti preoperativnih vrednosti serumskih citokina su kategorisani kao testovi slabe pouzdanosti.



**Figura 23.** ROC (Receiver Operating Characteristic) krive formiranih patohistoloških grupa. ROC kriva IP-10 za NEAA i UAA grupu (A); ROC kriva IP-10 za NEAA i CAA grupu (B); i ROC kriva IP-10 za NEAA i IAA (UAA + CAA) grupu (C); ROC kriva IL-10 za UAA i CAA grupu (D); ROC kriva MIP-1 $\alpha$  za UAA i CAA grupu (E).

### 13.1.5. Razlike serumskih citokina između patohistoloških grupa prvog postoperativnog dana

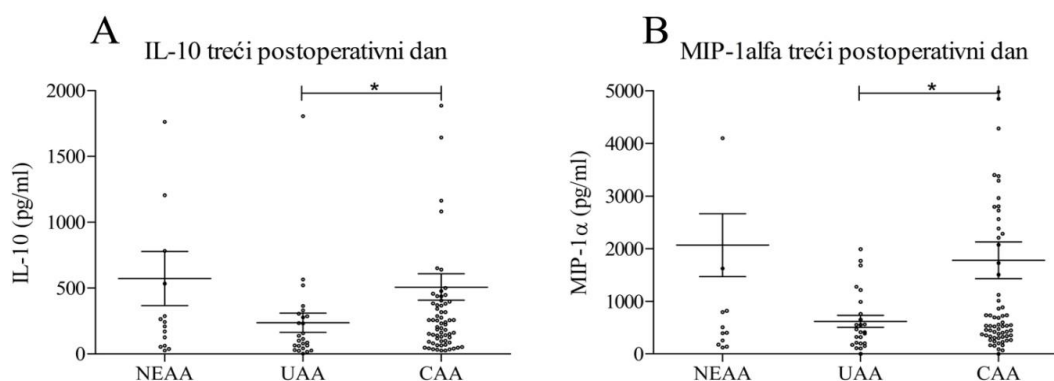
Prvog postoperativnog dana, razlike u vrednostima citokina između patohistoloških grupa su bile prisutne samo kod IP-10, sa najvišom vrednošću IP-10 u NEAA grupi i najnižom u UAA grupi (Figura 24), diferencirajući sa statističkom značajnošću sve tri patohistološke grupe međusobno. Vrednosti u NEAA grupi su bile značajno veće od onih u UAA grupi ( $31404 \pm 38365$  vs.  $3868 \pm 11810$ ,  $p=0.0049$ ), kao i od onih u CAA grupi ( $31404 \pm 38365$  vs.  $11658 \pm 27013$ ,  $p=0.0281$ ). Značajna razlika u vrednostima IP-10 bila je prisutna i između UAA i CAA grupe ( $3868 \pm 11810$  vs.  $11658 \pm 27013$ ,  $p=0.0364$ ).



**Figura 24.** Komparacija vrednosti IP-10 između patohistoloških grupa. (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 13.1.6. Razlike serumskih citokina između patohistoloških grupa trećeg postoperativnog dana

Trećeg postoperativnog dana, značajne razlike u vrednostima citokina između patohistoloških grupa su bile prisutne za IL-10 i MIP-1alfa (Figura 25).



**Figura 25.** Komparacija vrednosti serumskih citokina između patohistoloških grupa trećeg postoperativnog dana: IL-10 (A); MIP-1alfa (B). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

IL-10 je imao najviše vrednosti u NEAA grupi a najniže vrednosti u UAA (Figura 25A). Vrednosti u UAA grupi su bile značajno niže od vrednosti iz CAA grupe ( $236 \pm 362$  vs.  $508 \pm 834$ ,  $p=0.0430$ ) ( $619 \pm 557$  vs.  $1779 \pm 2869$ ,  $p=0.0352$ ), ali ne i od vrednosti iz NEAA grupe. NEAA i CAA grupa takođe nisu pokazale statističku razliku između ovih vrednosti.

Vrednosti MIP-1alfa su se trećeg postoperativnog dana ponašale na isti način kao i vrednosti IL-10 (Figura 25B). Značajna statistička razlika je dosegnuta samo između vrednosti iz grupa UAA i CAA ( $619 \pm 557$  vs.  $1779 \pm 2869$ ,  $p=0.0352$ ).

### 13.2. Razlike peritoneumskih citokina

Razlike vrednosti citokina iz uzoraka peritoneumskih tečnosti, uzetih neposredno nakon laparotomije, testirane su između patohistoloških grupa.

#### 13.2.1. Razlike peritoneumskih citokina između patohistoloških grupa

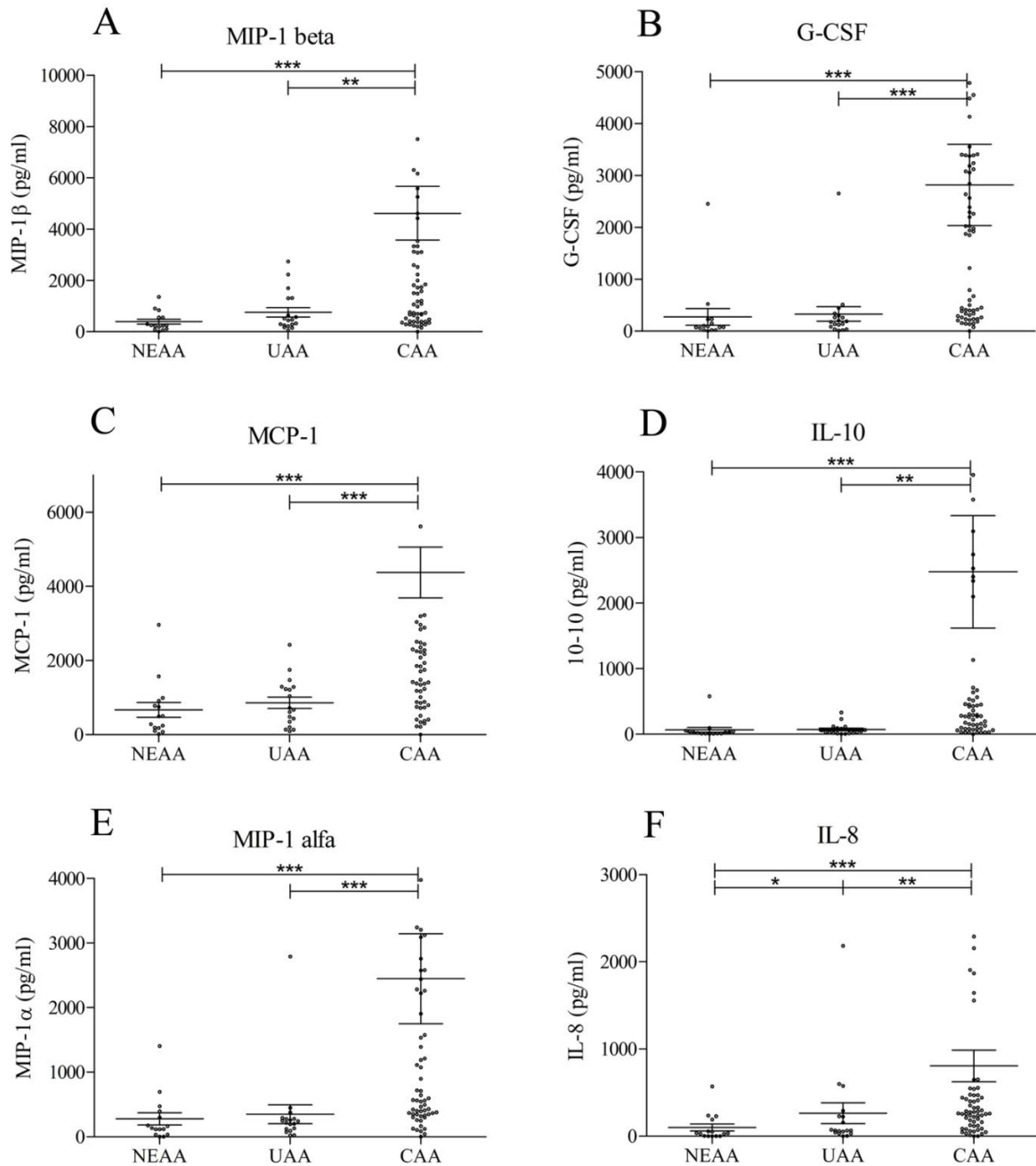
Statistički značajna razlika za vrednosti peritoneumskih citokina između patohistoloških grupa, zabeležena je kod svih testiranih citokina osim kod IP-10. Razlika je postojala kod: MIP-1beta, G-CSF, MCP-1, IL-10, MIP-1alpha, IL-8, ICAM-1, IL-6, IL-4, IL-17A, IL-1beta, TNF-alpha, sE-selektina, IL-12p70, LAP, IFN-gamma, IL-1alpha, IFN-alpha i IL-13 (Figure 26, 27 i 28).

MIP-1beta je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 26A). Značajna razlika je postojala između NEAA i CAA ( $758 \pm 776$  vs.  $4616 \pm 8310$ ,  $p < 0.0001$ ) i između UAA i CAA ( $393 \pm 379$  vs.  $4616 \pm 8310$ ,  $p=0.0019$ ).

Vrednosti G-CSF su, takođe bile najviše u CAA grupi i najmanje u NEAA grupi (Figura 26B). Razlika visoke značajnosti je takođe zabeležena između NEAA i CAA ( $274 \pm 617$  vs.  $2815 \pm 6229$ ,  $p < 0.0001$ ) i između UAA i CAA ( $328 \pm 597$  vs.  $2815 \pm 6229$ ,  $p < 0.0001$ ).

MCP-1 vrednosti su, ponovo, imale isti prikaz kao i u slučaju prathodna dva citokina (Figura 26C). Razlike su postojale između NEAA i CAA ( $668 \pm 766$  vs.  $4375 \pm 5459$ ,  $p < 0.0001$ ) i između UAA i CAA ( $861 \pm 643$  vs.  $4375 \pm 5459$ ,  $p=0.0002$ ).

IL-10 je takođe bio najviši u CAA grupi i najniži u NEAA grupi (Figura 26D), sa razlikom u vrednostima značajnom između NEAA i CAA ( $64 \pm 143$  vs.  $2477 \pm 6817$ ,  $p < 0.0001$ ) i između UAA i CAA ( $72 \pm 86$  vs.  $2477 \pm 6817$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Figura 26.** Komparacija vrednosti peritoneumskih citokina između formiranih patohistoloških grupa: MIP-1b (A); G-CSF (B); MCP-1 (C); IL-10 (D); MIP-1b (E); IL-8 (F). (Srednja vrednost  $\pm$  standardna greška, Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Vrednosti MIP-1alpha su imale isti profil (Figura 26E), ponovo sa razlikom u vrednostima značajnom između NEAA i CAA ( $277\pm 367$  vs.  $2448\pm 5532$ ,  $p<0.0001$ ) i između UAA i CAA ( $349\pm 619$  vs.  $2448\pm 5532$ ,  $p<0.0001$ ).

IL-8 je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 26F). Značajna statistička razlika je postojala između sve tri grupe, i to: između NEAA i UAA ( $97\pm 154$  vs.  $263\pm 511$ ,  $p=0.0487$ ), između UAA i CAA ( $263\pm 511$  vs.  $805\pm 1436$ ,  $p=0.0057$ ) i između NEAA i CAA ( $97\pm 154$  vs.  $805\pm 1436$ ,  $p<0.0001$ ).

Vrednosti ICAM-1 imale najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 27A). Značajna razlika je bila prisutna između NEAA i CAA ( $8288\pm 6532$  vs.  $20017\pm 31171$ ,  $p=0.0013$ ) i između UAA i CAA ( $13762\pm 15820$  vs.  $20017\pm 31171$ ,  $p=0.0218$ ).

IL-6 je bio najviši u CAA i najniži u NEAA grupi (Figura 27B), sa razlikom u vrednostima značajnom između NEAA i UAA ( $1096\pm 1869$  vs.  $2549\pm 2334$ ,  $p=0.0249$ ) i između NEAA i CAA ( $72\pm 86$  vs.  $5010\pm 9892$ ,  $p=0.0013$ ).

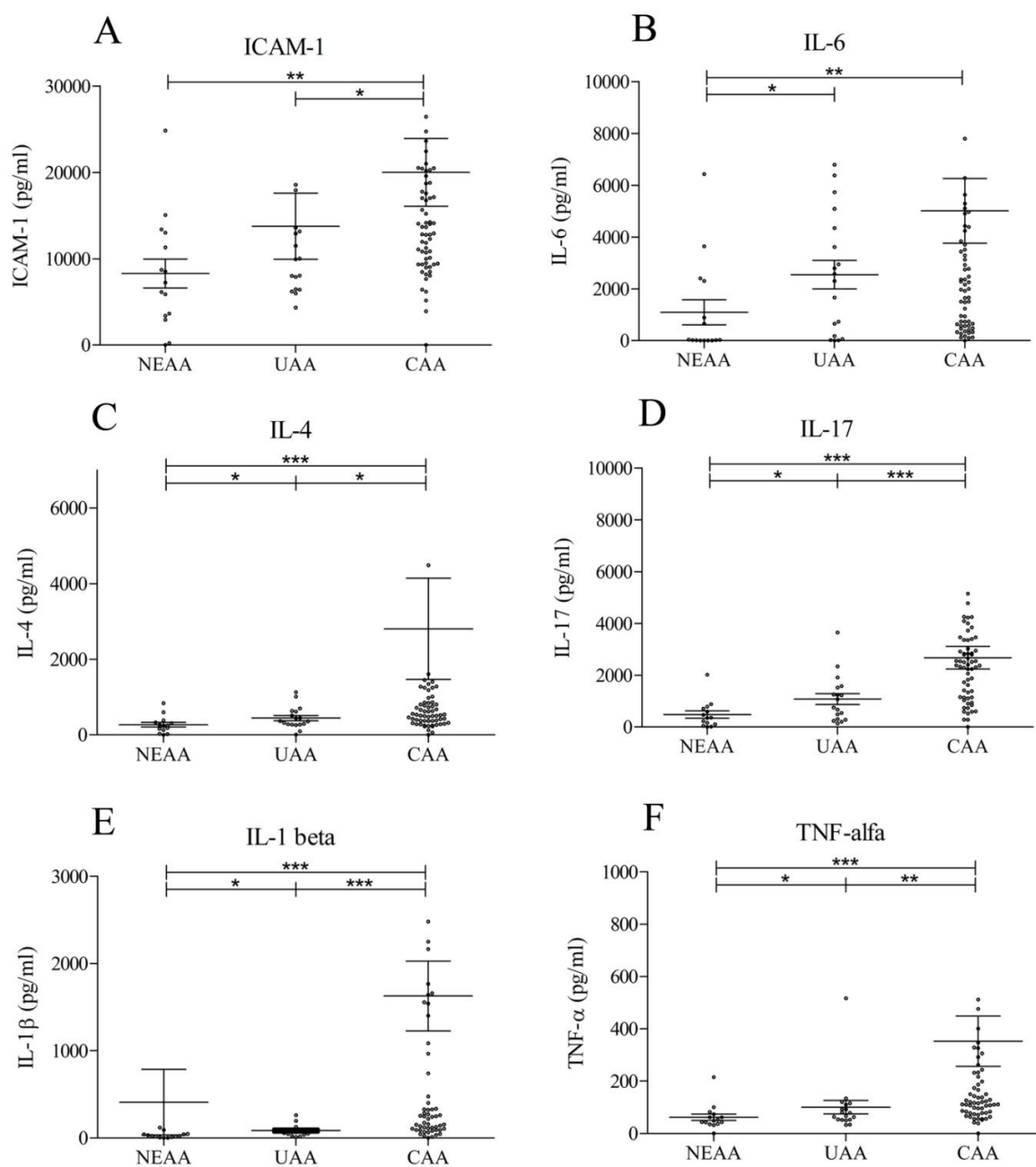
IL-4 je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 27C). Značajna statistička razlika je postojala između sve tri grupe, i to: između NEAA i UAA ( $266\pm 229$  vs.  $445\pm 287$ ,  $p=0.0319$ ), između UAA i CAA ( $445\pm 287$  vs.  $2805\pm 10628$ ,  $p=0.0387$ ) i između NEAA i CAA ( $266\pm 229$  vs.  $2805\pm 10628$ ,  $p=0.0002$ ).

IL-17 je takođe imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 27D). Značajna statistička razlika je postojala između NEAA i UAA ( $481\pm 532$  vs.  $1077\pm 903$ ,  $p=0.0263$ ), između UAA i CAA ( $1077\pm 903$  vs.  $8967\pm 50079$ ,  $p=0.0002$ ) i između NEAA i CAA ( $481\pm 532$  vs.  $8967\pm 50079$ ,  $p<0.0001$ ).

IL-1 beta je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u UAA grupi (Figura 27E). Značajna statistička razlika je postojala između NEAA i UAA ( $409\pm 1457$  vs.  $83\pm 62$ ,  $p=0.0179$ ), između UAA i CAA ( $83\pm 62$  vs.  $1628\pm 3183$ ,  $p<0.0001$ ) i između NEAA i CAA ( $409\pm 1457$  vs.  $1628\pm 3183$ ,  $p<0.0001$ ).

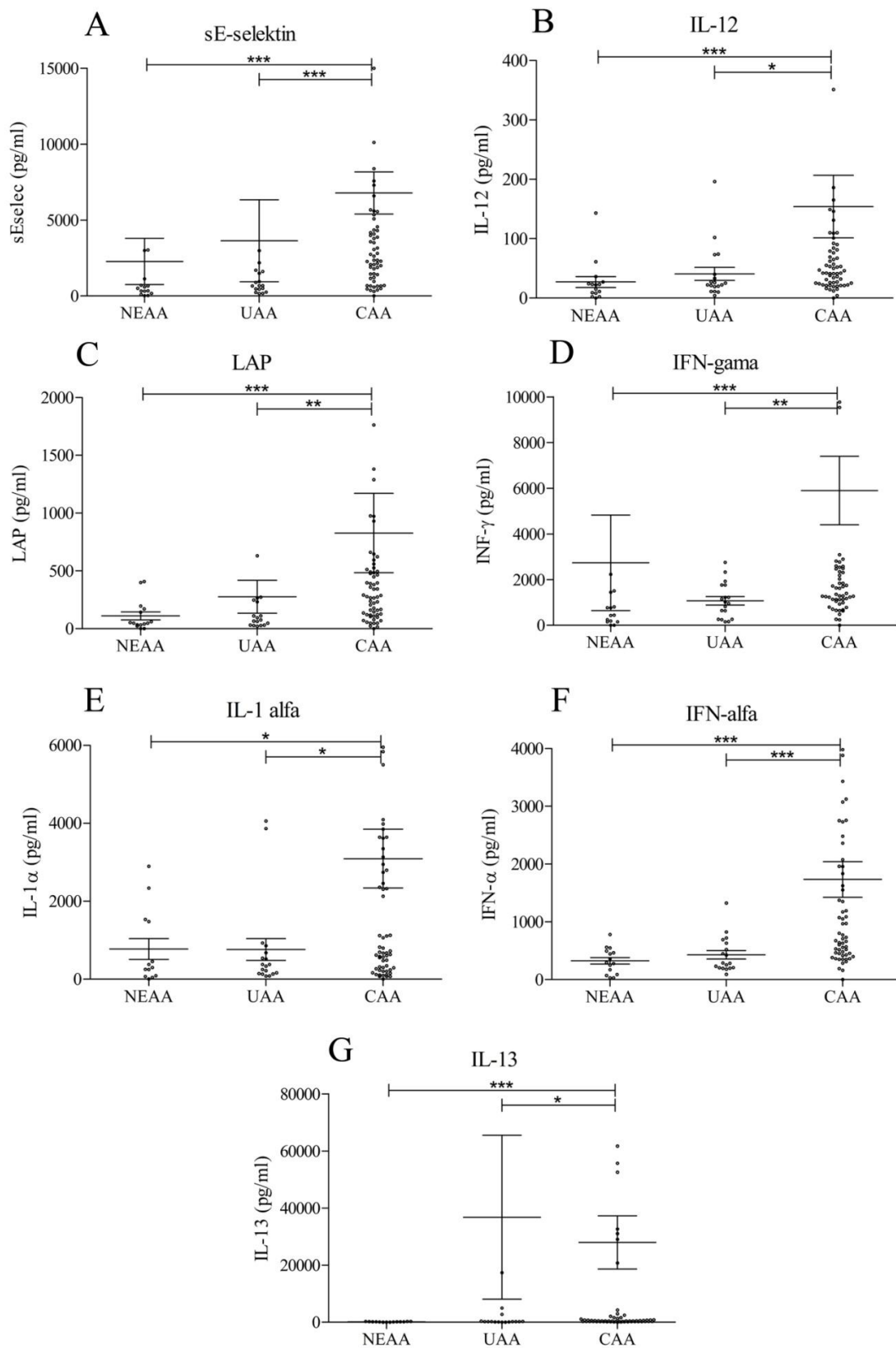
TNF-alfa je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 27F). Značajna statistička razlika je postojala između sve tri grupe, između NEAA i UAA ( $62\pm 48$  vs.  $100\pm 108$ ,  $p=0.0429$ ), između UAA i CAA ( $100\pm 108$  vs.  $353\pm 762$ ,  $p=0.0020$ ) i između NEAA i CAA ( $62\pm 48$  vs.  $353\pm 762$ ,  $p<0.0001$ ).





**Figura 27.** Komparacija vrednosti peritoneumskih citokina između formiranih patohistoloških grupa: ICAM-1 (A); IL-6 (B); IL-4 (C); IL-17 (D); IL-1b (E); TNF-alfa (F). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Withney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Vrednosti sE-selektina imale najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 28A). Značajna razlika je bila prisutna između NEAA i CAA ( $2274 \pm 5866$  vs.  $6779 \pm 11018$ ,  $p=0.0003$ ) i između UAA i CAA ( $3633 \pm 11444$  vs.  $6779 \pm 11018$ ,  $p=0.0002$ ).



**Figura 28.** Komparacija vrednosti peritoneumskih citokina između formiranih patohistoloških grupa: E-selektin (A); IL-12 (B); LAP (C); IFN-gama (D); IL-1alfa (E); IFN-alfa (F); IL-13 (G). (Srednja vrednost±standardna greška, Mann-Withney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

IL-12 je bio najviši u CAA i najniži u NEAA grupi (Figura 28B), sa razlikom u vrednostima značajnom između UAA i CAA ( $40\pm 46$  vs.  $154\pm 417$ ,  $p=0.0148$ ) i između NEAA i CAA ( $27\pm 35$  vs.  $154\pm 417$ ,  $p=0.0007$ ).

LAP je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 28C). Značajna statistička razlika je postojala između UAA i CAA ( $276\pm 603$  vs.  $826\pm 2725$ ,  $p=0.0022$ ), između NEAA i CAA ( $110\pm 132$  vs.  $826\pm 2725$ ,  $p=0.0002$ ).

IFN-gama je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u UAA grupi (Figura 28D). Značajna statistička razlika je postojala između UAA i CAA ( $1070\pm 776$  vs.  $5895\pm 11892$ ,  $p=0.0020$ ) i između NEAA i CAA ( $2738\pm 8108$  vs.  $5895\pm 11892$ ,  $p=0.0004$ ).

IL-1 alfa je imao najvišu vrednost u CAA grupi i ujednačene vrednosti u preostale dve grupe (Figura 28E). Značajna statistička razlika je postojala između UAA i CAA ( $761\pm 1192$  vs.  $3094\pm 5993$ ,  $p=0.0208$ ) i između NEAA i CAA ( $773\pm 964$  vs.  $3094\pm 5993$ ,  $p=0.0264$ ).

IFN-alfa je imao najvišu vrednost u CAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 28F). Značajna statistička razlika je postojala između UAA i CAA ( $428\pm 312$  vs.  $1734\pm 2446$ ,  $p=0.0001$ ) i između NEAA i CAA ( $324\pm 224$  vs.  $1734\pm 2446$ ,  $p<0.0001$ ).

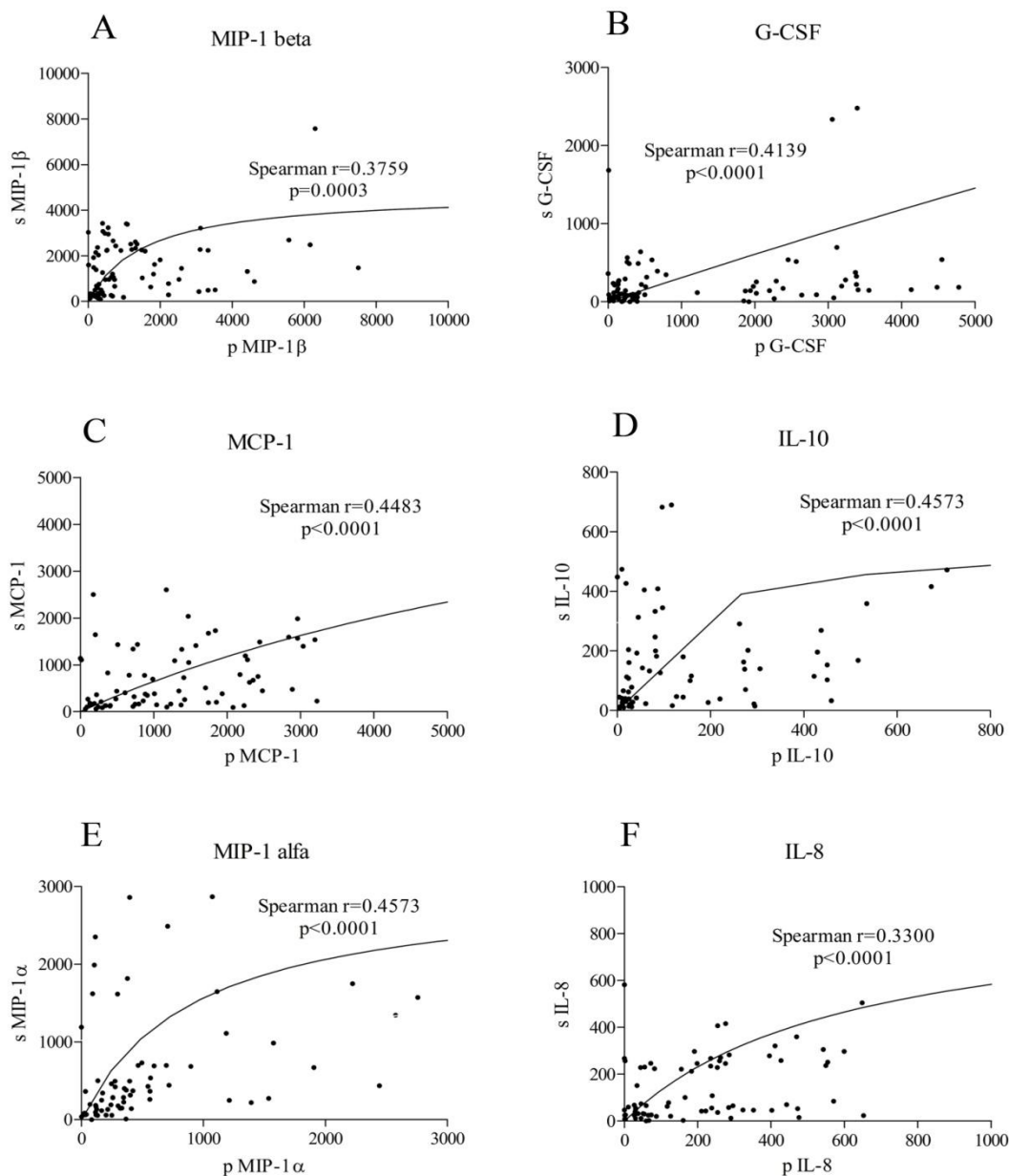
IL-13 je imao najvišu vrednost u UAA grupi a najnižu u NEAA grupi (Figura 28G). Značajna statistička razlika je postojala između UAA i CAA ( $36788\pm 121844$  vs.  $27989\pm 74130$ ,  $p=0.0356$ ), između NEAA i CAA ( $154\pm 98$  vs.  $27989\pm 74130$ ,  $p<0.0001$ ).

### **13.3. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina**

Korelacija peritoneumskih i serumskih vrednosti citokina je zbog jednovremenskog uzorkovanja peritoneumske tečnosti ispitivana samo na dan operacije.

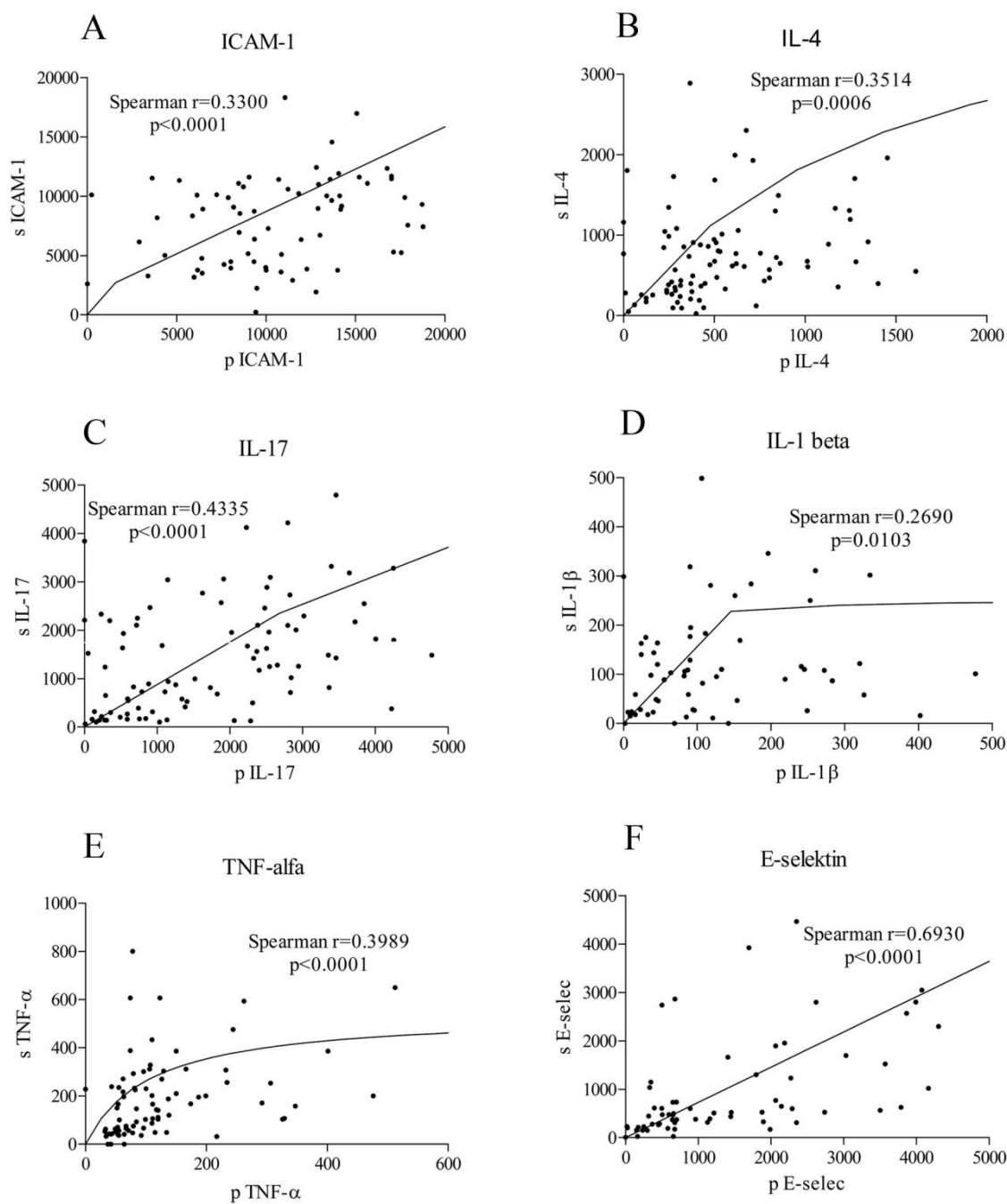
#### *13.3.1. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina na ukupnom broju pacijenata*

Na ukupnom broju pacijenata, pozitivna korelacija između peritoneumskih i serumskih vrednosti, nađena je kod svih citokina, izuzev kod IL-6 (Figure 29, 30 i 31).

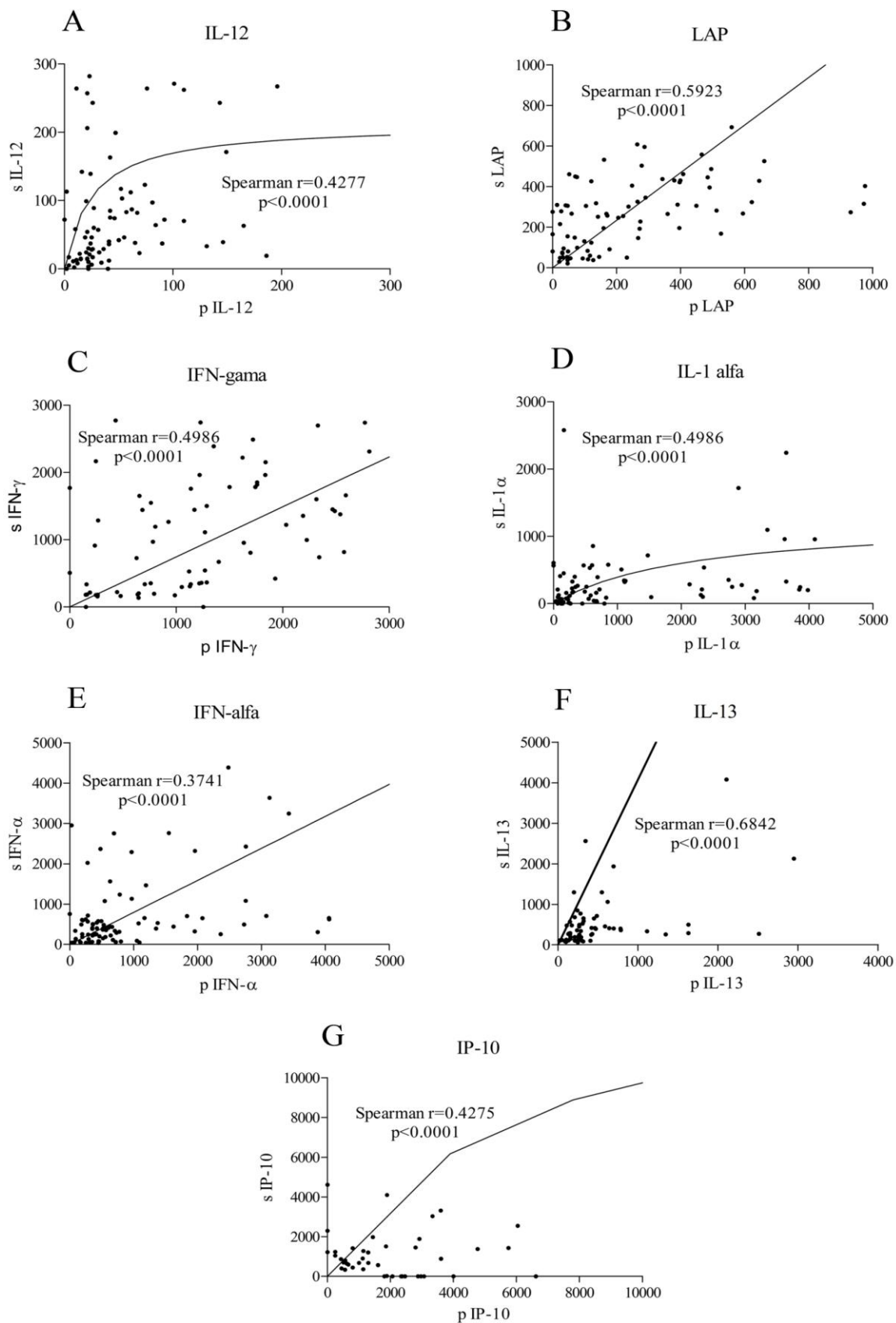


**Figura 29.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine na ukupnom broju pacijenata: MIP-1beta (A), G-CSF (B), MCP-1 (C), IL-10 (D), MIP-1alfa (E) i IL-8 (F).

Positivna korelacija je na kompletom uzorku statistički demonstrirana kod MIP-1beta (Spearman  $r=0.3759$ ,  $p=0.0003$ , Figura 29A), G-CSF (Spearman  $r=0.4139$ ,  $p<0.0001$ , Figura 29B), MCP-1 (Spearman  $r=0.4483$ ,  $p<0.0001$ , Figura 29C), IL-10 (Spearman  $r=0.4573$ ,  $p<0.0001$ , Figura 29D), MIP 1alfa (Spearman  $r=0.5386$ ,  $p<0.0001$ , Figura 29E), IL-8 (Spearman  $r=0.3300$ ,  $p<0.0001$ , Figura 29F).



**Figura 30.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine na ukupnom broju pacijenata: ICAM-1 (A), IL-4 (B), IL-17 (C), IL-1 $\beta$  (D), TNF-alfa (E) i E-selektin (F).

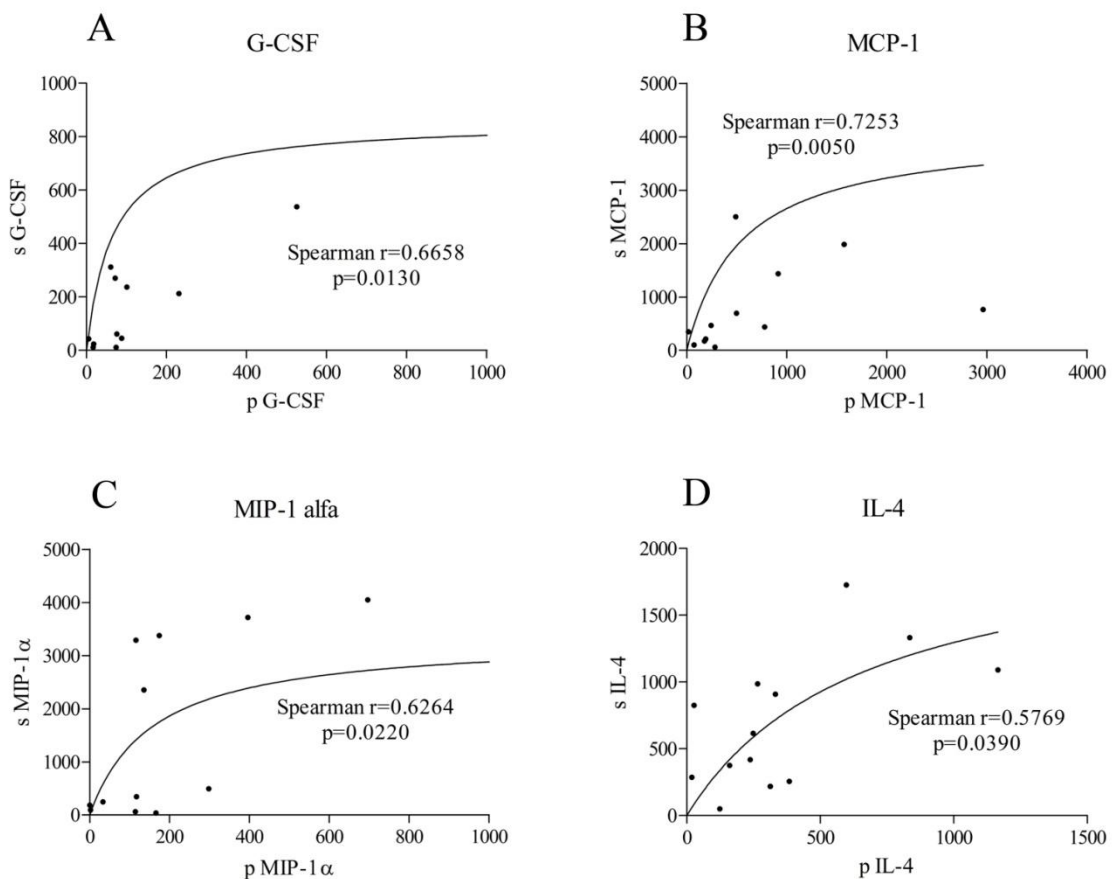


**Figura 31.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine na ukupnom broju pacijenata: IL-12 (A), LAP (B), IFN-gama (C), IL-1alfa (D), IFN-alfa (E), IL-13 (F) i IP-10 (G).

Nadalje, pozitivna korelacija je na ukupnom uzorku statistički bila značajna i kod ICAM-1 (Spearman  $r=0.3300$ ,  $p<0.0001$ , Figura 30A), IL-4 (Spearman  $r=0.3514$ ,  $p=0.0006$ , Figura 30B), IL-17 (Spearman  $r=0.4335$ ,  $p<0.0001$ , Figura 30C), IL-1beta (Spearman  $r=0.2690$ ,  $p=0.0103$ , Figura 30D), TNF-alfa (Spearman  $r=0.3989$ ,  $p<0.0001$ , Figura 30E), E-selektina (Spearman  $r=0.6930$ ,  $p<0.0001$ , Figura 30F).

Takođe, pozitivna korelacija na ukupnom broju pacijenata statistički je bila značajna i kod IL-12 (Spearman  $r=0.4277$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31A), LAP (Spearman  $r=0.5923$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31B), IFN-gama (Spearman  $r=0.4986$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31C), IL-1 alfa (Spearman  $r=0.4986$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31D), IFN-alfa (Spearman  $r=0.3741$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31E), IL-13 (Spearman  $r=0.6842$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31F) i IP-10 (Spearman  $r=0.4275$ ,  $p<0.0001$ , Figura 31G).

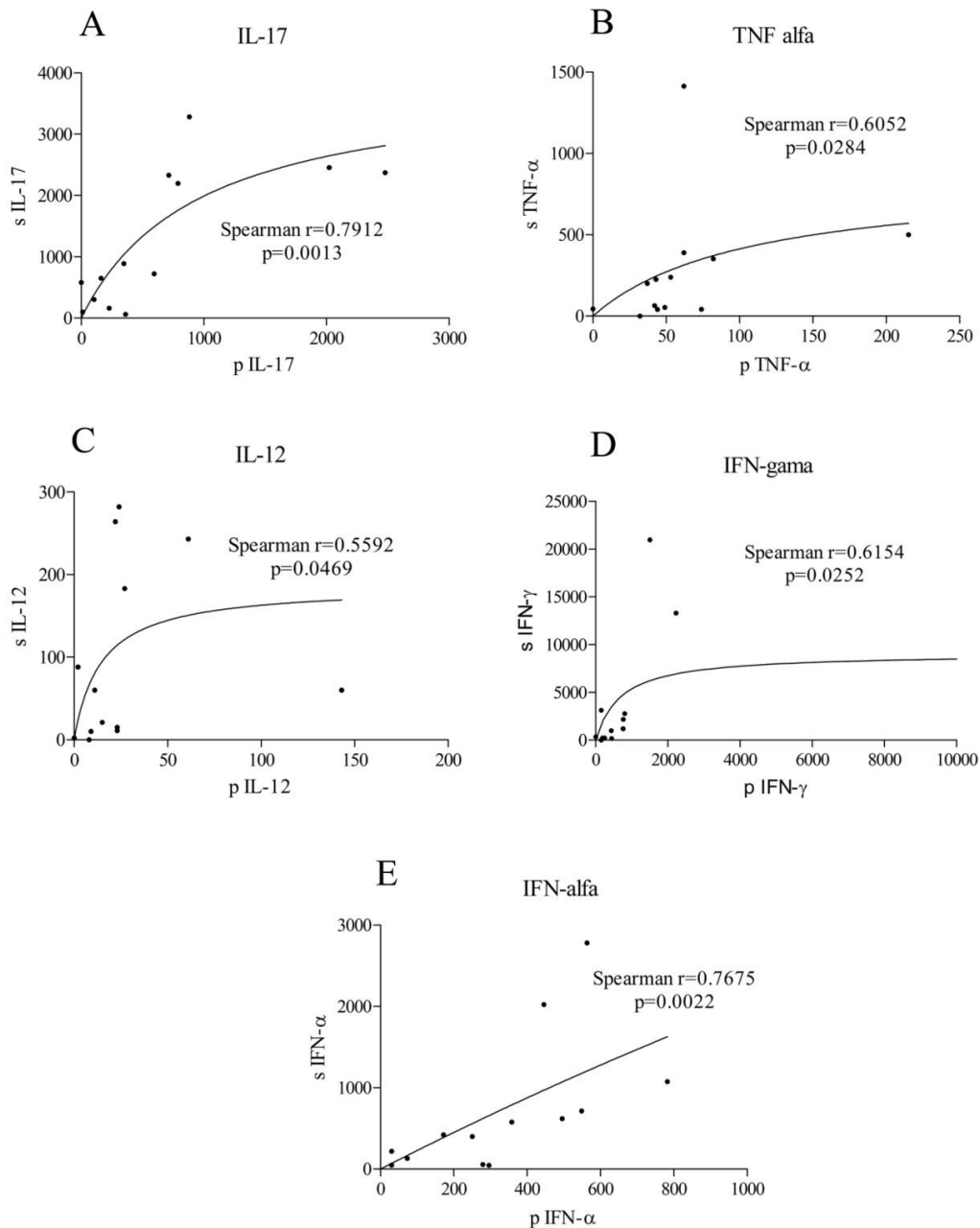
### 13.3.2. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar NEAA grupe



**Figura 32.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata NEAA grupe: G-CSF (A), MCP-1 (B), MIP-1alfa (C) i IL-4 (D).

U okviru NEAA grupe, pozitivna korelacija između peritoneumskih i serumskih vrednosti, nađena je kod devet od dvadeset testiranih citokina (Figure 32 i 33).

Demonstrirana je pozitivna korelacija kod: G-CSF (Spearman  $r=0.6658$ ,  $p=0.0130$ , Figura 32A), MCP-1 (Spearman  $r=0.7253$ ,  $p=0.0050$ , Figura 32B), MIP-1alfa (Spearman  $r=0.6264$ ,  $p=0.0220$ , Figura 32C), IL-4 (Spearman  $r=0.5769$ ,  $p=0.0390$ , Figura 32D).



**Figura 33.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata NEAA grupe: IL-17 (A), TNF-alfa (B), IL-12 (C), IFN-gama (D) i IFN-alfa (D).

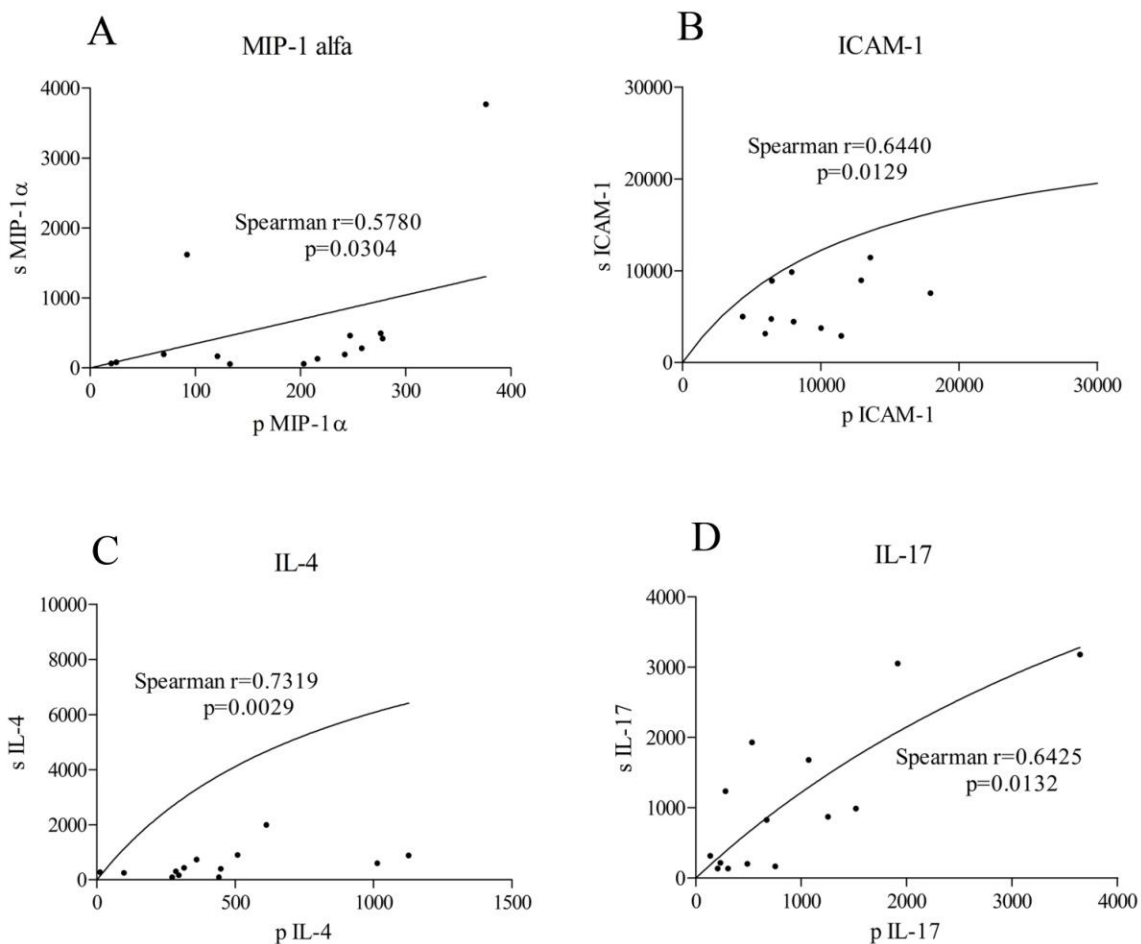


Pozitivna korelacija je postojala i kod: IL-17 (Spearman  $r=0.7912$ ,  $p=0.0013$ , Figura 33A), TNF-alfa (Spearman  $r=0.6052$ ,  $p=0.0284$ , Figura 33B), IL-12 (Spearman  $r=0.5592$ ,  $p=0.0469$ , Figura 33C), IFN-gama (Spearman  $r=0.6154$ ,  $p=0.0252$ , Figura 33D) i IFN-alfa (Spearman  $r=0.7675$ ,  $p=0.0022$ , Figura 33E).

### 13.3.3. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar UAA grupe

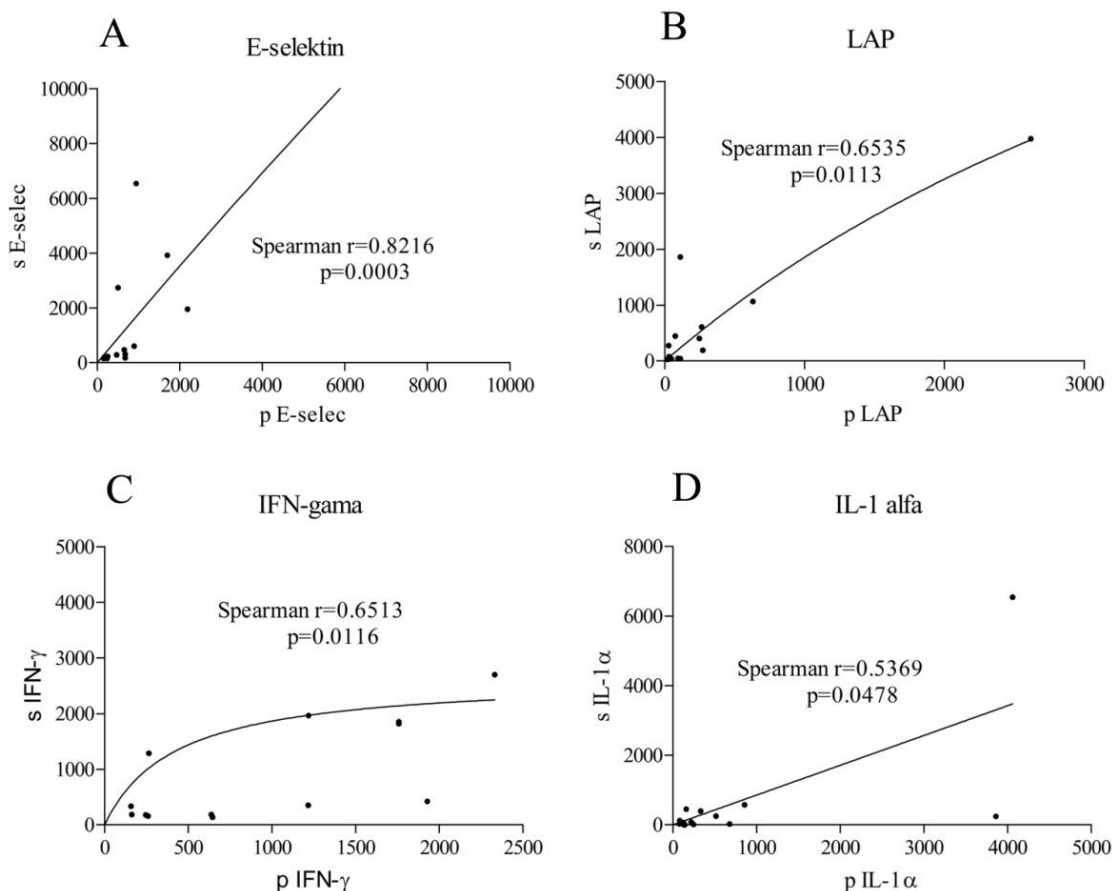
U okviru UAA grupe, pozitivna korelacija između peritoneumskih i serumskih vrednosti, nađena je kod osam od dvadeset testiranih citokina (Figure 34 i 35).

Pozitivna korelacija je bila prisutna kod: MIP-1alfa (Spearman  $r=0.5780$ ,  $p=0.0304$ , Figura 34A), ICAM-1 (Spearman  $r=0.6440$ ,  $p=0.0129$ , Figura 34B), IL-4 (Spearman  $r=0.7319$ ,  $p=0.0029$ , Figura 34C), IL-17 (Spearman  $r=0.6425$ ,  $p=0.0132$ , Figura 34D).



**Figura 34.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata UAA grupe: MIP-1alfa (A), ICAM-1 (B), IL-4 (C), IL-17 (D).

Pozitivna korelacija je postojala i kod: E-selektina (Spearman  $r=0.8216$ ,  $p=0.0003$ , Figura 35A), LAP (Spearman  $r=0.6535$ ,  $p=0.0113$ , Figura 35B), IFN-gama (Spearman  $r=0.6513$ ,  $p=0.0116$ , Figura 35C) i IL-1 alfa (Spearman  $r=0.5369$ ,  $p=0.0478$ , Figura 35D).



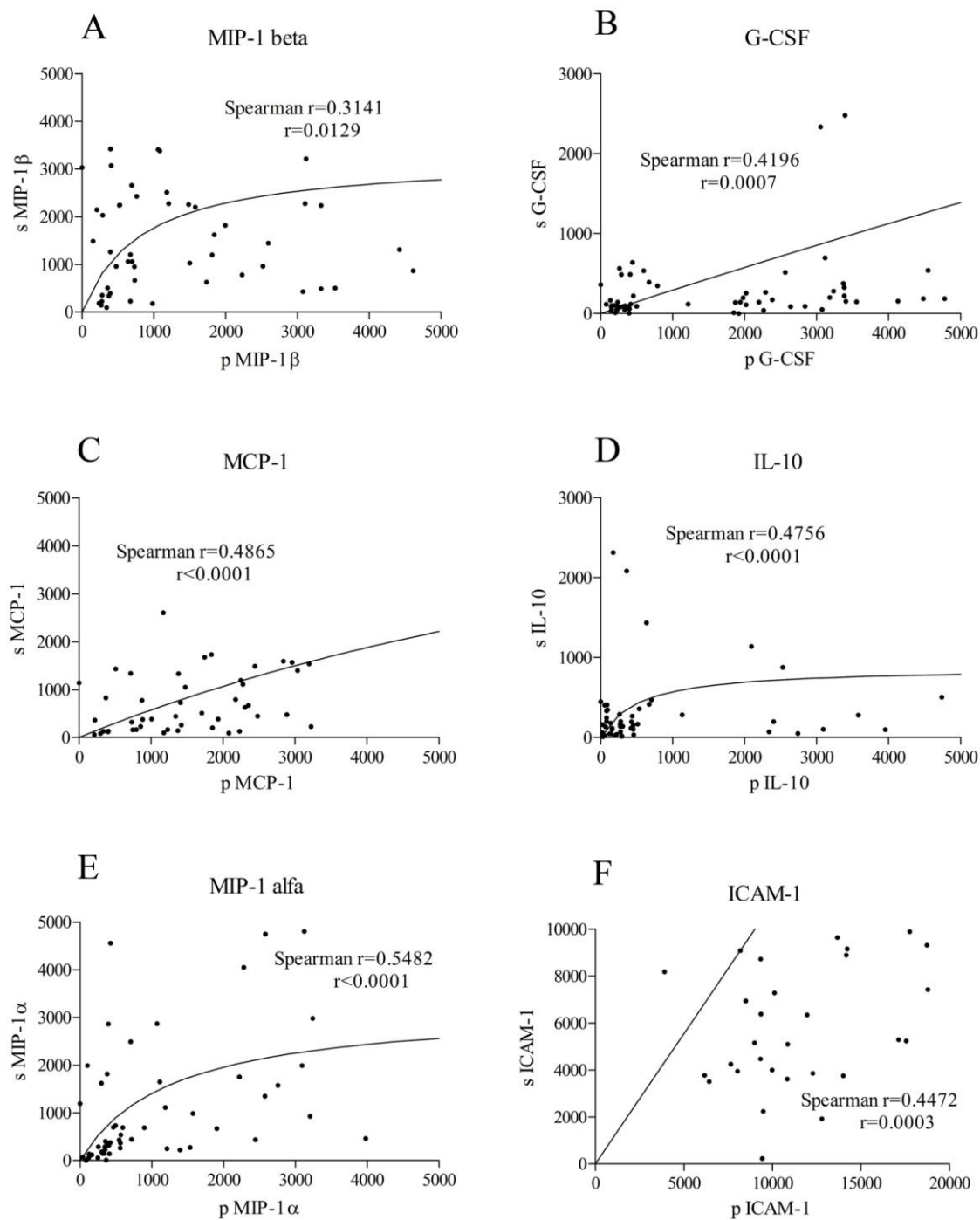
**Figura 35.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata UAA grupe: E-selektin (A), LAP (B), IFN-gama (C) i IL-1 alfa (D).

#### 13.3.4. Korelacija peritoneumskih i serumskih citokina unutar CAA grupe

Unutar CAA grupe, pozitivna korelacija između peritoneumskih i serumskih vrednosti je nađena kod sedamnaest od dvadeset testiranih citokina (Figure 36, 37 i 38).

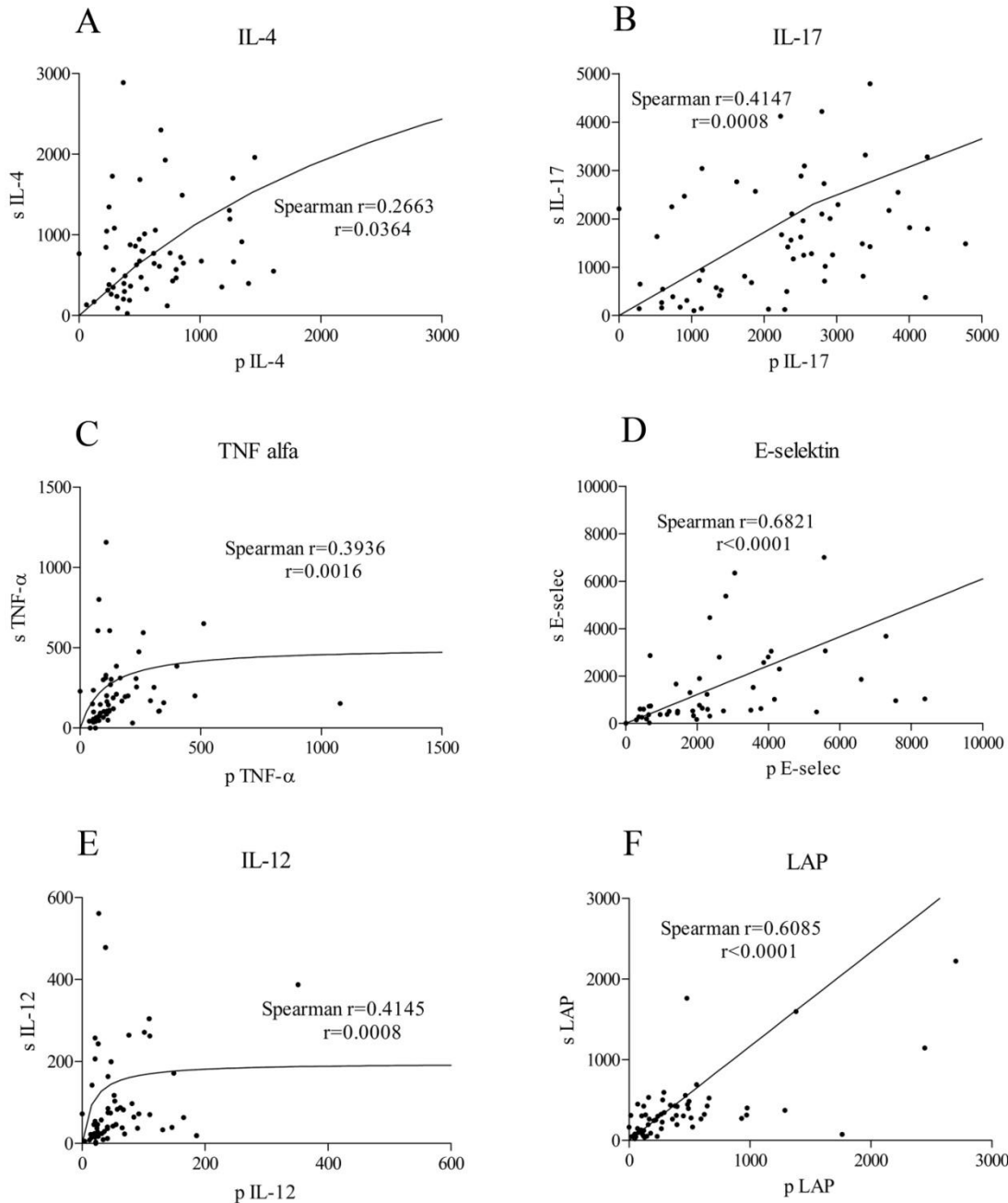
Pozitivna korelacija je bila prisutna kod: MIP-1beta (Spearman  $r=0.3141$ ,  $p=0.0129$ , Figura 36A), G-CSF (Spearman  $r=0.4196$ ,  $p=0.0007$ , Figura 36B), MCP-1 (Spearman  $r=0.4865$ ,  $p<0.0001$ , Figura 36C), IL-10 (Spearman  $r=0.4756$ ,  $p<0.0001$ , Figura 36D), MIP-

1alfa (Spearman  $r=0.5482$ ,  $p<0.0001$ , Figura 36D), ICAM-1 (Spearman  $r=0.4472$ ,  $p=0.0003$ , Figura 36D).



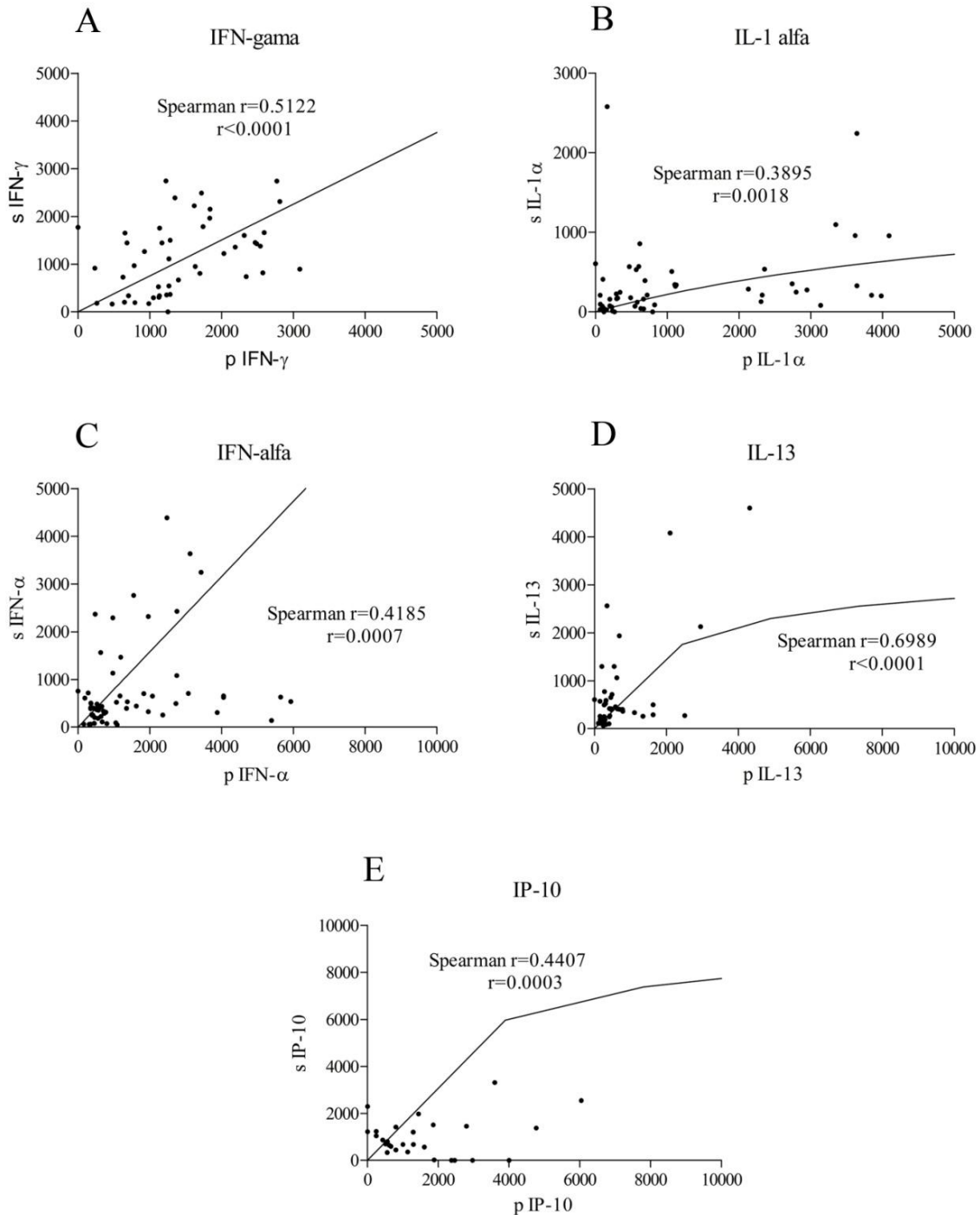
**Figura 36.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata CAA grupe: MIP-1beta (A), G-CSF (B), MCP-1 (C), IL-10 (D), MIP-1alfa (E) i ICAM-1 (F).

Pozitivna korelacija je zabeležena i kod: IL-4 (Spearman  $r=0.2663$ ,  $p=0.0364$ , Figura 37A), IL-17 (Spearman  $r=0.4147$ ,  $p=0.0008$ , Figura 37B), TNF-alfa (Spearman  $r=0.3936$ ,  $p=0.0016$ , Figura 37C), E-selektina (Spearman  $r=0.6821$ ,  $p<0.0001$ , Figura 37D), IL-12 (Spearman  $r=0.4145$ ,  $p=0.0008$ , Figura 37D), LAP (Spearman  $r=0.6085$ ,  $p<0.0001$ , Figura 37D).



**Figura 37.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata CAA grupe: IL-4 (A), IL-17 (B), TNF-alfa (C), E-selektina (D), IL-12 (E), LAP (F).

Pozitivna korelacija je bila prisutna i kod: IFN-gama (Spearman  $r=0.5122$ ,  $p<0.0001$ , Figura 38A), IL-1 alfa (Spearman  $r=0.3895$ ,  $p=0.0018$ , Figura 38B), IFN-alfa (Spearman  $r=0.4185$ ,  $p=0.0007$ , Figura 38C), IL-13 (Spearman  $r=0.6989$ ,  $p<0.0001$ , Figura 38D) i IL-10 (Spearman  $r=0.4407$ ,  $p=0.0003$ , Figura 38D).



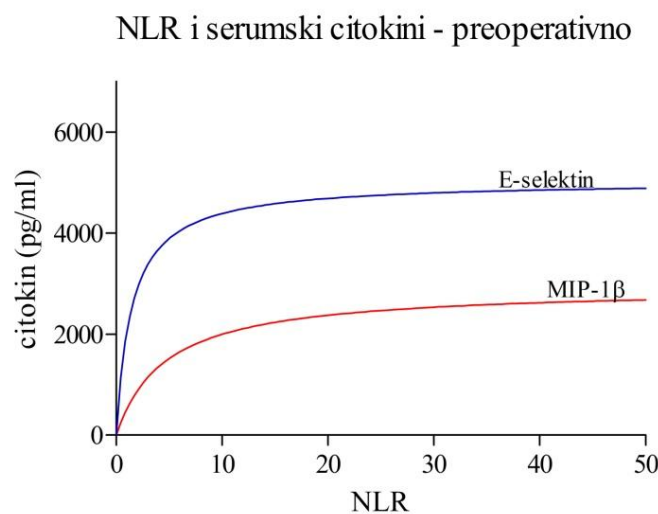
**Figura 38.** Korelacija vrednosti peritoneumskih i preoperativnih serumskih vrednosti za pojedinačne citokine kod pacijenata CAA grupe: IFN-gama (A), IL-1 alfa (B), IFN-alfa (C), IL-13 (D) i IP-10 (E).

### 13.4. Korelacije serumskih i peritoneumskih citokina sa parametrima standardne laboratorije

Ispitivane su koralacije NLR, CRP i MPXI sa serumskim vrednostima citokina preoperativno, prvog i trećeg postoperativnog dana, kao i sa peritoneumskim vrednostima citokina, uzetim neposredno nakon laparotomije.

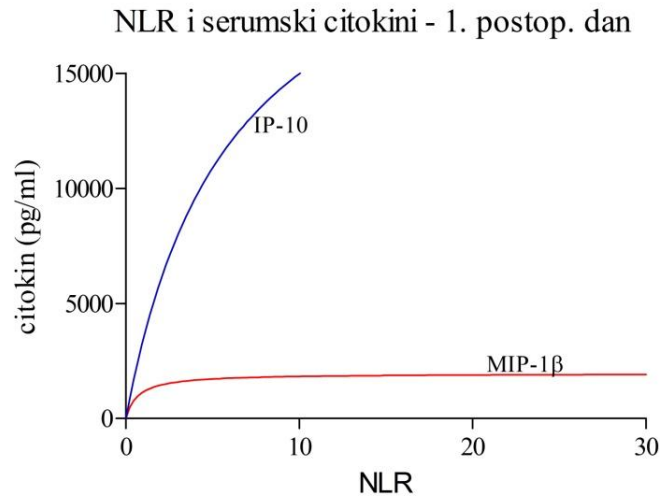
#### 13.4.1. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa NLR

Na ukupnom broju pacijenata, preoperativno je NLR pozitivno statistički značajno korelirao sa vrednostima MIP-1beta (Spearman  $r=0.2158$ ,  $p=0.0217$ , Figura 39) i E-selektina (Spearman  $r=0.1887$ ,  $p=0.0454$ , Figura 39).



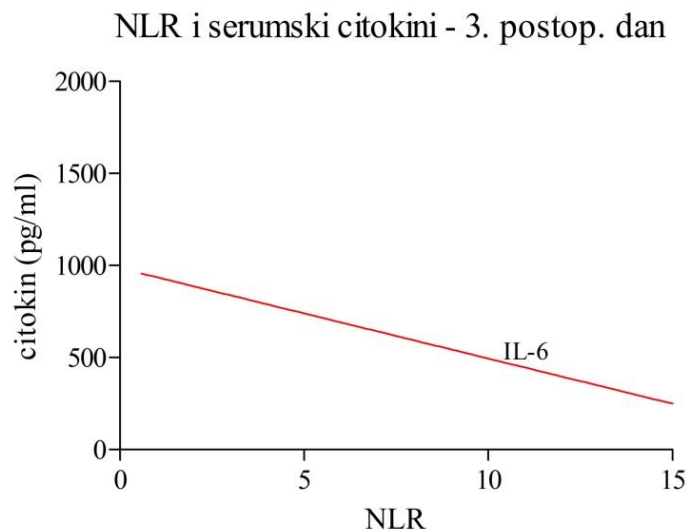
**Figura 39.** Korelacija preoperativnih vrednosti NLR i serumskih citokina: MIP-1beta i E- selektin.

Prvog postoperativnog dana, NLR je na ukupnom broju pacijenata, pozitivno statistički značajno korelirao sa vrednostima MIP-1beta (Spearman  $r=0.2163$ ,  $p=0.0226$ , Figura 40) i IP-10 (Spearman  $r=0.2016$ ,  $p=0.0339$ , Figura 40).



**Figura 40.** Korelacija vrednosti NLR od prvog postoperativnog dana i serumskih citokina: MIP-1beta i IP-10.

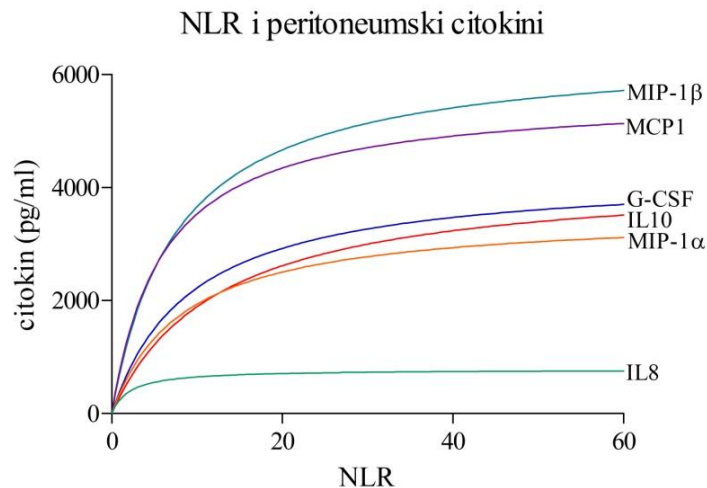
Trećeg postoperativnog dana, NLR je na ukupnom broju pacijenata, negativno statistički značajno korelirao sa vrednostima IL-6 (Spearman  $r=0.2018$ ,  $p=-0.0371$ , Figura 41).



**Figura 41.** Korelacija vrednosti NLR od trećeg postoperativnog dana i serumskih citokina: IL-6.

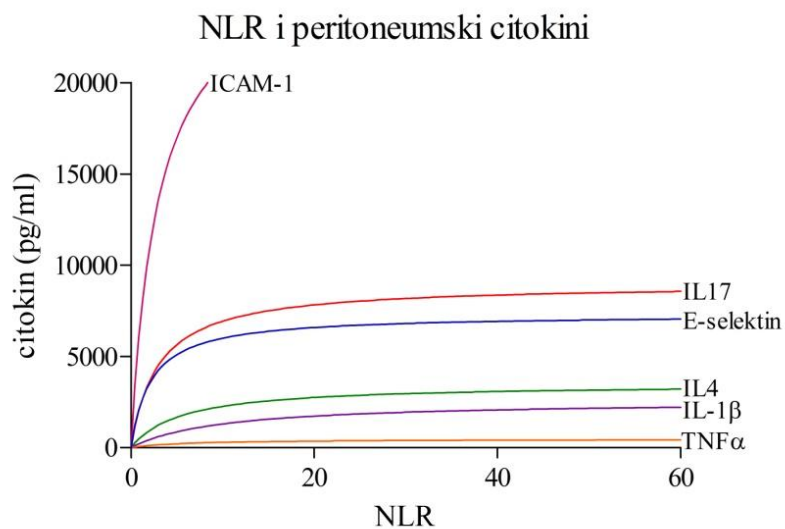
Na ukupnom broju pacijenata, NLR je sa peritoneumskim vrednostima citokina pozitivno statistički značajno korelirao sa osamnaest od dvadeset testiranih (Figure 42, 43 i 44). Pozitivna korelacija bila je zabeležena sa: MIP-1beta (Spearman  $r=0.3705$ ,  $p=0.0002$ ,

Figura 42), G-CSF (Spearman  $r=0.4597$ ,  $p<0.0001$ , Figura 42), MCP-1 (Spearman  $r=0.4009$ ,  $p<0.0001$ , Figura 42), IL-10 (Spearman  $r=0.5793$ ,  $p<0.0001$ , Figura 42), MIP-1alfa (Spearman  $r=0.3655$ ,  $p=0.0003$ , Figura 42), IL-8 (Spearman  $r=0.2650$ ,  $p=0.0091$ , Figura 42).



**Figura 42.** Korelacija vrednosti NLR i peritoneumskih citokina: MIP-1beta, G-CSF, MCP-1, IL-10, MIP-1alfa i IL-8.

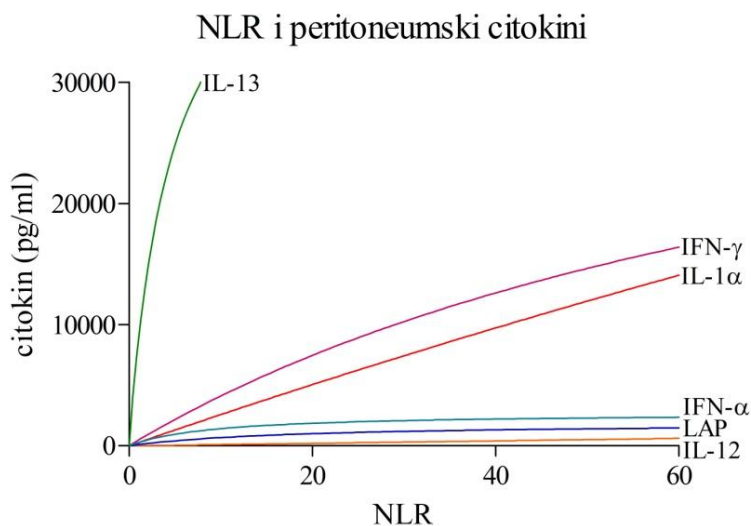
Dalje, pozitivna korelacija bila je zabeležena sa: ICAM-1 beta (Spearman  $r=0.2672$ ,  $p=0.0085$ , Figura 43), IL-4 (Spearman  $r=0.3057$ ,  $p=0.0025$ , Figura 43), IL-17 (Spearman  $r=0.3585$ ,  $p=0.0003$ , Figura 43), IL-1 beta (Spearman  $r=0.4711$ ,  $p<0.0001$ , Figura 43), TNF alfa (Spearman  $r=0.4019$ ,  $p<0.0001$ , Figura 43), E-selektinom (Spearman  $r=0.2917$ ,  $p=0.0039$ , Figura 43).



**Figura 43.** Korelacija vrednosti NLR i peritoneumskih citokina: ICAM-1,IL-4, IL-17, IL-1 beta, TNF alfa i E-selektin.



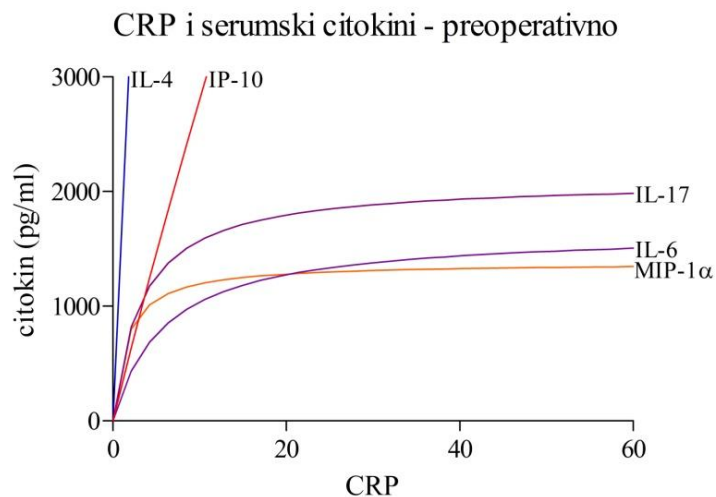
Pozitivna korelacija bila je zabeležena i sa: IL-12 (Spearman  $r=0.2867$ ,  $p=0.0046$ , Figura 44), LAP (Spearman  $r=0.2492$ ,  $p=0.0144$ , Figura 44), IFN gama (Spearman  $r=0.3444$ ,  $p=0.0006$ , Figura 44), IL-1 alfa (Spearman  $r=0.2219$ ,  $p<0.0001$ , Figura 44), IL-13 (Spearman  $r=0.3499$ ,  $p<0.0005$ , Figura 44).



**Figura 44.** Korelacija vrednosti NLR i peritoneumskih citokina: IL-12, IFN gama, IL-1 alfa, LAP, IFN alfa i IL-13.

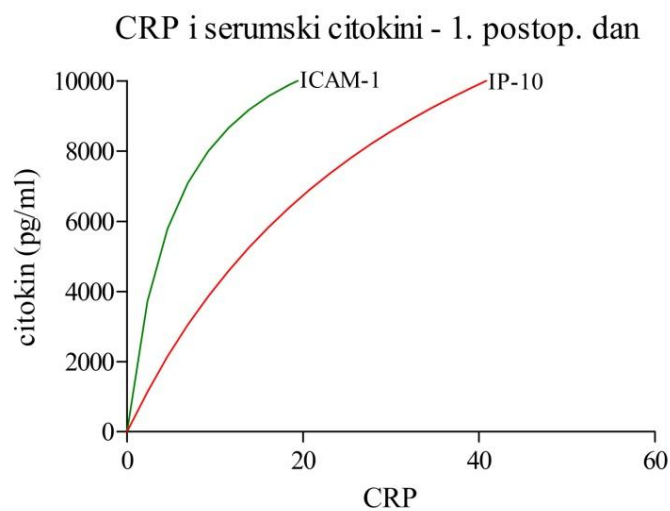
#### 13.4.2. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa CRP

Na ukupnom broju pacijenata, CRP je preoperativno pozitivno statistički značajno korelirao sa vrednostima MIP-1 alfa (Spearman  $r=0.2248$ ,  $p=0.0167$ , Figura 45), IL-6 (Spearman  $r=0.2080$ ,  $p=0.0271$ , Figura 45), IL-4 (Spearman  $r=0.2696$ ,  $p=0.0039$ , Figura 45), IL-17 (Spearman  $r=0.2106$ ,  $p=0.0252$ , Figura 45) i IP-10 (Spearman  $r=0.2209$ ,  $p=0.0187$ , Figura 45).



**Figura 45.** Korelacija vrednosti CRP i preoperativnih vrednosti serumskih citokina: MIP-1alfa, IL-6, IL-4, IL-17, i IP-10.

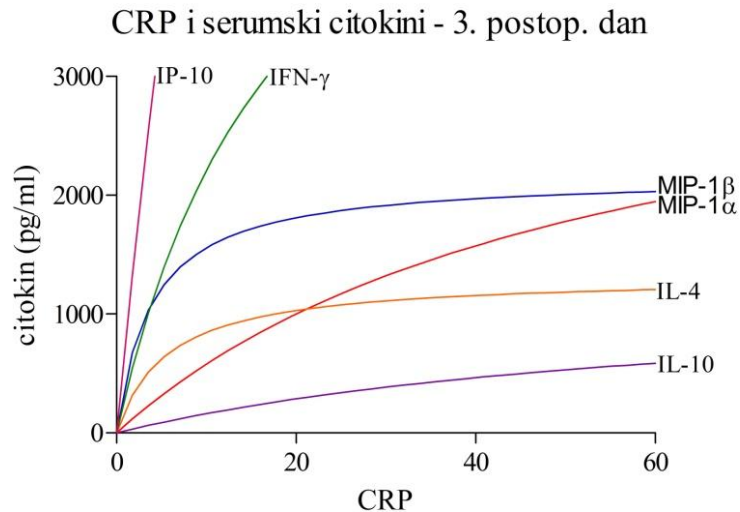
Prvog postoperativnog dana, pozitivna korelacija je bila zabeležena sa: ICAM-1 (Spearman  $r=0.2189$ ,  $p=0.0235$ , Figura 46) i IP-10 (Spearman  $r=0.2186$ ,  $p=0.0237$ , Figura 46).



**Figura 46.** Korelacija vrednosti CRP i vrednosti serumskih citokina prvog postoperativnog dana: ICAM-1 i IP-10.

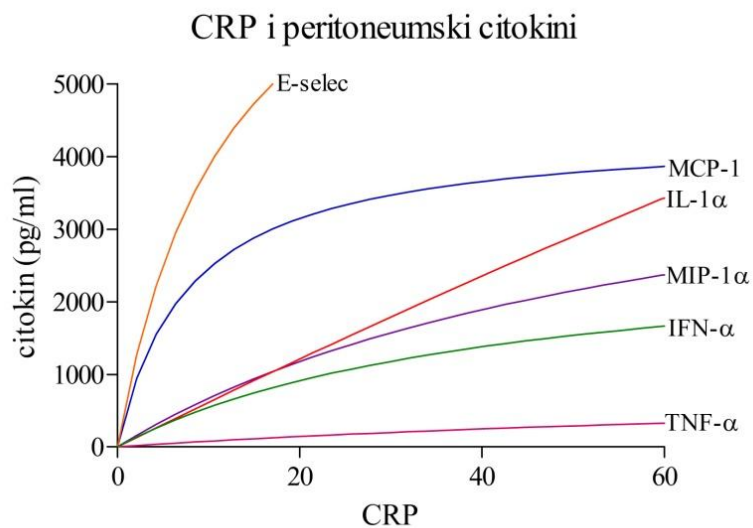
Trećeg postoperativnog dana, pozitivna korelacija je bila zabeležena sa: IP-10 (Spearman  $r=0.2091$ ,  $p=0.0323$ , Figura 47), IFN-gama (Spearman  $r=0.2001$ ,  $p=0.0407$ ,

Figura 47), MIP-1beta (Spearman  $r=0.2502$ ,  $p=0.0101$ , Figura 47), MIP-1alfa (Spearman  $r=0.2309$ ,  $p=0.0178$ , Figura 47), IL-4 (Spearman  $r=0.2824$ ,  $p=0.0035$ , Figura 47) i IL-10 (Spearman  $r=0.2691$ ,  $p=0.0055$ , Figura 47).



**Figura 47.** Korelacija vrednosti CRP i vrednosti serumskih citokina trećeg postoperativnog dana: IP-10, IFN-gama, MIP-1beta, MIP-1alfa, IL-4 i IL-10.

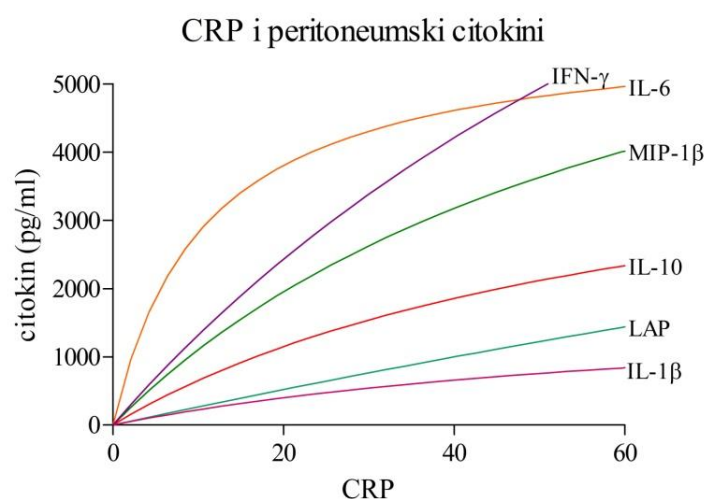
Na ukupnom broju pacijenata, CRP je sa peritoneumskim vrednostima citokina pozitivno statistički značajno korelirao sa dvanaest od dvadeset testiranih (Figura 48 i 49).



**Figura 48.** Korelacija vrednosti CRP i vrednosti peritoneumskih citokina: MIP-1alfa, MCP-1, TNF-alfa, E-selektina, IL-1alfa i INF-alfa.

Pozitivna korelacija bila je zabeležena sa: MIP-1alfa (Spearman  $r=0.4677$ ,  $p<0.0001$ , Figura 48), MCP-1 (Spearman  $r=0.2875$ ,  $p=0.0045$ , Figura 48), E-selektin (Spearman  $r=0.3224$ ,  $p=0.0014$ , Figura 48), IL-1alfa (Spearman  $r=0.4018$ ,  $p<0.0001$ , Figura 48), TNF-alfa (Spearman  $r=0.3979$ ,  $p<0.0001$ , Figura 48) i IFN-alfa (Spearman  $r=0.3657$ ,  $p=0.0002$ , Figura 48).

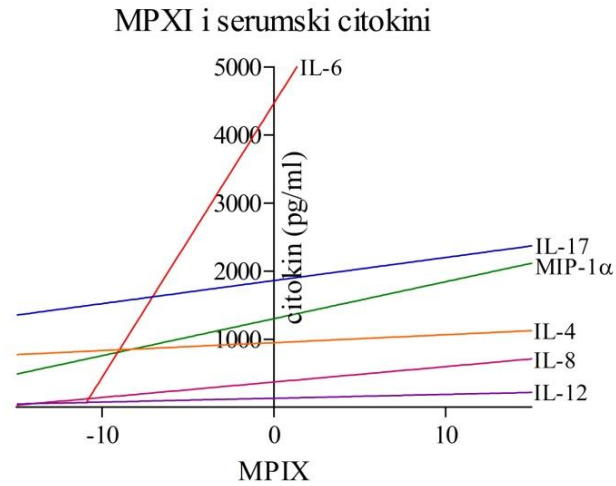
Pozitivna korelacija bila je zabeležena i sa: MIP-1beta (Spearman  $r=0.4750$ ,  $p<0.0001$ , Figura 49), IL-10 (Spearman  $r=0.3957$ ,  $p<0.0001$ , Figura 49), IL-6 (Spearman  $r=0.2502$ ,  $p=0.0140$ , Figura 49), IL-1beta (Spearman  $r=0.5335$ ,  $p<0.0001$ , Figura 49), LAP (Spearman  $r=0.4611$ ,  $p<0.0001$ , Figura 49) i IFN-gama (Spearman  $r=0.3521$ ,  $p=0.0002$ , Figura 49).



**Figura 49.** Korelacija vrednosti CRP i vrednosti peritoneumskih citokina: MIP-1beta, IL-10, IL-6, IL-1beta, LAP i INF-gama.

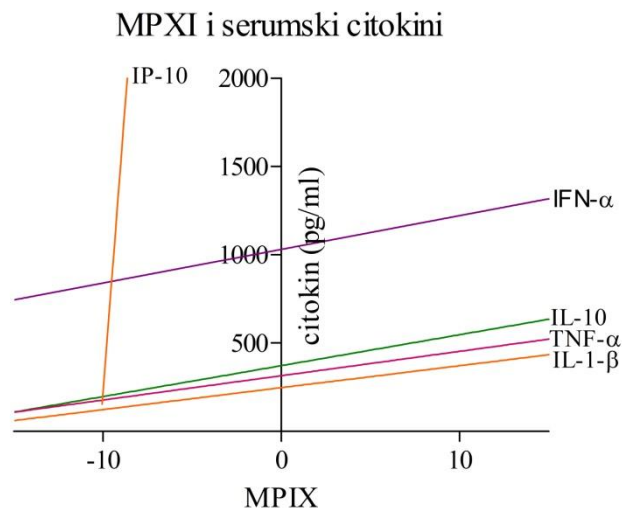
#### 13.4.3. Korelacija serumskih i peritoneumskih citokina sa MPXI

Na ukupnom broju pacijenata, preoperativno je MPXI pozitivno statistički značajno korelirao sa vrednostima MIP-1alfa (Spearman  $r=0.2588$ ,  $p=0.0231$ , Figura 50), IL-8 (Spearman  $r=0.2370$ ,  $p=0.0380$ , Figura 50), IL-6 (Spearman  $r=0.2508$ ,  $p=0.0278$ , Figura 50), IL-4 (Spearman  $r=0.2557$ ,  $p=0.0248$ , Figura 50), IL-17 (Spearman  $r=0.2352$ ,  $p=0.0395$ , Figura 50), IL-12 (Spearman  $r=0.2601$ ,  $p=0.0223$ , Figura 50).



**Figura 50.** Korelacija vrednosti MPXI i preoperativnih vrednosti serumskih citokina: MIP-1alfa, IL-6, IL-4, IL-17, i IL-12.

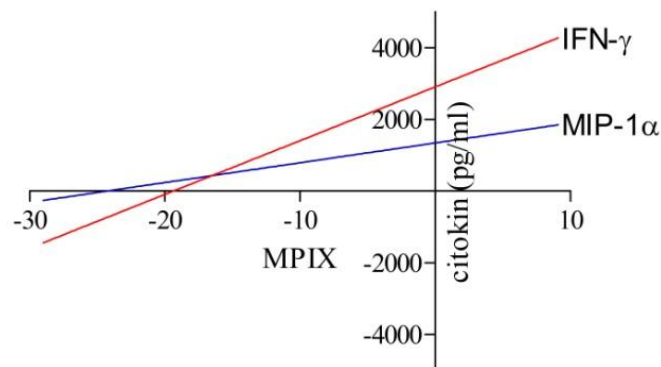
Dalje, pozitivna korelacija je preoperativno bila prisutna i između MPXI i: IL-10 (Spearman  $r=0.2482$ ,  $p=0.0295$ , Figura 51), IL-1beta (Spearman  $r=0.2559$ ,  $p=0.0247$ , Figura 51), TNF-alfa (Spearman  $r=0.2374$ ,  $p=0.0376$ , Figura 51), IFN-alfa (Spearman  $r=0.2442$ ,  $p=0.0323$ , Figura 51) i IP-10 (Spearman  $r=0.2501$ ,  $p=0.0282$ , Figura 51).



**Figura 51.** Korelacija vrednosti MPXI i preoperativnih vrednosti serumskih citokina: IP-10, IFN-alfa, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .

Prvog postoperativnog dana, pozitivna korelacija je bila zabeležena sa: MIP-1alfa (Spearman  $r=0.2652$ ,  $p=0.0074$ , Figura 52) i IFN-gama (Spearman  $r=0.2048$ ,  $p=0.0400$ , Figura 52).

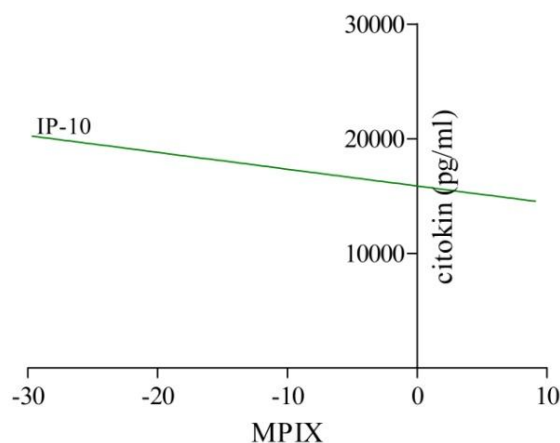
MPXI i serumski citokini - 1. postop. dan



**Figura 52.** Korelacija vrednosti MPXI i preoperativnih vrednosti serumskih citokina: MIP-1alfa i IFN-gama.

Trećeg postoperativnog dana, pozitivna korelacija je bila zabeležena između MPXI i IP-10 (Spearman  $r=0.2179$ ,  $p=0.0286$ , Figura 53).

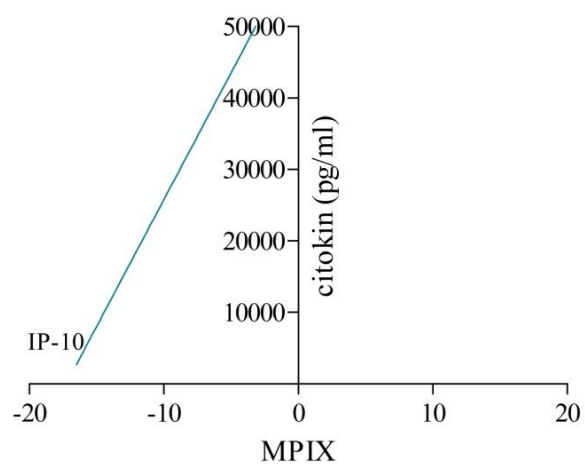
mpxi i serumski citokini - 3. postop. dan



**Figura 53.** Korelacija vrednosti MPXI i preoperativnih vrednosti serumskih citokina: MIP-1alfa i IFN-gama.

Na ukupnom broju pacijenata, MPXI je sa peritoneumskim vrednostima citokina pozitivno statistički značajno korelirao sa IP-10 (Spearman  $r=0.2605$ ,  $p=0.0346$ , Figura 54).

mpxi i peritoneumski citokini



**Figura 54.** Korelacija vrednosti MPXI i peritoneumskih vrednosti citokina: IP-10.

## *Diskusija*

Pouzdana dijagnoza akutnog apendicitisa i pravilno indikovanje apendektomije i dalje predstavljaju izazov u svakodnevnoj pedijatrijskoj medicinskoj praksi. Rizik od razvijanja komplikovane forme bolesti i perforacije je kod dece značajno veći nego kod odraslih, sa incidencom od 20% do 50% i težim posledicama (97). Različita klinička prezentacija i nedovoljna saradljivost dece tokom anketiranja i kliničkog pregleda, kao i strah medicinskog tima od posledica perforacije, svrstavaju akutni apendicitis u jedno od najčešće pogrešno dijagnostikovanih hirurških stanja kod dece (98). Nepostojanje jasne granice između odluke o konzervativnom lečenju i indikovanja hirurškog zahvata, rezultuje nepotrebnim apendektomijama u velikom broju, po nekim ispitivanjima čak do 40%, noseći sa sobom rizik perioperativnih i postoperativnih komplikacija (99).

Uvođenje slikovnih digitalnih radioloških metoda dovelo je do unapređenja dijagnostičkih mogućnosti ali ne i do značajnog smanjenja nepotrebnih hirurških intervencija (99, 100). Ultrasonografija je često nedovoljno informativna, dok je kompjuterizovana tomografija vezana za visoke doze jonizujućeg zračenja, što dovodi u pitanje opravdanost njene upotrebe. Tehnološki laboratorijski napredak i razvoj imunologije omogućuju praćenje inflamatornog odgovora i upućuju na traganje za specifičnim biomarkerima u cilju pouzdanije dijagnoze akutnog apendicitisa. Zapaljenjski mehanizmi u akutnom apendicitisu



uključuju dinamičke promene sa angažovanjem velikog broja imunskih ćelija, poput neutrofila, monocita, tkivnih makrofaga, T-limfocita, i njihovom kompleksnom interakcijom posredovanom brojnim solubilnim proteinskim faktorima, medijatorima poput C-reaktivnog proteina, citokina, hemokina, adhezivnih molekula, proteinaza.

Ovim ispitivanjem su obuhvaćene pojedine celularne i medijatorske varijable iz seruma i peritonealne tečnosti, sa ciljem analize i korelacije lokalnog i sistemskog imunskog odgovora i identifikacije pojedinačnih biomarkera ili biomarkerskih setova, koji bi svojim profilnim prikazom i/ili kumulativnom specifičnošću unapredili laboratorijsku dijagnostiku akutnog apendicitisa kod dece.

Pouzdanost intraoperativne procene u našem ispitivanju iznosila je 73,2%, što je približno do sada publikovanim rezultatima (101). Najveće neslaganje između intraoperativnog i patohistološkog nalaza bilo je prisutno kod dijagnoze perforativnog apendicitisa, gde je intraoperativno postavljena dijagnoza flegmonoznog apendicitisa. Ovakva neusaglašenost nalaza je, u izvesnoj meri i očekivana jer se makroskopski ne mogu uočiti mikroperforacije, koje svrstavaju nalaz u komplikovani oblik bolesti i koje zahtevaju operativno lečenje. Nezavisno od intraoperativnog nalaza, patohistološka analiza predstavlja zlatni standard za postavljanje tačne dijagnoze (102-104). Sa druge strane, nekada postoje i varijacije u proceni intraoperativnog nalaza među operatorima, zbog čega se takođe preporučuje patohistološka analiza (105, 106). Transmuralna inflamacija apendiksa viđena od strane patologa predstavlja pouzdanu dijagnozu akutnog apendicitisa (107).

Incidencija negativne apendektomije je iznosila 15,7%, što je značajno manje od sada publikovanih rezultata, kako na opštoj tako i na pedijatrijskoj populaciji (108, 109). Negativna apendektomija je znatno češća kod ženskog pola na opštoj populaciji. Kod dece je negativna apendektomija češća nego kod odraslih, a kod dece u uzrastu preko 11 godina ponovo češća kod devojčica nego kod dečaka. Diferencijalno dijagnostički, najznačajnije stanje koje imitira akutni apendicitis je mezenterijalna limfadenopatija, kao i procesi na adneksi, uključujući i rupturu folikula (110-112). Otvoreno pitanje kod negativnog intraoperativnog nalaza apendicitisa je da li treba uraditi apendektomiju zbog potencijalnih inflamacija u budućnosti, što je sugestija pojedinih autora (113, 114) ili ostaviti apendiks in situ (115, 116). Neki autori predlažu negativnu apendektomiju samo ukoliko se intraoperativno ne nađe uzrok tegoba (117, 118). Ipak, u takvoj konstelaciji, nedovoljno je

pouzdan makroskopski nalaz normalnog apendiksa i postoji mogućnost neotklanjanja histološki izmenjenog apendiksa (119).

Od rutinskih laboratorijskih nalaza analizirani su neutrofilno-limfocitni odnos, C-reaktivni protein i neutrofilni mijeloperoksidazni indeks.

Neutrofilno-limfocitni odnos (NLR) direktno proizilazi iz diferencijalne krvne slike. Neutrofili u AA igraju važnu ulogu, što se potvrđuje i patohistološkim nalazima. Predstavljaju prvu liniju odbrane protiv invazije stranih agenasa, pre svega bakterija. Imaju sposobnost fagocitoze, sekrecije litičkih enzima i slobodnih radikala sa visokim antimikrobnim potencijalom. Proces aktivacije neutrofila je dvostruk, uslovljen bakterijama i njihovim produktima sa jedne, i citokinskom i hemokinskom stimulacijom sa druge strane. Broj neutrofila u toku zapaljenjskog procesa raste proporcionalno opsegu zapaljenja, mobilizacijom marginalnog pula i aktivacijom kostne srži stimulisane većim brojem citokina, pre svega G-CSF (engl. granulocyte colony stimulating factor) (120). Limfociti su imunokompetentne ćelije koje koordinišu imunski odgovor i asistiraju neutrofilnu aktivnost (121). U gangrenoznoj formi AA moguća je pojava limfopenije, čiji patofiziološki mehanizam nije potpuno razjašnjen (122, 123). Shodno ovim činjenicama, očekivan je porast vrednosti NLR, naročito kod komplikovane forme AA, kao rezultat porasta broja neutrofila i smanjenja broja limfocita.

U sprovedenom ispitivanju, zabeležene su značajne razlike u vrednostima NLR, preoperativnih i uzoraka od prvog i trećeg postoperativnog dana, kako na ukupnom broju pacijenata, tako i unutar svake patohistološke grupe. Na ukupnom broju pacijenata kao i u pojedinačnim patohistološkim grupama, osim u NEAA grupi, pokazan je kontinuirani pad vrednosti NLR, od preoperativnih ka vrednostima od trećeg dana. Povišene vrednosti NLR prvog postoperativnog dana u NEAA grupi mogu biti posledica operativne traume. Najveći pad u vrednostima NLR bio je prisutan kod CAA grupe, što se može objasniti najburnijim zapaljenjskim procesom u ovoj formi bolesti i njegovim slabljenjem nakon hirurške intervencije.

Razlike u vrednostima NLR između patohistoloških grupa bile su naglašenije preoperativno nego prvog i trećeg postoperativnog dana. Najveće razlike su zabeležene između CAA i ostale dve grupe. Ovakav nalaz je najverovatnije povezan sa uznapredovalim zapaljenjskim procesom kod pacijenata CAA grupe, dok se ova razlika smanjivala tokom

prvog i trećeg postoperativnog dana, težeći bazalnim imunobiološkim vrednostima. Prvog i trećeg postoperativnog dana razlika se održava između pacijenata iz CAA grupe i UAA grupe, verovatno zbog dužeg vremena potrebnog za redukciju zapaljenjskog procesa kod pacijenata sa komplikovanom formom bolesti, gde je inflamacija najintenzivnija.

Na ukupnom broju pacijenata, notirana je negativna korelacija između NLR i preoperativnog trajanja simptoma. Unutar grupa, najduže preoperativno trajanje simptoma bilo je prisutno u NEAA grupi, koja je imala najniže vrednosti NLR, dok je najkraće vreme preoperativnog trajanja simptoma bilo prisutno u UAA grupi. Ovo se može objasniti činjenicom da uznapredovale forme AA brže dovode do pune kliničke prezentacije, omogućavajući sigurniju kliničku procenu i bržu odluku o hirurškom lečenju. Sa druge strane, treba uzeti u obzir i vremenski period od pojave simptoma do javljanja lekaru. Ipak, u našem ispitivanju, preoperativno vreme trajanja simptoma u CAA grupi bilo je duže nego u UAA grupi, za razliku od prethodnih ispitivanja u kojima je bilo izjednačeno (101).

Pedijatrijski apendicitis skor (PAS) je po originalnoj publikaciji vrlo pouzdano dijagnostičko sredstvo, uzimajući u obzir podatke o migraciji bola, gubitku apetita, mučnini i povraćanju, osetljivosti desnog donjeg kvadranta trbuha, bolnoj osetljivosti na kašalj, perkusiju i skakanje, febrilnosti, leukocitozi i neutrofiliji (69). Međutim, nakon naknadno sprovedenih ispitivanja, nađena je znatno manja pouzdanost ovog scoring sistema (124-126). Kod pacijenata iz našeg ispitivanja, NLR je pozitivno korelirao sa PAS na ukupnom broju i unutar patohistoloških grupa, osim u CAA grupi. Veći broj parametara koji su obuhvaćeni ovim scoring sistemom su subjektivni i nezahvalni za procenu, naročito u grupi pedijatrijskih pacijenata gde je klinički pregled otežan zbog slabije saradljivosti.

Razgraničavajuće vrednosti NLR između grupa, dobijene ROC analizom (engl. Receiver Operating Characteristic), mogu imati značajnu vrednost u izboru terapijskog pristupa. Razgraničavajuće vrednosti između NEAA i UAA grupe mogu biti dobar indikator za uvođenje antibiotske terapije (127). Ova vrednost je u našem ispitivanju iznosila 5.1, što je značajno veća vrednost od onih dobijenih u drugim istraživanjima kod dece (124, 127), ili na mešovitoj grupi adultnih i pedijatrijskih pacijenata (128, 129). Međutim, specifičnost i senzitivnost sprovedenog testa u našem ispitivanju je bila niska i kvalifikovala test kao nepouzdan. Znatno bolja pouzdanost testa je bila prisutna kod razgraničavajuće vrednosti NLR između UAA i CAA grupe. Ova vrednost bi mogla da predstavlja koristan podatak prilikom odlučivanja za hitnu hiruršku intervenciju i u našem ispitivanju je iznosila 7.49, što je

znatno veća vrednost nego u prethodno sprovedenoj studiji (127). Kombinovanjem pacijenata UAA i CAA grupe dobijena je nova grupa pacijenata sa pozitivnim nalazom apendicitisa, gde je istom statističkom metodom dobijena razgraničavajuća vrednost između negativnog i pozitivnog nalaza za inflamirani apendiks, koja je iznosila 5.1. Ova vrednost je bila podjednaka sa razgraničavajućom vrednosti između NEAA i UAA grupe, pri čemu je pouzdanost testa bila daleko veća, uz ograničavajuću okolnost nesrazmernosti testiranih grupa, tj. manjeg broja pacijenata u NEAA grupi naspram novonastale grupe, dobijene spajanjem UAA i CAA grupe.

C-reaktivni protein (CRP) je protein akutne faze koji se sintetiše od strane hepatocita, dominantno pod uticajem IL-6 iz makrofaga, vaskularnog endotela i T-limfocita (130). Značajan je u procesu vezivanja za mikroorganizme čime oni bivaju obeleženi za fagocitozu od strane makrofaga, koji eksprimiraju receptor za CRP. Porast nivoa CRP u krvi se beleži već od šestog sata nakon tkivnog oštećenja i duplira se svakih osam sati, sa pikom u 36 do 48 sata (131). Poluživot CRP je 4 do 7 sati i održavanje nivoa zavisi od konstantne produkcije (132). Predstavlja pouzdan biomarker za citokinima posredovane procese (133), visoko je senzitivnan za zapaljenjske procese ali ne i dovoljno specifičan da bi ukazao na mesto zapaljenja. U većini pedijatrijskih bolnica, po prethodno datim preporukama (134), CRP je uz leukocitarnu formulu danas standard za laboratorijsko praćenje sumnjivih apendicitisa.

Vrednosti CRP na ukupnom broju pacijenata i po patohistološkim grupama, menjale su se po istom modelu, pokazujući porast prvog postoperativnog dana i pad u trećem postoperativnom danu. Ovakva dinamika se može objasniti kao posledica operacije, obzirom da CRP nespecifično raste i nakon trauma (135).

Razlike između patohistoloških grupa na osnovu vrednosti CRP bile su prisutne u sva tri merenja između UAA i CAA. Ovakav podatak može naročito biti od koristi za diferentovanje nekomplikovane od komplikovane forme apendicitisa odnosno za donošenje odluke o konzervativnom ili hirurškom lečenju apendicitisa i u skladu je sa ranije publikovanim rezultatima (136). Više vrednosti u CAA grupi govore u prilog korelacije nivoa CRP sa stepenom zapaljenja. Međutim, više vrednosti CRP u NEAA nego u UAA grupi kod naših ispitanika se teško mogu objasniti stepenom inflamacije.

Vrednosti CRP su na ukupnom broju pacijenata i u CAA grupi, koja je bila najbrojnija, očekivano korelirale sa PSD, obzirom da je zapaljenjski proces napredovao sa proticanjem vremena i imajući u vidu period neophodan za porast CRP u krvi. Korelacija sa

PAS je bila pozitivna i na ukupnom uzorku i u grupama NEAA i CAA, ponovo u skladu sa poznatim patofiziološkim mehanizmima i elementima PAS.

Razgraničavajuće vrednosti CRP, dobijene ROC analizom, u našem ispitivanju pokazale su umerenu pouzdanost jedino kada je u pitanju bilo odvajanje nekomplikovanih od komplikovanih formi AA, sa optimalnom razgraničavajućom vrednošću od 27.15 mg/l. Kod naših pacijenata, u složenim oblicima bolesti, CRP je imao i višestruko veće vrednosti nego kod neperforativnih oblika, što je u saglasnosti sa rezultatima iz nekih drugih ispitivanja (137). Ovo govori u prilog CRP kao dobrog markera perforacije ali ne i neperforativnih oblika bolesti. Ovakva zapažanja su bila prisutna i u većem broju do sada sprovedenih ispitivanja (138-140). Navedeni podatak dobija na značaju u kontekstu revizije opravdanosti apendektomije u lečenju nekomplikovanih formi AA, tj. davanja prednosti konzervativnoj antibiotskoj terapiji (141). Pouzdanost testa u našem ispitivanju nije mogla biti dostignuta čak ni u razgraničavanju NEAA grupe i grupe dobijene spajanjem pacijenata nekomplikovane i komplikovane forme bolesti u jedinstvenu grupu pozitivnog nalaza AA. Sa druge strane, velikom meta-analizom je utvrđeno da CRP bolje diskriminiše AA kako od broja leukocita tako i od prokalcitonina, iako sva tri biomarkera nisu pokazala dovoljnu senzitivnost (142).

Neutrofilni mijeloperoksidazni indeks (MPXI) je laboratorijski parametar čija je upotreba u dijagnostici AA minimalna. MPXI predstavlja količinu mijeloperoksidaze (MPO) u neutrofilima u odnosu na standardne vrednosti. MPO je enzim koji se sintetise u mijeloblastnom i promijelocitnom stadijumu sazrevanja i deponuje se u primarnim (azurofilnim) granulama neutrofila. Produkcija MPO se smanjuje krajem promijelocitnog i tokom mijelocitnog stadijuma. Aktivirani neutrofili oslobađaju MPO, koja katalizuje sintezu reaktivnih jedinjenja, uključujući i hipohlornu kiselinu, jedno od najpotentnijih baktericidnih jedinjenja neutrofilnog porekla (143). Osim baktericidnih svojstava ovo jedinjenje dovodi i do tkivnog oštećenja (144).

Degranulacijom neutrofila smanjuje se intracelularni sadržaj MPO zbog čega aktivirani neutrofili u zapaljenju imaju niži nivo MPO nego nezrele forme. Količina intracelularne MPO neutrofilne populacije zavisi od dinamike sazrevanja i aktivacije neutrofila tokom inflamatornog odgovora. Tumačenjem vrednosti MPXI, pozitivne vrednosti MPXI označavaju više vrednosti MPO i dominaciju novostvorenih neutrofila, dok negativne vrednosti MPXI označavaju niži nivo MPO i dominaciju aktiviranih i degranuliranih neutrofilnih leukocita (145). Različita klinička stanja menjaju nivo MPXI u zavisnosti od

njihovog uticaja na sintezu i/ili aktivaciju neutrofila. Specifični modeli menjanja MPXI su do sada saopšteni za neka patološka stanja, kao što je porast MPXI u sklopu mijeloidne leukemije (146, 147), megaloblastne anemije (148, 149) i nekih bakterijskih infekcija. MPXI ima niže vrednosti u bakterijskoj sepsi, neizmenjen kod virusnih infekcija i tuberkuloze (150), i koristan nezavisni faktor dijagnoze i praćenja kod ishemičnih srčanih oboljenja (151).

Referentne vrednosti MPXI su kod starije dece slične kao i kod adultne populacije ( $MPXI = 0 \pm 10$ ), dok je u neonatalnom uzrastu MPXI niži. Polno zavisne oscilacije MPXI su takođe publikovane (152). Smatra se da su vrednosti MPXI kod svake individue konstantne u bazalnim uslovima i da minimalne oscilacije MPXI mogu sugerisati različita fiziološka i patofiziološka stanja.

Opadanje vrednosti MPXI tokom tri postoperativna dana u UAA i CAA grupi se može objasniti dodatnom fagocitnom aktivnošću neutrofila i povećanjem oksidativnog stresa tokom ovog perioda, uzrokovanu laparotomijom. Analize MPXI i ostalih parametara u našem ispitivanju nakon trećeg postoperativnog dana nije rađena jer je veći broj pacijenata iz NEAA i UAA grupe bio otpušten na kućni oporavak. Shodno prethodnim ispitivanjima, u daljem toku je očekivan pad oksidativnog stresa (153) pa je bilo moguće pretpostaviti i povećanje vrednosti MPXI. Uticaj anesteziološke tehnike i anestetika na neutrofilnu aktivnost se takođe može razmatrati (154, 155).

Niže vrednosti MPXI kod pacijenata iz UAA grupe su tumačene većim stepenom aktivacije i degranulacije zrelih formi neutrofila. Odsustvo gangrene i perforacije kod ovih pacijenata se može smatrati posledicom efikasnog inflamatornog odgovora kontrolisanim od strane imunskog sistema.

MPXI vrednosti nisu pokazale značajnu korelaciju niti sa dužinom trajanja simptoma niti sa PAS, iako su ove korelacije, uz uvažavanje poznatih patofizioloških mehanizama bile očekivane. Ubrzana maturacija neutrofila može biti odložena u odnosu na inicijalnu degranulaciju na početku inflamatornog procesa kod AA, dok sa druge strane, subjektivnost simptoma, koji čine i veliki deo parametara PAS, predstavljaju ograničenje za ovu vrstu tumačenja. Vrednosti MPXI nisu korelirale čak ni sa laboratorijskim vrednostima iz PAS, kao što su vrednosti leukocita ili udeo neutrofila u leukocitarnoj formuli. Različite vrednosti MPXI kod pacijenata u prvih 24 sata i onih kod kojih je MPXI određivan nakon više od 24

sata od nastanka simptoma, mogu govoriti u prilog veće dijagnostičke vrednosti MPXI kod pacijenata sa rano postavljenom sumnjom na AA.

Umerena pouzdanost testa razgraničavajućih vrednosti MPXI između grupa, dobijena ROC analizom, bila je postignuta jedino između UAA i CAA grupe. Ostale razgraničavajuće vrednosti MPXI bile su nepouzdate.

Pozitivna korelacija između NLR i CRP je u našem ispitivanju nađena prvog i trećeg postoperativnog dana ali ne i preoperativno. Laboratorijski parametri koji uključuju vrednosti neutrofila, kakvi su apsolutni broj, procenat u leukocitnoj formuli i NLR, mogu se smatrati bržim indikatorima AA od CRP zbog njihovog promptnijeg porasta na početku inflamacije i neophodnog vremena za sintezu CRP u jetri (156). Naši rezultati su potvrdili brži porast NLR i odložen porast CRP u pedijatrijskom AA, sugerišući NLR kao biomarker početnih stadijuma AA kod dece i CRP za kasnije faze.

Iako u literaturi nema raspoloživih podataka o korelaciji NLR i MPXI, u skladu sa poznatim mehanizmima inflamacije, mogla je biti očekivana negativna korelacija usled povećanja broja neutrofila i smanjenja azurofilnih granula u neutrofilima usled njihove aktivnosti. Našim testiranjem nije demonstrirana ni pozitivna niti negativna korelacija između ova dva laboratorijska parametra. Moguća razlika u dinamici stvaranja neutrofila i degranulacije postojećih može delimično objasniti ovakav nalaz.

Značajna pozitivna korelacija između MPXI i CRP prisutna u ovom ispitivanju, je u izvesnoj meri neočekivana, imajući u vidu da su pozitivne vrednosti MPXI prisutne kod neutrofila koji nisu angažovani, tj. degranulisani, dok je CRP nedvosmisleno senzitivni indikator zapaljenja. Očekivana je mogla biti negativna korelacija zbog inicijalne neutrofilne degranulacije i porasta CRP. Međutim, ako se u obzir uzme period neophodan za sintezu CRP i influks novostvorenih neutrofila, aktuelni nalaz može biti objašnjen kod pacijenata sa trajanjem simptoma dužim od 24 sata.

Medijatorske varijable obuhvaćene ovim ispitivanjem bile su određene sadržajem komercijalnog kita za protočnu citometriju *Human Inflammation 20 plex BMS 819*. Ovako ispitivani citokinski set, čije su vrednosti praćene i analizirane u peritonealnoj tečnosti i serumu bio je predstavljen sledećim medijatorskim varijablama: faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), faktor stimulacije kolonija granulocita (G-CSF), makrofagni inflamatorni protein 1alfa i 1beta (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), interleukini: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10,

IL-12, IL-13 i IL-17, interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), sE-selektin, intercelularni adhezivni molekul 1 (ICAM-1), interferonski inducibilni protein 10 (IP-10), monocitni hemotaksni protein 1 (MCP-1) i peptid latence (LAP).

Citokini predstavljaju veliku grupu proteina, peptida ili glikoproteina koji deluju kao medijatori imunskog odgovora, zapaljenja i hematopoeze. Za njihovu produkciju mogu biti odgovorne brojne ćelije organizma ali su u imunskom odgovoru za njihovo stvaranje prevashodno zadužene makrofagne ćelije, u sklopu urođenog imunskog odgovora i T-ćelije, u sklopu stečenog imunskog odgovora. Termin citokin je opšti naziv za ove proteine, dok se u zavisnosti od funkcije, načina delovanja, porekla i ćelija na koje deluju, definišu drugi nazivi. Tako su interleukinima označeni citokini koje stvaraju leukociti a koji deluju na druge leukocitne ćelije. Ovakvo tumačenje je danas suviše ograničeno jer mnoge interleukine stvaraju i druge ćelije osim leukocita ili pak oni deluju na druge ćelije koje ne pripadaju leukocitima. Limfokini su citokini koje stvaraju limfociti, monokine stvaraju monociti i makrofagi, dok su hemokinima označeni citokini sa hemotaktnom aktivnošću (157).

Jedna od bitnih karakteristika citokinskih proteina je njihov visok afinitet za odgovarajuće receptore, zbog čega biološke efekte mogu realizovati sa pikomolarnim i nanomolarnim koncentracijama. Njihova aktivnost može biti autokrina, kada deluju na membranske receptore ćelije koja ih je sekretovala; parakrina, kada deluju na ćelije u okruženju; i endokrina, kada deluju na receptore udaljenih ćelija. Stvoreni u odgovoru na antigen, citokini na koordinisan interaktivan način mogu regulisati brojne ćelijske aktivnosti, ispoljavajući svojstva: sinergizam, kada više citokina stimuliše ćeliju na istu aktivnost; antagonizam, kada efekti jednih citokina inhibiraju efekte drugih; pleotropizam, gde citokin ima više bioloških aktivnosti; i redundantnost, gde više citokina ima istu ili sličnu biološku aktivnost (32).

Prema uticaju na zapaljenjski proces, citokini se svrstavaju u proinflamatorne i antiinflamatorne. Proinflamatorni citokini učestvuju u akutnim i hroničnim zapaljenjskim procesima, potencirajući sistemsku inflamaciju, uzrokujući groznicu i tkivna oštećenja. Glavni proinflamatorni citokini su TNF- $\alpha$  i IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-15. Ove citokine sintetišu prevashodno makrofagne ćelije i mogu da započnu kaskadu sekundarnih citokina, uključujući hemokine i faktore rasta. Antiinflamatorni citokini su imunoregulatorni molekuli koji kontrolišu proinflamatorni citokinski odgovor u sadejstvu sa specifičnim citokinskim inhibitorima i solubilnim citokinskim receptorima. Ovde spadaju IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-



13, TGF- $\beta$ , receptorski antagonist IL-1, receptorski antagonist za TNF- $\alpha$ . Ovi citokini mogu da inhibiraju proinflamatorne celularne odgovore i produkciju hemokina (158).

U odnosu na fazu zapaljenja u kojoj dominantno iskazuju svoju aktivnost, citokini se mogu podeliti na citokine akutnog i hroničnog zapaljenja. Citokini koji igraju ključnu ulogu u akutnoj fazi inflamacije, povećavajući perfuziju i vaskularnu permeabilnost, kao i povećanje broja, leukocita, su: IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-11, IL-8, G-CSF i brojni hemokini. Sa druge strane, citokini odgovorni za hroničnu fazu inflamacije se mogu svrstati u one koji učestvuju u humoralnom odgovoru, kao što su: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ; i one koji doprinose celularnom odgovoru, gde spadaju: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (159).

Unutar jedne od prvih i osnovnih podela citokina na citokine urođene i stečene imunosti, dopunska podela citokina stečene imunosti se odnosi na njihovo poreklo u sklopu podele pomoćničkih T-limfocita. Osim citokina porekla Th1 i Th2 podvrsta pomoćničkih T-limfocita, opisuju se i citokini Th17, Th9, T-regulatornih i T-folikularnih limfocita (160,161). Po dosadašnjim istraživanjima, nebalansirani Th1 i Th2 imunski odgovor može predstavljati patofiziološki osnov većeg broja poremećaja (162, 163). Citokini Th1 odgovora, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , su odgovorni za celularni imunitet, dok su citokini Th2 odgovora, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, odgovorni za mehanizme humoralnog imuniteta i antiinflamatorno dejstvo (164-167). Citokini Th17 odgovora su zaduženi za regrutovanje neutrofila i makrofaga i amplifikaciju zapaljenjske reakcije (168,169). Th9 ćelije su nedavno identifikovane, sa dominantnom sekrecijom IL-9 i pretpostavljenim brojnim ulogama u inflamaciji i tkivnom oštećenju (170, 171). T-regulatorni limfociti dominantno sekretuju IL-9, IL-10 i TGF- $\beta$  i imaju važnu ulogu u inhibiranju imunskog odgovora zbog čega su ranije bili označavani kao supresorske ćelije (172). T-folikularne ćelije su specijalizovane T pomoćničke ćelije, smeštene u germinativnim centrima sekundarnih limfnih organa, koje sekrecijom IL-4 i IL-21 ubrzavaju produkciju antitela od strane B ćelija (173).

Merenje nivoa citokina u serumu i drugim telesnim tečnostima, radi dijagnostike i praćenja bolesti, je u porastu u prethodnom periodu. Nivo pojedinih citokina korelira sa aktivnošću i progresijom nekih patoloških stanja, kao što su akutne i hronične inflamatorne bolesti, sepsa, autoimune i maligne bolesti. Mogu se koristiti kao indikatori aktivnosti bolesti, prediktivni faktori ishoda i u svrhu terapijskog monitoringa. Obzirom da citokini realizuju svoje biološke efekte pri vrlo niskim koncentracijama i da je njihov polужivot kratak,

određivanje nivoa citokina zahteva sofisticiran pristup i visoku tehničku opremljenost i obučenosť kadra angažovanog na ovim poslovima. Razvojem naprednih tehnologija, uključujući i protočnu citometriju, uz izbor visoko kvalitetnih komercijalnih kitova, omogućeno je merenje nivoa velikog broja citokina iz vrlo malih uzoraka telesnih tečnosti i za vrlo kratko vreme. Preciznosť i pouzdanosť merenja su zavisni od kvaliteta opreme, kvaliteta korišćenih kitova, iskustva operatera i institucionalnog kvaliteta kontrole (174). Određeni broj ispitivanja koja su uključivala merenje nivoa citokina u cilju preciznije dijagnostike akutnog apendicitisa i terapijskog pristupa je sproveden prevashodno na adultnoj populaciji (175-177). Manji broj ispitivanja ovog tipa je sproveden i na pedijatrijskim pacijentima (178, 179).

Interleukin 1 (IL-1) spada u proinflamatorne citokine akutne faze zapaljenja. Primarno je bio opisan jedan molekul, da bi kasnije bilo otkriveno postojanje dva oblika ovog citokina, IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , koji se vezuju za iste receptore i imaju sličnu biološku funkciju. Ovi citokini promovišu zapaljenjski proces, odgovorni su za indukciju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama, stimulaciju makrofaga i endotela na sintezu hemokina, sintezu proteina akutne faze zapaljenja u jetri i nastanak groznice (180, 181). Osnovni izvor ovih citokina je aktivirana makrofagna ćelija i važan je zbog uticaja na druge ćelije imunskog sistema, T i B ćelije i NK-ćelije i indukuje sintezu TNF- $\alpha$  i IL-6. Osim makrofaga, IL-1 produkuju i neutrofili, endotelne ćelije, eozinofili, bazofili, mastociti, fibroblasti i druge ćelije. Za kontrolu biološke aktivnosti ovih citokina važan faktor predstavlja receptorski antagonist za IL-1 (IL-1Ra), koji se kompetitivno vezuje za receptor i blokira dejstvo ova dva citokina (182, 183). Za razliku od IL-1 $\alpha$ , makrofagi produkuju IL-1 $\beta$  u vidu neaktivne procitokinske forme, koja biva enzimski procesuirana proteolitičkom aktivnošću kaspaze do svoje biološki aktivne forme (184). Našim ispitivanjem nije nađena razlika između preoperativnih i vrednosti serumskih IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  nakon apendektomije, kako na ukupnom broju pacijenata, tako i po patohistološkim grupama. Takođe, nije nađen ni diskriminatorni potencijal ovog citokina za odvajanje stadijuma inflamacije. Obzirom na aktivnosť IL-1 u zapaljenju, razlika vrednosti je bila očekivana, pre svega između uzoraka negativnih i uzoraka razvijenih formi bolesti, što je publikovano nakon ranijih ispitivanja (176). Sa druge strane, vrednosti IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  iz peritoneumske tečnosti su se između grupa razlikovale, značajnije kod vrednosti IL-1 $\beta$ , jasno odvajajući patohistološke grupe.

Interleukin 4 (IL-4) predstavlja antiinflamatorni citokin hronične faze zapaljenja, iz grupe Th2 citokina. Primarna sekrecija IL-4 je vezana za aktivnosť mastocita, bazofila, T-

ćelija, i eozinofila (185, 186). Osnovne biološke funkcije IL-4 su indukcija diferencijacije naivnih T-pomoćničkih ćelija u Th2 ćelijsku subpopulaciju (187), stimulacija diferencijacije B-ćelija u plazmocite koji proizvode IgE (188), supresija diferencijacije T pomoćničkih ćelija u Th1 ćelije i supresija makrofagne aktivnosti i produkcije IFN- $\gamma$ . Aktivirane Th2 ćelije sa IL-4 nastavljaju njegovu produkciju mehanizmom pozitivne povratne sprege. IL-4 predstavlja model antiinflamatornog citokina, po biološkim učincima je sličan IL-13 i ima ključnu ulogu u regulaciji humoralnog imunskog odgovora (189). Kod naših pacijenata, serumske vrednosti IL-4 su se razlikovale po danima kod komplikovane forme bolesti, ali se nisu razlikovale između grupa, dok su se peritoneumske vrednosti razlikovale između patohistoloških grupa, diskriminišući sa visokom pouzdanošću negativnu apendektomiju od komplikovanog apendicitisa. Ovakvi nalazi su samo delimično usaglašeni sa rezultatima prethodnih istraživanja (176).

Interleukin 6 (IL-6) spada u grupu proinflamatornih citokina akutne faze zapaljenja. Sintezu IL-6, kao odgovor na tkivno oštećenje, inflamaciju ali i stimulisane IL-1 i TNF- $\alpha$ , vrše brojne imunske i neimunske ćelije, kao što su makrofagi, endotelne ćelije, fibroblasti, T-ćelije (190). Svojim biološkim učincima učestvuje i u urođenoj i u stečenoj imunosti, stimulišući hepatocite na sintezu proteina akutne faze, stimulišući B-ćelije na produkciju antitela, promovišući sazrevanje T-limfocita (191). IL-6 prolaskom kroz hematoencefaličnu barijeru utiče na hipotalamusnu regulaciju telesne temperature, dovodeći do groznice. Svojim delovanjem na kostnu srž pojačava maturaciju megakariocita (192). Iako biva produkovan pod njihovim dejstvom, IL-6 potiskuje stvaranje TNF- $\alpha$  i IL-1. Uticajem na oslobađanje adenokortikotropnog hormona utiče na steroidnu regulaciju zapaljenjske reakcije. Ovim svojim delovanjima IL-6 spada i u grupu antiinflamatornih citokina (193). Serumske i peritoneumske vrednosti IL-6 su se u našem ispitivanju ponašale slično vrednostima IL-4, značajno se razlikujući u serumu po danima i sa značajnim razlikovanjem između patohistoloških grupa pacijenata u peritoneumskim uzorcima. Razlikovanje između grupa po serumskim vrednostima ovog citokina u našem ispitivanju, nije bilo moguće. Rezultati nekih prethodnih ispitivanja su bili drugačiji demonstrirajući različite serumske vrednosti IL-6 kod neperforativnog i perforativnog apendicitisa (7).

Interleukin 8 (IL-8) spada u hemokine koga, pod uticajem IL-1 i TNF- $\alpha$ , dominantno stvaraju aktivirani makrofagi, ali i druge ćelije kao što su fibroblasti, endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije disajnih puteva, neutrofilii. Važan je citokin urođene imunosti (194). Opisane

su mu dve osnovne biološke funkcije. Ispoljava hemotaksnu aktivnost, privlačeći, pre svega neutrofile, ali i druge granulocite na mesto infekcije (195). Druga biološka funkcija se ogleda u indukciji fagocitoze na mestu infekcije. Zbog svoje osnovne funkcije poznat je i pod nazivom neutrofilni hemotaksni faktor. Smatra se da inhibira oslobađanje histamina i antagonizuje produkciju IgE (196). U sprovedenom ispitivanju, serumske vrednosti IL-8 nisu pokazale značajnost niti u pogledu razlike po danima niti u diskriminaciji patohistoloških grupa, dok je razlikovanje grupa bilo jasno tumačenjem peritonealnih vrednosti. Obzirom na hemokinsku funkciju ovog citokina, dominantno lokalni odraz ovog citokina je donekle očekivani nalaz. Značajno veće koncentracije IL-8 u peritonealnoj tečnosti kod komplikovane forme apendicitisa su potvrđene i prethodno sprovedenim ispitivanjima (197).

Interleukin-10 (IL-10) pripada grupi antiinflamatornih citokina hronične faze zapaljenja, iz grupe Th2 citokina. Ovaj citokin stvaraju prevashodno aktivirani makrofagi, Th2 ćelije, antigen-prezentujuće ćelije, B-ćelije i mastociti. Njegova aktivnost se ogleda u smanjenju antigen-prezentujućeg kapaciteta antigen-prezentujućih ćelija, inhibiranju Th1 odgovora, smanjivanju MHC-II antigenske ekspresije i kostimulacionih molekula makrofagnih ćelija. Sa druge strane, IL-10 potencira Th2 odgovor, pojačavajući proliferaciju B-ćelija i sintezu antitela (198). Kod naših pacijenata, serumske vrednosti IL-10 se nisu razlikovale po danima ni na ukupnom uzorku, niti po grupama, iako se, po biološkoj funkciji, očekivao sličan nalaz sa IL-4. Međutim, IL-10 je jedan od retkih citokina u našem ispitivanju čije su serumske vrednosti diskriminisale patohistološke grupe. Serumske vrednosti IL-10 su preoperativno i trećeg postoperativnog dana, jasno odvajale nekomplikovanu od komplikovane forme akutnog apendicitisa. Peritoneumske vrednosti ovog citokina su takođe odvajale negativne apendektomije i nekomplikovani od komplikovanog apendicitisa. Povišene vrednosti IL-10 u grupi komplikovanog apendicitisa su nađene i u ranijim ispitivanjima (7).

Interleukin 12 (IL-12, još označavan i sa IL-12p70) predstavlja proinflamatorni citokin hronične faze zapaljenja koga stvaraju aktivirani makrofagi i dendritske ćelije u odgovoru na bakterijske produkte, intracelularne parazite ili usled interakcije sa aktiviranom T-ćelijom. Važan je medijator odgovora urođene imunosti na intracelularne mikrobe i induktor celularnog imunskog odgovora na njih (199, 200). IL-12 aktivira NK-ćelije, pokreće produkciju IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  od strane NK-ćelija i T-ćelija, podstiče njihovu citolitičku aktivnost i pokreće razvoj Th1 ćelija. Smatra se da ima esencijalnu ulogu u diferencijaciji,

proliferaciji i održavanju Th1 odgovora koji vodi produkciji IFN- $\gamma$  i IL-2, koji nadalje promovišu T-ćelijske odgovore i makrofagnu aktivaciju (201, 202). Putem stimulacije ćelija na sekreciju IFN- $\gamma$ , IL-12 indukuje proizvodnju hemokina IP-10, koji ima hemoatraktivni i antiangiogenetski efekat. Vrednosti IL-12 su kod naših uzoraka pokazale slične odnose kao IL-6 i IL-4, uz nešto manje diskriminatorne značajnosti između patohistoloških grupa preko peritonealnih vrednosti.

Interleukin 13 (IL-13), slično IL-4, predstavlja antiinflamatorni citokin hronične faze zapaljenja, iz grupe Th2 citokina. Biološke funkcije ova dva citokina se u velikoj meri preklapaju. Sekreciju IL-13 prevashodno vrše Th2 ćelije i eozinofili, indukujući stvaranje IgE od strane aktiviranih B-ćelija i inhibirajući makrofagnu aktivaciju, inflamaciju i Th1 odgovor (203, 204). Smatra se da je IL-13 pre svega odgovoran za alergijske reakcije i borbu protiv parazita gastrointestinalnog trakta, gde ne predstavlja esencijalni limfoidni citokin, već molekularnu vezu između alergijskih i neimunskih ćelija. IL-13 pozitivno reguliše sopstvenu produkciju od strane Th2 ćelija, utiče na hematopoezu i mukusnu hipersekciju u crevima (205). Za razliku od drugih ispitivanih antiinflamatornih citokina (IL-4 i IL-10), serumske vrednosti IL-13 nisu pokazale značajne razlike niti između vrednosti po danima niti po pitanju odvajanja patohistoloških grupa. Na osnovu peritoneumskih vrednosti ovog citokina, komplikovana forma apendicitisa je mogla biti odvojena od nekomplikovane forme i negativne apendektomije.

Interleukin 17 (IL-17) predstavlja proinflamatorni citokin koga stvara posebna vrsta T-pomoćničkih ćelija, po tome i nazvana Th17 ćelija (206, 207). Uloga ove ćelije je, pre svega u odbrani domaćina od ekstracelularnih patogena a sintezu IL-17 vrši indukovana sa IL-23. IL-17 je potentni medijator odloženog tipa hipersenzitivne reakcije, indukuje produkciju velikog broja citokina i hemokina (IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1) od strane brojnih ćelija (makrofagi, epitelne i endotelne ćelije, fibroblasti), dovodeći do mobilizacije neutrofila i monocita. Na ovaj način, regrutovani neutrofil i monociti pojačano infiltrišu afecirana tkiva, potencirajući zapaljenjsku reakciju, remodelaciju i tkivno oštećenje (208-210). Kod naših pacijenata IL-17 se po serumskim vrednostima razlikovao preoperativno i prvog i trećeg postoperativnog dana bez mogućnosti da diskriminiše patohistološke grupe. Peritoneumske vrednosti su sa visokom značajnošću odvajale sve tri patohistološke grupe međusobno. U prethodno sprovedenim ispitivanjima,

ovaj citokin je prikazan kao značajan medijator za prepoznavanje gangrenozne forme apendicitisa (43).

Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) je moćan proinflamatorni citokin akutne faze, važan za regulaciju imunskih ćelija, kako urođenog tako i stečenog imuniteta. Stvaraju ga uglavnom aktivirani makrofagi ali i pomoćničke T-ćelije, neutrofili, mastociti, NK-ćelije, eozinofili, fibroblasti. Njegov biološki uticaj se ispoljava aktivacijom neutrofila i monocita na mestu infekcije i njihovom stimulacijom ka eliminaciji mikroorganizama (211-213). Podstiče sopstvenu produkciju, kao i produkciju drugih citokina i hemokina, poput IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF. Stimuliše ekspresiju MHC I klase i endotelne ćelije da ispolje adhezivne molekule. Potencira stvaranje proteina akutne faze u hepatocitima, dok sistemskim uticajem dovodi do pojave groznice, gubitka apetita, supresije kostne srži i depresije miokardne funkcije. U teškim infekcijama se stvara u velikim količinama i može dovesti do DIK i septičnog šoka (214). Na našem uzorku, vrednosti TNF- $\alpha$  u serumu su pokazale značajnu razliku po danima ali ne i između patohistoloških grupa, što je potvrdilo nalaze prethodnog ispitivanja (215). Ovaj citokin je bio pouzdan u odvajanju patohistoloških grupa prema peritoneumskim vrednostima.

Faktor stimulacije kolonija granulocita (G-CSF) je citokin akutne faze zapaljenja koga stvaraju aktivirane T-ćelije, makrofagi i endotelne ćelije na mestu infekcije. Po svom delovanju se može svrstati u proinflamatorne citokine a njegova biološka funkcija je stimulacija stvaranja neutrofila u kostnoj srži i usmeravanje njihove migracije na mesto zapaljenja (216). G-CSF osim stimulišućeg dejstva na proliferaciju i diferencijaciju neutrofila, utiče i na pojačavanje njihove efektorske funkcije, fagocitne aktivnosti pre svega, produkcije reaktivnih kiseoničnih radikala i antitelo-zavisne citotoksičnosti. U isto vreme utiče i na produžavanje njihovog preživaljavanja u zapaljenjskom žarištu, kao i na proliferaciju endotelnih ćelija na mestu zapaljenja (217, 218). U našem ispitivanju, vrednosti G-CSF su pokazale diskriminatornu ulogu samo kada je u pitanju lokalni odgovor, tj. peritonealni uzorci, gde je jasno odvajao komplikovanu formu apendicitisa od nekomplikovane forme i negativne apendektomije. Sistemski nivo ovog citokina se nije razlikovao niti po danima niti po patohistološkim grupama, sugerišući različitu regulaciju lokalnog odgovora. Ovakav nalaz nije bio saglasan sa podacima nekih prethodnih ispitivanja (218).

Makrofagni inflamatorni protein 1 (MIP-1) pripada familiji hemokina grupe CC, kome su opisane dve molekulske i funkcionalne forme, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ . Obe forme proizvode prevažno makrofagne ćelije aktivirane bakterijskim endotoksinima i imaju ključnu ulogu u imunskom odgovoru na infekciju (219). Proinflamatorna uloga ovih citokina se ogleda u aktivaciji granulocitnih ćelija i indukciji sinteze drugih proinflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ . MIP-1 $\alpha$  utiče hemoatraktivno prevažno na polimorfonukleare dok MIP-1 $\beta$  deluje privlačeci NK-ćelije i monocite na mesto infekcije (220, 221). U našem ispitivanju, vrednosti MIP-1 $\alpha$  su bile diskriminatorne za patohistološke grupe i u serumu, gde su odvajale komplikovani i nekomplikovani apendicitis preoperativno i trećeg postoperativnog dana, i u peritoneumu, gde su odvajale komplikovani od nekomplikovanog apendicitisa i negativne apendektomije. Na osnovu vrednosti MIP-1 $\beta$  u peritoneumu, takođe su mogle biti odvojene patohistološke grupe komplikovanog od nekomplikovanog apendicitisa i negativne apendektomije. Serumske vrednosti MIP-1 $\beta$  po danima su bile različite samo u grupi komplikovanog apendicitisa, dok za MIP-1 $\alpha$  nisu zabeležene.

Monocitni hemotaksni protein 1 (MCP-1) pripada hemokinima grupe CC i proizveden je od strane brojnih ćelija: monocita, makrofaga, dendritskih, epitelnih, endotelnih, glatkomišićnih ćelija. Predstavlja ključni molekularni faktor za migraciju monocita i makrofaga na mesto tkivnog oštećenja i inflamacije. Pored ovog proinflamatornog delovanja, za razliku od drugih CC hemokina, MCP-1 pokazuje i aktivnost u promociji Th2 odgovora i smatra se važnim molekularnim faktorom u formiranju granulomatoznog tipa zapaljenja (222, 223). Kod naših pacijenata, serumske vrednosti MCP-1 su se razlikovale po danima, dok značajne razlike u vrednostima između grupa nisu nađene u serumu ali jesu u peritonealnoj tečnosti. Serumske vrednosti MCP-1 nisu imale razgraničavajuće karakteristike ni u prethodno sprovedenoj studiji u kojoj je MCP-1 zajedno sa drugim citokinima testiran za razlikovanje akutnog apendicitisa i mezenterijalnog limfadenitisa (224).

Interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) je citokin koji pripada interferonima tipa I, gde je svrstan veći broj strukturno bliskih proteina koji imaju snažno antivirusno dejstvo. Osnovni izvor IFN- $\alpha$  jesu mononuklearni fagociti, ali se smatra da mnoge ćelije stimulirane virusom mogu sekretovati ovu grupu citokina. Biološka aktivnost interferona tipa I se ogleda u inhibiciji virusne replikacije, povećanju ekspresije MHC I klase na ćelijama inficiranim virusima, povećanju citotoksične aktivnosti NK-ćelija i potenciranju Th1 odgovora (225). Osim proinflamatornog dejstva, smatra se da IFN- $\alpha$  pokazuje i antiinflamatornu i imunosupresivnu

aktivnost, koja prati viremiju (226, 227). Serumske vrednosti IFN- $\alpha$  su u našem ispitivanju bile različite u grupi komplikovanog apendicitisa, dok su peritoneumske vrednosti odvajale komplikovani od nekomplikovanog apendicitisa i negativne apendektomije. Serumske vrednosti ovog citokina nisu diferencirale patohistološke grupe. U literaturi se ne evidentiraju ispitivanja IFN- $\alpha$  sa ciljem razlikovanja stepena apendicitisa. Publikovana studija u kojoj je ispitivan nivo IFN- $\alpha$  kod dece sa bolom u desnoj ilijačnoj jami je pokazala znatno veći serumski nivo ovog citokina kod dece sa mezenterijalnim limfadenitisom nego kod pacijenata sa akutnim apendicitisom (228).

Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), ranije označavan kao interferon tip II, predstavlja citokin koga sekretuju samo T-ćelije i NK-ćelije. Njegova osnovna uloga je aktivacija makrofaga u reakcijama urođene i stečene imunosti. Smatra se da je njegova aktivnost od ključnog značaja u borbi protiv virusnih, nekih bakterijskih i protozoalnih infekcija (229). Uprkos umerenoj direktnoj antivirusnoj aktivnosti, on snažno potencira dejstvo ostalih interferonskih molekula. Jedini je interferonski citokin koji snažno potencira ekspresiju MHC II klase, zbog čega potencirajući antigensku prezentaciju od strane antigen-prezentujućih ćelija, osnažuje celularni imunski odgovor (230). Kod naših pacijenata, samo su peritoneumske vrednosti IFN- $\gamma$  diferencirale komplikovanu od nekomplikovane forme bolesti i negativne apendektomije, dok kod serumskih vrednosti ovog citokina nisu zabeležene razlike koje bi diferencirale dane ili patohistološke grupe. U ispitivanju adhezivnih molekula, IL-10 i IFN- $\gamma$  u akutnom apendicitisu, autori su prezentovali značajno veću koncentraciju IFN- $\gamma$  kod gangrenozne forme apendicitisa (231).

E-selektin pripada ćelijskim adhezivnim molekulima koji, kao i drugi selektini, ima važnu ulogu u nastanku inflamacije. Ovaj molekul biva tokom zapaljenja eksprimiran od strane endotelnih ćelija pod dejstvom IL-1 i TNF- $\alpha$  iz oštećenih ćelija. Leukociti iz krvnih sudova, aktivirani hemokinima, se vezuju za E-selektin i prelaze u tkivo gde ispoljavaju svoju funkciju (232). Merenje vrednosti serumskog E-selektina može biti od kliničkog značaja u praćenju pojedinih patoloških procesa (233, 234). U našem ispitivanju, vrednosti solubilnog E-selektina u serumu nisu diskriminisale niti dane niti patohistološke grupe. Vrednosti iz uzoraka peritonealne tečnosti su odvajale komplikovanu formu apendicitisa od ostale dve grupe. Patohistološka ispitivanja zastupljenosti E-selektina kod graničnih formi apendicitisa su pokazala da ovaj molekul biva ispoljen na endotelu već u prvih šest sati od početka zapaljenja (235). Merenja solubilne frakcije ovog adhezivnog molekula u akutnom apendicitisu kod dece nisu do sada objavljivana.



Intercelularni adhezivni molekul 1 (ICAM-1) predstavlja transmembranski protein endotelnih ćelija i leukocita koji je važan u stabilizaciji međucelijske interakcije i transendotelnoj migraciji leukocita. Povećana ekspresija ovog molekula se javlja pod dejstvom proinflamatornih citokina, pre svega IL-1 i TNF- $\alpha$  (236, 237). Cirkulišuća forma ovog molekula može biti značajna za praćenje pojedinih imunskih dešavanja u organizmu (238). U našem ispitivanju, peritoneumske vrednosti solubilnog ICAM-1 su diskriminisale komplikovani apendicitis od ostale dve grupe, dok su serumske vrednosti bile nepouzdana za diferencijaciju i vremena uzorkovanja i grupa. Prethodno sprovedena ispitivanja potvrđuju pojačanu ekspresiju ovog proteina kod apendicitisa (231).

Interferonom inducibilni protein 10 (IP-10) spada u hemokine grupe CXC. Sekretuje ga veći broj ćelija stimulisanih IFN- $\gamma$ , gde spadaju monociti, fibroblasti i endotelne ćelije. Biološka funkcija IP-10 se ogleda u privlačenju mononuklearnih fagocita, NK-ćelija, T-ćelija, promociji Th1 odgovora (239, 240). Merenje koncentracije ovog molekula u serumu može biti od značaja u praćenju pojedinih imunskih procesa (241). Serumske vrednosti ovog hemokina u našem ispitivanju su diskriminisale dane i patohistološke grupe. Sa druge strane, ovo je jedini medijator u našem ispitivanju čije peritoneumske vrednosti nisu odvajale patohistološke grupe. U raspoloživoj literaturi nisu zabeleženi radovi na ispitivanju ovog hemokina kod pedijatrijskih pacijenata sa akutnim apendicitisom. Obzirom na njegovu inducibilnost sa IFN- $\gamma$ , koji igra važnu ulogu u inflamaciji, značajni diskriminišući potencijal IP-10 u našem ispitivanju je svakako mogao biti očekivan. Tumačenja vrednosti ovog hemokina kod akutnog apendicitisa nisu pronađena u raspoloživoj literaturi.

Peptid latence (LAP) predstavlja mali molekul koji se zajedno sa latentnim TGF- $\beta$  vezujućim proteinom (LTBP), vezuje za TGF- $\beta$ , formirajući latentni kompleks. Tokom zapaljenjskog procesa, aktivacijom brojnih ćelija, pre svega makrofaga, dolazi do oslobađanja proteinaza koje odvajajući ove molekule aktiviraju TGF- $\beta$  (242). Obzirom na bitnu imunoregulatornu funkciju TGF- $\beta$ , praćenje nivoa LAP u serumu može biti od značaja u brojnim imunskim dešavanjima (243). U našem ispitivanju, koncentracije ovog molekula u serumu nisu diskriminisale niti dane niti patohistološke grupe, dok su peritoneumske vrednosti odvajale grupu komplikovanog apendicitisa od ostale dve grupe. U pretraženim publikacijama, analiza LAP u kontekstu akutnog apendicitisa nije opisana.

U literaturi se sreću rezultati određenog broja sprovedenih ispitivanja citokina kod pacijenata sa akutnim apendicitisom, kako adultne tako i pedijatrijske populacije. Slično

našem ispitivanju, ove studije su imale za cilj potencijalno prepoznavanje biomarkerske funkcije citokina u cilju diferencijacije stepena zapaljenja, odnosno prisustva ili odsustva upalnog procesa na apendiksu. Obzirom na veliki broj cirkulišućih citokina u akutnom apendicitisu, može se očekivati prisustvo diskriminišuće razlike koncentracija nekog od ovih molekula za stadijume akutnog apendicitisa. Klinički značaj identifikacije medijatora sa ovakvim svojstvom bio bi višestruk, počevši od smanjenja broja negativnih apendektomija, preko pouzdanije procene načina lečenja, izbora antibiotske terapije i hirurške tehnike, hitnosti operacije, do planiranja dužine oporavka i zauzetosti bolničkih kapaciteta. U do sada sprovedenim ispitivanjima, nije nađen biomarker niti biomarkerski set sa ovakvim karakteristikama (58). Takođe, ni jedna od do sada sprovedenih studija nije testirala uzorke sa velikim citokinskim setom od 20 različitih citokina, kakav je Human Inflammation 20 plex BMS 81, koji je bio izbor za naše ispitivanje.

Imunski odgovor u akutnom apendicitisu, slično drugim zapaljenjskim bolestima, je određen T-pomoćničkim ćelijama, odnosno vrstom odgovora koja se razvija u zavisnosti od dominantne linije T-pomoćničkih ćelija (244). Th1 ćelije uz pomoć proinflamatornih citokina, IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\beta$ , aktiviraju makrofage i citotoksične ćelije, promovišući celularni imunski odgovor. Th2 ćelije, uz pomoć antiinflamatornih citokina, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, dovode do aktivacije mastocita, bazofila i eozinofila, razvijajući humoralni imuni odgovor (245-249). Th17 ćelije, uz pomoć IL-17, po kome su i identifikovane, pojačavaju zapaljenjski proces, dodatnom regrutacijom neutrofila i makrofaga (250, 251). Imunski odgovori u različitim patološkim stanjima, se najčešće ne manifestuju striktnim Th1 ili Th2 modelom odgovora, već balansom ili dominacijom jednog od ova dva modela. Antagonistički odnos biološkog dejstva citokina ova dva modela, predstavlja ključni faktor u regulaciji imunskog odgovora i ishodu patološkog procesa. Tako neki autori iznose hipotezu o nekontrolisanom Th1 odgovoru kod komplikovane forme akutnog apendicitisa i balansiranom Th1/Th2 odgovoru kod nekomplikovane forme (252).

Uzorci za analizu serumskih koncentracija citokina su u našem ispitivanju uzimani preoperativno, prvog i trećeg postoperativnog dana. Različite vrednosti serumskih citokina po danima pokazuju kretanje citokinskih nivoa od momenta neposredno pre hirurškog zahvata do trećeg dana oporavka. Tokom ovog perioda je očekivan pad vrednosti citokinskih koncentracija usled sanacije izvora zapaljenja. U slučaju nekomplikovanog apendicitisa, proces je ograničen na sam apendiks u vidu flegmonozno izmenjenog tkiva i apendektomijom biva kompletno ekskludiran. Kod komplikovanog apendicitisa postoji, u manjoj ili većoj meri

i značajan nadražaj peritoneuma, koji burno reaguje širenjem zapaljenja, sa posledičnim porastom nivoa citokina. Kod starije dece, kao i kod odraslih, perforirani apendiks može biti zatvoren omentumom, što delimično smanjuje širenje infekcije i zapaljenjskog procesa, dok se ovo ne dešava kod mlađe dece, gde je omentum još uvek slabo razvijen. Tako se kod nekomplikovane forme apendicitisa očekuje brži pad vrednosti citokina i brži oporavak, dok je kod komplikovane forme oporavak duži uz moguće komplikacije stvaranja priraslica nakon peritonitisa, opet u zavisnosti od regulacije imunskog odgovora na peritoneumu i potencijala za fibroziranje. U našem ispitivanju, razlike između koncentracija citokina po danima su bile prisutne na ukupnom uzorku i u grupi komplikovanog apendicitisa.

U grupi normalnog i ranog apendicitisa ovakva razlika nije evidentirana. Ova grupa je bila predstavljena pacijentima bez upalnog procesa na apendiksu ili sa leukocitima viđenim na patohistološkom pregledu, samo u sluznici. Ovim se može objasniti nepostojanje sistemskog citokinskog oscilovanja. Kod većine pacijenata iz ove grupe zabeležene su niske vrednosti svih merenih citokina, iako su kod manjeg broja bile prisutne i više vrednosti. Kod njih je intraoperativno najčešće bio prisutan nalaz mezenterijalnog limfadenitisa sa kojim je mogao biti povezan porast vrednosti citokina u serumu. Pokušaji kliničkog i laboratorijskog razlikovanja akutnog apendicitisa i akutnog mezenterijalnog limfadenitisa, koji je jedan od najznačajnijih diferencijalno dijagnostičkih entiteta za akutni apendicitis, su u literaturi opisani (253). Autori publikovanih ispitivanja su od analiziranih citokina, istakli mogući značaj IL-6 u diferencijalnoj dijagnozi ova dva, po kliničkom ispoljavanju vrlo slična i česta oboljenja, predlažući i apsolutnu razgraničavajuću vrednost serumske koncentracije IL-6 (179).

Kod nekomplikovanog apendicitisa, kao što je već izneto, zbog potpunog uklanjanja strukture zahvaćene zapaljenjem a imajući u vidu kratak poluživot citokina u serumu, brzi pad nivoa citokina u serumu je bio očekivani nalaz. Međutim, kod naših pacijenata sa nalazom nekomplikovanog apendicitisa, nije bilo značajne razlike u koncentracijama merenih citokina po danima, sa izuzetkom IP-10 molekula. Nepostojanje razlika se može objasniti nedovoljnom refleksijom lokalnih inflamatornih zbivanja na sistemski nivo. Kako su vrednosti peritoneumskih citokina određivani samo na dan intervencije, zbog dostupnosti peritoneumskoj tečnosti po otvaranju trbuha za apendektomiju, ovakve analize lokalnih promena u nivou citokina, kasnije nisu mogle biti sprovedene bez dodatnih invazivnih postupaka. Vrlo je verovatno, na osnovu diferenciranja patohistoloških grupa po peritoneumskim nivoima pojedinih citokina, da su i razlike po danima u nivou citokina

mnogo jasnije na lokalnom nalazu. Nalaz IP-10, koji je u serumu UAA grupe razgraničavao prvi od trećeg postoperativnog dana, neočekivano je bio viši trećeg nego prvog postoperativnog dana, nakon statistički neznačajnog pada preoperativnih vrednosti. Obzirom da se ovaj hemokin oslobađa iz ćelija pod uticajem IFN- $\gamma$ , jednog od glavnih proinflamatornih citokina, povišeni nivo trećeg postoperativnog dana nije mogao biti objašnjen sanacijom lokalnog upalnog procesa.

Citokini, čija se koncentracija razlikovala po danima kod pacijenata sa komplikovanim apendicitisom, su bili slični kao i kod ukupnog broja pacijenata. Ovakva podudarnost je delimično objašnjiva najvećim brojem pacijenata u ovoj grupi. IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IP-10 i MCP-1 su imali sličnu dinamiku menjanja koncentracija i na ukupnom broju i u CAA grupi pacijenata. Od njih je sa najvećom statističkom značajnošću, preoperativni i nivo u dva postoperativna dana, kao i dva postoperativna nivoa međusobno, diferencirao IL-6. Ovaj citokin je u isto vreme bio i jedini koji je pokazao kontinuirani pad preoperativnih vrednosti u serumu. Značaj IL-6 u dijagnostici i praćenju akutnog apendicitisa je prikazan u većem broju publikacija (254-256). Zanimljivo je da je većina ostalih citokina nakon pada serumskih koncentracija u prvom postoperativnom danu, kao i IP-10 u UAA grupi, pokazala porast koncentracija trećeg postoperativnog dana. To bi donekle moglo biti objašnjeno u slučaju antiinflamatornih citokina i moguće njihove dominacije tokom sanacije zapaljenjskog procesa. Međutim, ovakav nalaz je teško objasniti u slučaju citokina akutnog zapaljenja. Citokin koji se po diferenciranju dana nije poklapao na ukupnom uzorku i u CAA grupi je IL-17, koji je odvajao prvi od trećeg postoperativnog dana na ukupnom broju pacijenata ali ne i po grupama, upućujući na Th17 odgovor u akutnom apendicitisu. Teorija dominacije Th1 odgovora pojačanog Th17 odgovorom kod gangrenoznog apendicitisa, ranije je već publikovana (43). IFN- $\alpha$  i MIP-1 $\beta$  su pokazali značajne razlike u koncentracijama po danima u CAA grupi ali ne i na ukupnom uzorku. Ovi podaci mogu sugerisati aktivnost mononuklearnih fagocita u fazi rezolucije gangrenoznog i perforativnog oblika bolesti.

Diskriminacija patohistoloških grupa na osnovu koncentracija citokina u serumu je u našem ispitivanju bila slabo izražena. Preoperativno razlikovanje stadijuma bolesti na osnovu serumskih citokina bi bilo od neprocenjive vrednosti u kliničkom radu. Upravo bi ovakva mogućnost, uz objektivni klinički pregled i standardnu laboratorijsku i ultrazvučnu dijagnostiku, kliničarima pružila dodatnu sigurnost u proceni i odlučivanju o terapijskom pristupu kod sumnjivog akutnog apendicitisa. Ovo je razlog zbog čega se već duže vreme insistira na ovakvim ispitivanjima (7, 191, 257-259). Naravno, ukoliko bi bili pronađeni

pouzdanosti citokinskih biomarkera, dodatni napor bi bio neophodan za pojednostavljivanje laboratorijskih testova njihovog bržeg i jeftinijeg određivanja u serumu.

Jedna od prethodnih studija je ispitala pet citokinskih molekula, uključujući proinflammatorne IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8, IL-2 i antiinflammatorni IL-10. Rezultati su ukazali na značaj IL-6 i IL-8 u diferenciranju perforativnog od neperforativnog apendicitisa (7). Iako su kod naših pacijenata ovi citokini, naročito u CAA grupi imali povišen nivo, diskriminatorni potencijal kao u navedenoj studiji nije nađen. U jednom drugom ispitivanju, osim značaja IL-6 u diferenciranju perforativnog od neperforativnog apendicitisa, akcentovana je i moguća pouzdanost IL-10 (259). Ovakav nalaz je potvrdio zaključke studija koje su prethodile ovom ispitivanju (35, 256, 260, 261). Navedeno ispitivanje je, za razliku od našeg, obuhvatalo starosno mešovitu grupu pacijenata, od 15 do 85 godina. U našem ispitivanju, IL-10 je jedini od ispitivanih interleukina koji je, takođe odvajao neperforativnu od perforativne grupe apendicitisa. Naime, preoperativne serumske koncentracije IL-10 su kod naših pacijenata bile značajno više u CAA nego u UAA grupi. Ovo govori u prilog pojačane Th2 aktivnosti kod razvijenijih formi bolesti. Pored IL-10, preoperativno smo zabeležili i različite vrednosti između formiranih patohistoloških grupa za MIP-1 $\alpha$  i IP-10. Ovakav nalaz do sada nije publikovan. Nivoi MIP-1 $\alpha$  su se razlikovali na sličan način, između UAA i CAA grupe, kao i nivoi IL-10. Ovaj hemokin zauzima značajno mesto u privlačenju i aktivaciji granulocita i njegova koncentracija je očekivano veća u uznapredovalim inflamatornim procesima. Nasuprot tome, koncentracije IP-10 su jasno razdvajale grupu negativne apendektomije i ranog apendicitisa od nekomplikovanog i komplikovanog apendicitisa ali ne i grupe nekomplikovanog i komplikovanog apendicitisa međusobno. Aktivnost IP-10 u zapaljenju je u direktnoj korelaciji sa Th1 odgovorom i lučenjem IFN- $\gamma$ . Ukoliko bi ovakva pouzdanost bila potvrđena konfirmativnim studijama sa većim brojem pacijenata, ovaj trojni biomarkerski set sastavljen od jednog antiinflammatornog citokina i dva hemokinska molekula, bi mogao biti od velike koristi. Uz ostale nalaze, IP-10 bi isključivao akutni apendicitis, dok bi IL-10 i MIP-1 $\alpha$  diferencirali nekomplikovanu od komplikovane forme bolesti. Iako su razgraničavajuće vrednosti koncentracija ovih citokina u krvi, dobijeni u našem ispitivanju ROC analizom, bili kvalifikovani kao testovi slabe pouzdanosti, ispitivanja sa većim brojem pacijenata i brojačano uniformnijim grupama bi mogla da daju bolju pouzdanost.

Postoperativno praćenje citokinskih koncentracija u serumu pacijenata operisanih od akutnog apendicitisa bi moglo da služi kao monitoring oporavka i razvoja komplikacija. U literaturi se sreće mali broj ovakvih ispitivanja. Jedan od prethodno objavljenih radova je

prezentovao rezultate ispitivanja u Švedskoj na 21-om pacijentu sa otvorenom apendektomijom, kod kojih je uzorkovanje seruma rađeno 1, 2, 6, 10 i 30 postoperativnog dana, sa ciljem analiziranja leukocitarne formule, C-reaktivnog proteina, IL-6 i nivoa leukocitne elastaze (262). Rezultati ovog ispitivanja su ukazivali na pouzdanu procenu razvoja komplikacija na osnovu praćenja leukocita, CRP i IL-6. U našem ispitivanju nije bilo velikog broja postoperativnih komplikacija, zbog čega testiranja u ovom smeru nisu ni bila sprovedena. Prolongirane hospitalizacije su obično bile indikovane usled dužih postoperativnih febrilnosti, održavanja laboratorijskih parametara ili virusnih infekcija tokom postoperativnog boravka u bolnici, kao i usled prisustva intraoperativno postavljenog abdominalnog drena. Jedini citokinski parametar praćenja iz našeg ispitivanja koji je prvog postoperativnog dana razgraničavao sve tri grupe međusobno bio je IP-10. Trećeg postoperativnog dana, statistički značajnu razliku između vrednosti u UAA i CAA grupi imali su IL-10 i MIP-1 $\alpha$  ali ne i prema NEAA grupi. Tako su i u trodnevnom postoperativnom periodu našeg ispitivanja, od svih dvadeset citokinskih parametara praćenja, razlikovanje formiranih grupa pacijenata omogućavale iste tri varijable kao i preoperativno. Iako je do sada sproveden izvestan broj studija koje su ispitivale kretanje IL-10 u različitim patološkim procesima, obuhvatajući i akutni apendicitis, slični podaci za MIP-1 $\alpha$  i IP-10 su jako ograničeni, odnosno nepostojeći za akutni apendicitis. MIP-1 $\alpha$  je testiran u sklopu praćenja koštanih lezija kod multiplog mijeloma (263) i u sklopu praćenja HIV infekcije (264), dok su praćenja IP-10 sprovedena kod ispitivanja ulceroznog kolitisa (265) i tuberkuloze (266). U kontekstu našeg ispitivanja, posebno je interesantan rad Anderssona i saradnika iz 2001. godine, u kome su dovedeni u vezu upravo ulcerozni kolitis i apendektomija, kao faktor koji umanjuje rizik za ulcerozni kolitis (267). Zasiurno, IL-10, MIP-1 $\alpha$  i IP-10 su i dalje nedovoljno ispitani molekuli u preoperativnom i postoperativnom laboratorijskom praćenju akutnog apendicitisa, koji po rezultatima našeg ispitivanja, zaslužuju dodatno razmatranje u sklopu studija sa većim brojem pacijenata.

Za analizu peritoneumskih koncentracija citokina u našem istraživanju, uzimana je peritoneumska tečnost na početku operativnog zahvata, odmah nakon otvaranja peritoneumske duplje. Kod pacijenata bez nalaza inflamiranog apendiksa, kao i kod pacijenata sa flegmonozno izmenjenim apendixom, bio je očekivan nalaz manje količine bistre tečnosti, dok je kod komplikovanih formi apendicitisa bila očekivana veća količina, zamućene i smrdljive, nekada i sukrvičave tečnosti, usled raširene infekcije, prisustva raspadnih produkata i crevnog sadržaja u peritonealnoj duplji. Jednovremensko uzorkovanje

peritoneumske tečnosti je omogućavalo analizu razlika koncentracija ispitivanih citokina u peritoneumskoj tečnosti između formiranih grupa ali ne i dinamiku njenja tokom ranog postoperativnog toka, kao u slučaju analize serumskih citokina i istovremenskog uzorkovanja krvi. Neinvazivno postoperativno uzorkovanje peritoneumske tečnosti je bilo moguće samo kod malog broja ispitanika kod kojih je intraoperativno bio postavljen abdominalni dren. Ovakav pristup je, shodno hirurškim protokolima, bio ograničen na teže perforativne slučajeve iz CAA grupe pacijenata.

Diskriminacija formiranih patohistoloških grupa na osnovu peritoneumskih koncentracija citokina je, za razliku od serumskih, bila vrlo dobro izražena. Naime, od dvadeset ispitivanih varijabli, devetnaest je pokazalo značajne razlike u peritoneumskim koncentracijama između patohistoloških grupa.

IFN- $\gamma$  kao glavni citokin Th1 odgovora, jasno je diferencirao CAA od ostale dve grupe pacijenata, ali ne i NEAA od UAA grupe. Za razliku od prethodnih nalaza Dalala i saradnika iz 2005. godine, gde je nivo ovog citokina bio niži kod perforativnog nego kod flegmonoznog apendicitisa, u našem ispitivanju je najniža vrednost zabeležena u UAA a najviša u CAA grupi (118). Od ostalih proinflamatornih citokina, IFN- $\alpha$ , G-CSF, IL-1 $\alpha$  i IL-12 su imali sličan diskriminativni model za grupe dok je IL-6 razgraničavao NEAA od ostale dve grupe ali ne i UAA od CAA. Ovi citokini su imali najviše vrednosti u CAA grupi, što nije potpuno usklađen nalaz sa prethodnim ispitivanjima. Naime, IL-12 je u pomenutom ispitivanju Dalala i saradnika pratio vrednosti IL-6. Takođe, peritoneumske koncentracije G-CSF su bile ujednačene u NEAA i UAA grupi i značajno više u CAA grupi, za razliku od ispitivanja Cluitmansa i saradnika iz 1997. godine, gde se ova vrednost razlikovala između neinflamiranog i inflamiranog apendiksa (268). Proinflamatorni citokini čije su peritoneumske koncentracije u našem ispitivanju jasno diskriminisale sve tri grupe pacijenata bili su TNF- $\alpha$ , IL-17 i IL-1 $\beta$ . Koncentracije ovih citokina su kod naših pacijenata rasle sa progresijom upalnog procesa u slučaju TNF- $\alpha$  i IL-17 dok su kod IL-1 $\beta$  više vrednosti zabeležene kod NEAA nego kod pacijenata iz UAA grupe. TNF- $\alpha$  je i u jednom prethodnom ispitivanju, zajedno sa IL-6 i IL-8, predstavljao citokin sa najvišim peritoneumskim koncentracijama u sekundarnom peritonitisu (269).

Antiinflamatorni citokini Th2 odgovora, IL-4, IL-10 i IL-13, su svojim peritoneumskim koncentracijama takođe diferencirali formirane grupe naših pacijenata. IL-4 je jedini citokin Th2 odgovora koji je svojim koncentracijama razdvajao sve tri grupe

pacijenata, dok su IL-10 i IL-13 razdvajali CAA grupu od preostale dve ali ne i NEAA od UAA grupe. IL-4 i IL-10 su imali najviše vrednosti u CAA grupi, dok je u slučaju IL-13 najviša vrednost zabeležena u UAA grupi. Povišene peritoneumske koncentracije IL-4 i IL-10 su pronađene i u prethodnim ispitivanjima (8, 178), dok razlike u koncentracijama IL-10 između perforativnog i neperforativnog apendicitisa nisu nađene u studiji Yoon i autora (7).

Od hemokinskih varijabli iz našeg ispitivanja, koncentracije IL-8 su diferencirale sve tri grupe pacijenata međusobno dok su MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i MCP-1 snažno diferencirale CAA grupu od ostale dve ali ne i NEAA od UAA grupe, po sličnom modelu kao većina antiinflamatornih citokina. Podaci o izraženom povećanju koncentracija peritoneumskog IL-8 u peritonitisu u odnosu na plazmatske vrednosti su publikovane (269). Međutim, nema podataka o peritoneumskim vrednostima ovog hemokina kod različitih stadijuma apendicitisa. Od ostalih citokinskih molekula iz našeg ispitivanja, peritoneumske vrednosti cirkulišućih ICAM-1, LAP i E-selektina su, kao i kod većine hemokinskih varijabli, diferencirale CAA od UAA i NEAA grupe pacijenata, bez mogućnosti diferenciranja NEAA od UAA grupe. Tako je najveći broj testiranih citokina iz našeg ispitivanja, ukupno njih trinaest, svojim peritoneumskim koncentracijama snažno diskriminisao CAA od ostale dve grupe, bez mogućnosti odvajanja NEAA od UAA grupe pacijenata. Ovakav nalaz se može objasniti najsnažnijim imunskim odgovorom kod pacijenata sa komplikovanim formama akutnog apendicitisa, gde dolazi do reakcije peritoneuma koji je potentan produktor medijatora zapaljenja. Ovakva činjenica je iskorišćena u nekim ispitivanjima za praćenje komplikacija hirurških zahvata na crevnom traktu (270-272), pre svega za praćenje crevnih anastomoza čija postoperativna nekompetentnost rezultuje brzim razvojem peritonitisa i lokalnim, a u kasnijoj fazi i sistemskim skokom nivoa citokina. Ključni momenat za ovu vrstu praćenja je prisustvo drena kod ovih pacijenata, koji omogućava često uzorkovanje peritonealne tečnosti. Pet citokina je svojim peritoneumskim koncentracijama odvajalo sve tri grupe međusobno, dok je jedino peritoneumski IL-6 odvajao NEAA od ostale dve grupe, bez mogućnosti razlikovanja UAA od CAA grupe. Visok nivo ovog interleukina u peritoneumskoj tečnosti u odnosu na serumske vrednosti kod apendicitisa je nađen u studiji Rivera-Chaveza i autora (8). Druga ispitivanja su ukazala na značaj ćelija peritoneumskog mezotela stimulisanih TNF- $\alpha$  i IL-1, u sintezi IL-6 kod abdominalnih procesa (273, 274).

Simultano određivanje koncentracija peritoneumskih i serumskih vrednosti citokina je u ovom ispitivanju imalo za cilj određivanje stepena odražavanja lokalnog imunskog odgovora na sistemski nivo. Uzorak krvi koji je korišćen za ovu korelaciju je uziman



preoperativno, dok je peritoneumski uzorak tečnosti uziman odmah nakon laparotomije. Efekat laparotomije na lokalni i sistemski imunski odgovor je dokazan (275-277) ali je ovaj efekat na nivo peritoneumskih citokina u našem ispitivanju minimalizovan uzimanjem uzorka peritoneumske tečnosti u prvim trenucima nakon otvaranja peritoneumske šupljine. Laparotomijski efekat na sistemski citokinski status je u našem ispitivanju svakako postojao kod uzoraka od prvog i trećeg postoperativnog dana.

Statistički značajna pozitivna korelacija između peritoneumskih i serumskih koncentracija na ukupnom broju pacijenata na dan operacije, zabeležena je kod svih ispitivanih citokina sa izuzetkom IL-6. Funkcija ovog medijatora je do sada obimno ispitivana, uz brojna tumačenja njegovog proinflamatornog i antiinflamatornog dejstva (190, 278, 279). Po grupama, pozitivna korelacija je bila prisutna u CAA grupi za sedamnaest citokina, u UAA grupi za osam i u NEAA grupi za devet od dvadeset ispitivanih citokina. U CAA grupi osim IL-6, korelacije nije bilo i u slučaju IL-1 $\beta$  i IL-8. U NEAA i UAA grupi, pozitivna korelacija je postojala za kombinovanu grupu proinflamatornih, antiinflamatornih i hemokinskih varijabli, uključujući IFN- $\gamma$ , IL-4 i MIP-1 $\alpha$ . Ovakav nalaz korelacija lokalnih i sistemskih koncentracija citokina po grupama, ide u prilog teoriji o značajnoj sistemskoj refleksiji lokalnih dešavanja samo u uznapredovalim stadijumima bolesti. Sa druge strane, ključni regulatorni medijatori Th1 i Th2 odgovora (280) su korelirali kako kod ukupnog broja pacijenata, tako i po formiranim grupama.

Analizirana je i korelacija serumskih i peritoneumskih vrednosti citokina sa standardnim laboratorijskim parametrima, NLR, CRP i MPXI. Statistički najznačajnija korelacija, sa najvećim brojem lokalnih i sistemskih citokinskih varijabli, je bila prisutna za koncentracije CRP. Vrednosti NLR su pokazale bolju korelaciju sa peritoneumskim citokinima, dok su vrednosti MPXI slabo korelirale sa peritoneumskim i značajno bolje sa vrednostima serumskih citokina.

Vrednosti NLR su preoperativno pozitivno korelirale sa serumskim MIP-1 $\beta$  i E-selektinom, dok su sa peritoneumskim koncentracijama citokina pozitivno korelirale skoro sa svim ispitivanim varijablama, sa izuzetkom IL-6 i IP-10. Postoperativno se održava korelacija sa serumskim MIP-1 $\beta$  i javlja se pozitivna korelacija sa IP-10 u prvom postoperativnom danu, dok je trećeg postoperativnog dana nađena negativna korelacija sa IL-6. Obzirom na prethodno opisanu dobru senzitivnost NLR u praćenju akutnog apendicitisa i brojne uloge IL-6 u lokalnoj i sistemskoj inflamaciji, teško je objasniti nepostojanje

korelacije NLR sa njegovim peritoneumskim koncentracijama. Očekivano, citokini sekretovani od strane neutrofila i oni zaduženi za mobilizaciju, aktivaciju i održavanje neutrofila na mestu zapaljenja, poput IL-1, TNF- $\alpha$ , G-CSF, hemokina, ICAM-1, svojim peritoneumskim koncentracijama su dobro korelirali sa vrednostima NLR. Slabija korelacija NLR sa serumskim citokinskim vrednostima je objašnjiva nedovoljnom refleksijom lokalnih dešavanja na sistemske nivo. U raspoloživoj literaturi nema podataka o korelaciji citokina i NLR u akutnom apendicitisu. Ove korelacije su ispitivane u onkološkim studijama, u sklopu prognoze kolorektalnog karcinoma (281) i hepatičnih metastaza (282), gde su nađene izvesne pozitivne korelacije.

Peritoneumske koncentracije citokina su korelirale sa preoperativnim vrednostima CRP podjednako dobro kao i sa NLR. Međutim, korelacija serumskih vrednosti citokina je bila značajno bolja preoperativno i trećeg postoperativnog dana, uključujući pozitivnu korelaciju IL-4, IL-17, IL-6, MIP-1 $\alpha$ , IP-10, IFN- $\gamma$ . Za razliku od nedovoljno raspoloživih podataka o korelaciji peritoneumskih citokina i CRP, veliki broj studija je simultano ispitivao dijagnostičku vrednost serumskih citokina i CRP kod apendicitisa. Najveći broj njih je izveštavao o korelaciji sa CRP i dobrim dijagnostičkim potencijalima IL-6 (254, 283). Neke studije su izveštavale o velikom broju lažno negativnih porasta IL-6 kod patohistološki potvrđenih apendicitisa (284). Veći broj studija je, takođe potvrdio slične pozitivne rezultate za IL-10 (283, 285). Obzirom na dokazanu povezanost imunskog odgovora i koncentracija CRP (286), kao proteina akutne faze, ne dovodi se u pitanje postojanje porasta serumskih vrednosti citokina i CRP, već je pitanje njihove dinamike menjanja i faktora koji omogućuje bolje praćenje procesa.

Vrednosti MPXI nisu pokazale skoro nikakvu korelaciju sa nivoima peritoneumskih citokina. Za razliku od toga, veliki broj preoperativnih serumskih citokina je svojim koncentracijama korelirao pozitivno sa preoperativnim vrednostima MPXI. Ovde su bili svrstani TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-6, IFN- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-12, kao i hemokinske varijable IL-8 i MIP-1 $\alpha$ . U generalno oskudnim izveštajima o MPXI, u literaturi se ne sreću podaci o korelaciji citokina sa MPXI u bilo kom obliku. Neutrofilima degranulacijom oslobađaju veliki broj citokina koji nastavljaju kaskadu dalje produkcije i sekrecije medijatora zapaljenja. MPXI se pojačanom degranulacijom smanjuje i poprima negativne vrednosti. U skladu sa ovim saznanjima, očekivana je negativna korelacija vrednosti MPXI i citokina. Obzirom na slabu preoperativnu diferencijaciju grupa na osnovu serumskih citokina i prethodno izneto

slabo odvajanje grupa na osnovu MPXI vrednosti, ispitivanje dobre međusobne korelacije ovih varijabli bi moglo da rasvetli prirodu njihove povezanosti.

Opseg refleksije lokalnog zbivanja na sistemski nivo verovatno može biti različitog inteziteta. Sa jedne strane, lokalni proces može biti potpuno ograničen, bez ikakvih sistemskih efekata i mogućnosti detekcije promena u serumu. U tom slučaju se može govoriti o kompartmanizaciji procesa. Nasuprot tome, lokalna zbivanja se mogu prenositi na sistemski nivo u manjoj ili većoj meri. Dominacija proinflamatornih citokina se može sa lokalnog prenositi na sistemski nivo i povećavati rizik od generisanja zapaljenjske reakcije i u primarno intaktnim tkivima i organima, indukujući sistemsku inflamaciju i vodeći u produblјivanje SIRS (287-289). Lokalno stvoreni proinflamatorni citokini, po drugoj teoriji, mogu indukovati supresiju sistemske inflamacije i na taj način, boreći se protiv lokalne afekcije, prevenirati inflamaciju u drugim tkivima. Veći broj do sada sprovedenih ispitivanja su prezentovanim rezultatima potvrdila navedenu teoriju (290-292). Sistemski antiinflamatorni efekat se tako može pretpostaviti i tokom razvoja akutnog apendicitisa (293). Sa ovim u vezi, u kliničkom radu se koriste termini flegmonoznog apendicitisa i perforativne bolesti, što sugeriše više lokalni karakter prvog i generalizaciju drugog procesa.

Iako veliki broj sprovedenih studija ima za cilj kvalifikaciju i kvantifikaciju lokalnog i sistemskog imunskog odgovora u akutnom apendicitisu i određivanje proinflamatornog ili antiinflamatornog karaktera odgovora, naše ispitivanje je više bilo usmereno ka diferenciranju stadijuma akutnog apendicitisa i potencijalnom kliničkom benefitu u smislu pomoći u dijagnostikovanju i praćenju pedijatrijskih pacijenata sa akutnim apendicitisom. Peritoneumske koncentracije citokina su u našem ispitivanju dobro diferencirale patohistološke grupe pacijenata dok je diferencijacija grupa na osnovu serumskih koncentracija bila slaba. Sa druge strane, značajna pozitivna korelacija peritoneumskih i serumskih vrednosti postojala je za najveći broj ispitivanih citokina. Ovakvi rezultati govore u prilog postojanja značajne refleksije lokalnog imunskog odgovora na sistemski nivo ali nedovoljne za diferencijaciju grupa pacijenata onako efikasno kako je to slučaj sa peritoneumskim citokinima. Punktiranje peritoneumske šupljine u cilju dobijanja i analize peritoneumskih nivoa citokina radi pomoći u dijagnostikovanju je previše invazivna i neprihvatljiva metoda kada je u pitanju opservacija akutnog apendicitisa. Ipak, malobrojne citokinske varijable koje svojim serumskim koncentracijama razdvajaju grupe pacijenata, IP-10, IL-10 i MIP-1 $\alpha$ , mogu predstavljati biomarkerski set za diferencijaciju grupa. Unapređenjem tehničkih mogućnosti i laboratorijske operativnosti, u novije vreme se slični

biomarkerski setovi, sve češće predlažu kao pomoćno dijagnostičko oruđe kod mnogih klinički nedovoljno definisanih stanja (294). Ukoliko bi rezultati našeg ispitivanja bili potvrđeni većim konfirmativnim studijama, ovakav biomarkerski set bi uz klinički nalaz, ultrazvučni nalaz i rutinsku laboratorijsku pretragu, mogao da bude dopunski dijagnostički činilac.

Zanimljiv nalaz iz našeg ispitivanja je da IP-10, varijabla koja je najbolje diferencirala grupe pacijenata na sistemskom nivou, predstavlja jedinu od svih dvadeset ispitivanih citokina, koji nije pokazao diskriminišući potencijal za grupe na lokalnom, peritoneumskom nivou. Takođe, citokin koji se u našem ispitivanju izdvojio po svojim vrednostima, bio je IL-6. Ovo je jedina varijabla koja na ukupnom broju pacijenata nije pokazala korelaciju između lokalnih i sistemskih koncentracija. U isto vreme, IL-6 je svojim peritoneumskim vrednostima razdvajao NEAA od UAA grupe, što nije bio slučaj sa većinom drugih varijabli.

Dominantno diferenciranje grupa pacijenata na osnovu peritoneumskih koncentracija citokina i jasno razdvajanje preoperativnih i postoperativnih serumskih citokinskih statusa samo u CAA grupi, sugeriše da je refleksija lokalnog odgovora na sistemski nivo prisutnija kod razvijenih, tj. težih kliničkih oblika. U tom smislu, važno je istaknuti da je u našem istraživanju, iako sa velikim brojem perforativnih apendicitisa, postojao mali broj pacijenata u prostraciji i sa razvijenim septičnim šokom, kada bi sistemska refleksija lokalnog odgovora verovatno bila izraženija.

Sastav intestinalne mikrobne flore i genetska konstitucija pacijenta su još dva faktora koji mogu uticati na lokalni i sistemski imunski odgovor u akutnom apendicitisu. Uticaj crevne mikrobiote na razvoj zapaljenjskih procesa je nesporan i često ispitivan zadnjih godina (295, 296). Zaključcima pojedinih ispitivanja ovom faktoru je pripisana presudna uloga u razvoju i ishodu pojedinih patoloških dešavanja (297). Genetska ispitivanja, takođe sugerišu naslednu komponentu za nastanak i razvoj akutnog apendicitisa, iako je kod naših pacijenata pozitivnu familijarnu anamnezu imala oko šestina ispitanika, nasuprot tvrdnji da je rizik nastanka kod genetskog opterećenja trostruko veći (298). Nedavne genetske studije su dovele u vezu polimorfizam IL-6 sa nastankom akutnog apendicitisa (299) i identifikovale gen koji je povezan sa povećanom učestalošću akutnog apendicitisa (300). Ipak, tumačenja ovih faktora kod selektovanih pacijenata je prevazilazilo okvire našeg ispitivanja.

Ograničavajući faktori ispitivanja vezani su za kinetiku citokina, poluvreme života pojedinih citokina u plazmi kao i odnos njihove in vivo i in vitro aktivnosti (301).

Koncentracije peritoneumskih citokina odražavaju lokalni nalaz kod akutnog apendicitisa, koji je verovatno dijagnostički pouzdaniji, zbog anatomske bliskosti patološkog procesa, ali preoperativno znatno teže dostupan. Koncentracije citokina iz krvi, čije je venepunkcijsko uzorkovanje mnogo jednostavnije, predstavljaju sistemski nalaz. Osim histoanatomskih karakteristika koji mogu smanjivati refleksiju lokalnog odgovora na sistemski nivo, značajan faktor jeste upravo i citokinska kinetika. Naime, najveći broj citokina ima kratak poluživot, koji je sličan za in vivo i in vitro uslove. Ova činjenica može značajno uticati na korelaciju peritoneumskih i koncentracija citokina u krvi. Takođe, i baratanje uzorcima čini tehnički zahtevnijim (302).

Kao ograničavajući faktor koji se tiče dizajna ispitivanja, svakako može biti navedena nejednakost patohistoloških grupa, naročito brojčana dominacija grupe pacijenata sa gangrenoznim i perforativnim u odnosu na grupu pacijenata sa flegmonoznim apendicitisom. Patohistološka dijagnostika je kod određenog broja pacijenata bila odložena i rađena je nakon završetka regrutacije pacijenata, kada je veliki broj preparata intraoperativno viđenih kao flegmonozni, prešao u grupu gangrenoznih i perforativnih. Tako je u našem ispitivanju neočekivano veliko razlikovanje intraoperativnih i patohistoloških nalaza, postalo ključni razlog brojčane neujednačenosti UAA i CAA grupe. Naknadna redukcija broja pacijenata u CAA grupi radi približavanja broja pacijenata u UAA grupi nije bila moguća zbog statističkih propozicija i slabljenja snage ispitivanja.

## ***Zaključak***

1. Uz raspoložive dijagnostičke pristupe, incidence negativne apendektomije i incidenca komplikovanog apendicitisa kod dece su i dalje visoke i ne mogu se dovesti u vezu sa preoperativnim trajanjem simptoma.
2. Pouzdanost intraoperativne dijagnoze akutnog apendicitisa kod dece je još uvek nedovoljno visoka, prevashodno zbog nemogućnosti adekvatne procene mikroperforativnih lezija.
3. Neutrofilno-limfocitni odnos sa visokom pouzdanošću diferencira negativan od pozitivnog nalaza akutnog apendicitisa kod dece ali ne i stadijum bolesti.
4. C-reaktivni protein pokazuje visoku pouzdanost u dijagnozi inflamatorne perforacije ali ne i početne inflamacije apendiksa kod pedijatrijskih pacijenata.

5. Neutrofilni mijeloperoksidazni indeks, zbog širokog referentnog opsega i individualno zavisnih bazalnih vrednosti, ne može biti pouzdan u inicijalnoj dijagnozi akutnog apendicitisa kod dece.
6. Koncentracije peritoneumskih citokina bolje od njihovih serumskih koncentracija diferenciraju prisustvo i stadijum akutnog apendicitisa kod dece.
7. U sve tri grupe pacijenata utvrđena je značajna korelacija između peritoneumskih i serumskih vrednosti MIP-1 $\alpha$ , IL-4, IL-17 i IFN- $\gamma$ . U grupama NEAA i UAA pokazana je značajna korelacija oko 45% ispitivanih citokina. Međutim, u grupi CAA značajna korelacija je utvrđena u 17/20 određivanih citokina (85%). Posebnost ove grupe u odnosu na NEAA i UAA je postojanje značajne korelacije MIP-1 $\beta$ , IL10, TNF- $\alpha$ , IL12 i IL13.
8. Preoperativne serumske koncentracije inerleukina 10 (IL-10) i makrofagnog inflamatornog proteina 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) diskriminišu flegmonozni od gangrenoznog i perforativnog apendicitisa kod dece.
9. Preoperativne serumske koncentracije interferonom inducibilnog proteina 10 (IP-10) diskriminišu inflamirani od neinflamiranog apendiksa kod dece.
10. Razlike u serumskim koncentracijama IL-10, MIP-1 $\alpha$  i IP-10 se kod dece operisane u različitim stadijumima akutnog apendicitisa održavaju i nakon operacije i mogu biti korišćene za postoperativno praćenje pacijenata.
11. IL-10, MIP-1 $\alpha$  i IP-10 mogu predstavljati trojni biomarkerski set u dijagnostici i praćenju akutnog apendicitisa kod dece.

## *Literatura*

1. Cheong L, Emil S. Outcomes of Pediatric Appendicitis: An International Comparison of the United States and Canada. *JAMA Surg* 2014;149(1):50-55.
2. Stringer MD, Drake DP. Diagnosis and management of acute abdominal pain in childhood. *Curr Paediatr* 1991; 1: 2-7.
3. Seetahal SA, Bolorunduro OB, Sookdeo TC et al. Negative appendectomy: a 10-year review of a nationally representative sample. *Am J Surg* 2011;201:433–437.
4. Blomqvist PG, Andersson RE, Granath F et al. Mortality after appendectomy in Sweden, 1987–1996. *Ann Surg* 2001;233:455–460.
5. Andersson MN, Andersson RE. Causes of short-term mortality after appendectomy: a population-based case-controlled study. *Ann Surg* 2011;254:103–107.
6. Kraemer M, Franke C, Ohmann C et al. Acute Abdominal Pain Study Group. Acute appendicitis in late adulthood: incidence, presentation, and outcome. Results of a prospective multicenter acute abdominal pain study and a review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:470–481.
7. Yoon DY, Chu J, Chandler C, Hiyama S, Thompson JE, Hines OJ. Human cytokine levels in nonperforated versus perforated appendicitis: molecular serum markers for extent of disease? *Am Surg*. 2002;68:1033-1037.
8. Rivera-Chavez FA, Wheeler H, Lindberg G, Munford RS, O’Keefe GE. Regional and systemic cytokine responses to acute inflammation of the vermiform appendix. *Ann Surg*. 2003;237:408-416.
9. Dalal I, Somekh E, Bilker-Reich A, Boaz M, Gorenstein A, Serour F. Serum and peritoneal inflammatory mediators in children with suspected acute appendicitis. *Arch Surg*. 2005;140:169-73.
10. Haeger K. The illustrated history of surgery. New York, Bell Publishing, 1988.



11. Livingston EH, Woodward WA, Sarosi GA, Haley RW. Disconnect between incidence of non perforated and perforated appendicitis; implications for pathophysiology and management. *Ann Surg* 2007;245:886-92.
12. Porter R. The Cambridge Illustrated History of Medicine. Cambridge, Cambridge University Press, 2001.
13. Schumpelick V, Dreuw B, Ophoff K, et al. Appendix and cecum. Embryology, anatomy, and surgical applications. *Surg Clin North Am.*2000;80(1):295-318.
14. Wakeley CPG. Position of the vermiform appendix as ascertained by analysis of 10,000 cases. *J Anat.* 1933;67:277-283.
15. Moore KL. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. Philadelphia, WB Saunders, 2008.
16. Gray GF Jr, Wackym PA. Surgical pathology of the vermiform appendix. Pathology Annual. Part 2. Norwalk, CT: Appleton-Century-Croft; 1986:111-144.
17. Hamilton SR. Structure of the colon. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984;93:13-23.
18. Mills SE. Histology for Pathologists. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
19. Bazar KA, Lee PY, Joon Yun A. An "eye" in the gut: the appendix as a sentinel sensory organ of the immune intelligence network. *Med Hypotheses* 2004;63(4):752-8.
20. Bollinger RR, Barbas AS, Bush EL, Lin SS, Parker W. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. *J Theor Biol* 2007;249(4):826-31.
21. Prystowsky JB, Pugh CM, Nagle AP. Current problems in surgery. Appendicitis. *Curr Probl Surg* 2005;42:688.
22. Erguel E. Heredity and familial tendency of acute appendicitis. *Scand J Surg* 2007;96:290-92.
23. Anderson JE, Bickler SW, Chang DC, Talamini MA. Examining a common disease with unknown etiology: trends in epidemiology and surgical management of appendicitis in California, 1995-2009. *World J Surg* 2012;36:2787-94.
24. Wei PL, Chen CS, Keller JJ, Lin HC. Monthly variation in acute appendicitis incidence: 10-year nationwide population-based study. *J Surg Res* 2012;178:670-76.
25. Cuschieri A, Grace PA, Darzi A, et al, editors. Clinical surgery. 2nd ed. Malden (MA): Blackwell Science; 2003.

26. Prystowsky JB, Pugh CM, Nagle AP. Current problems in surgery. Appendicitis. *Curr Probl Surg* 2005;42(10):688-742.
27. Brennan, Gerald DG. Pediatric appendicitis: pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging. *CJEM*, 2006, 8.6:425.
28. Barber MD, McLaren J, Rainey JB. Recurrent appendicitis. *Br J Surg* 1997; 84(1):110-112.
29. Andersson RE. The natural history and traditional management of appendicitis revisited: spontaneous resolution and predominance of prehospital perforations imply that a correct diagnosis is more important than an early diagnosis. *World J Surg* 2007;31(1):86-92.
30. Cobben LP, de Van Otterloo AM, Puylaert JB. Spontaneously resolving appendicitis: frequency and natural history in 60 patients. *Radiology* 2000; 215(2):349-352.
31. Andersson R, Hugander A, Thulin A et al. Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation. *BMJ* 1994; 308(6921):107-110.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier 2012.
33. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(9):1618-1631.
34. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519-531.
35. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33(5):657-670.
36. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J allergy clin immunol* 2010;125(2):S53-72.
37. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-2357.
38. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J allergy clin immunol* 2010;125(2):S33-40.
39. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155(3):1151-1164.

40. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8(7):523-532.
41. Chen Z, Lin F, Gao Y et al. FOXP3 and ROR gamma: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol* 2011;11(5):536-542.
42. Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441(7090):235-238.
43. Rubér M, Andersson M, Petersson BF, Olaison G, Andersson RE, Ekerfelt C. Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis. *Surgery* 2010;147(3):366-72.
44. Park H, Li Z, Yang XO et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6(11):1133-1141.
45. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2):179-189.
46. Zygmunt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv Immunol* 2011;109:159-196.
47. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010;115(2):335-343.
48. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87(6):2095-2147.
49. Gabay C, Smith MF, Eidlen D et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* 1997;99(12):2930-2940.
50. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2):S53-72.
51. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(2 S):S441-445.
52. Stanley AC, Lacy P. Pathways for cytokine secretion. *Physiology* 2010;25(4):218-29.
53. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol* 2017;17(1):49-59.
54. Butler C. Surgical pathology of acute appendicitis. *Hum. Pathol* 1981;12(10):870-878.
55. Ciani S, Chuaqui B. Histological features of resolving, non-complicated phlegmonous appendicitis. *Pathol Res Pract* 2000;196:89-93.

56. Nabiopour F. Histopathological Feature of Acute Appendicitis in Kerman-Iran from 1997 to 2003. *Am.J.Envirn.Sci.* 2005; 1(2):130-132.
57. Kuga T et al. Immunocytochemical Analysis of Cellular Infiltrates in Human Appendicitis. *Surg Today* 2000;30:1083-88.
58. Bhangu A, Soreide K, Di Saverio S, Assarsson JH, Drake FT. Acute appendicitis: modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet* 2015;386:1278-87.
59. Attwood SE, Mealy K, Cafferkey MT et al. Yersinia infection and acute abdominal pain. *Lancet* 1987;1:529.
60. Sanders DY, Cort CR, Stubbs AJ et al. Shigellosis associated with appendicitis. *J Pediatr Surg* 1972;7:315.
61. Nadler EP, Coppell MS, Bhatt B et al. Appendiceal infection by *Entamoeba histolytica* and *Strongyloides stercoralis* presenting like acute appendicitis in children. *Dig Dis Sci* 1990;35:603.
62. Jay L. Grosfeld, James A. O'Neill, Arnold G. Coran, Eric Fonkalsrud. *Pediatric Surgery* 6. ed. Mosby, 2006:1502.
63. George W, Holcomb III, J. Patrick Murphy. *Ashcraft's Pediatric Surgery*. 5. ed. Elsevier, 2010:551.
64. Humes DJ, Simpson J. Acute appendicitis. *BMJ*. 2006;333(7567):530-4.
65. Mattei P, Sola JE, Yeo CJ et al. Chronic and recurrent appendicitis are uncommon entities often misdiagnosed. *J Am Coll Surg* 1994;178:385.
66. Cobben LP, de Van Otterlo AM, Puylaert JB. Spontaneously resolving appendicitis: Frequency and natural history in 60 patients. *Radiology* 2000;215:349.
67. Heller MB, Skolnick LM. Ultrasound documentation of spontaneously resolving appendicitis. *Am J Emerg Med* 1993;11:51.
68. Norman J. Carr. The pathology of acute appendicitis *Ann.Diagn.Pathol* 2000; 4:46-58.
69. Samuel M. Pediatric appendicitis score. *J Pediatr Surg*. Jun 2002;37(6):877-81.
70. Ohle R, O'Reilly F, O'Brien KK, Fahey T, Dimitrov BD. The Alvaradoscore for predicting acute appendicitis: a systematic review. *BMC Med* 2011; 9: 139.

71. Schneider C, Kharbanda A, Bachur R. Evaluating appendicitis scoring systems using a prospective pediatric cohort. *Ann Emerg Med* 2007;49(6):778-84.
72. Kharbanda AB, Taylor GA, Fishman SJ, Bachur RG. A clinical decision rule to identify children at low risk for appendicitis. *Pediatrics* 2005;116(3):709-16.
73. Yazici M, Ozkisacik S, Oztan MO, Gursoy H. Neutrophil/lymphocyte ratio in the diagnosis of childhood appendicitis. *Turk J Pediatr* 2010; 52:400-403.
74. Andersson M, Ruber M, Ekerfelt C, Hallgren HB, Olaison G, Andersson RE. Can new inflammatory markers improve the diagnosis of acute appendicitis? *World J Surg* 2014; 38:2777-83.
75. Kharbanda AB, Rai AJ, Cosme Y, Liu K, Dayan PS. Novel serum and urine markers for pediatric appendicitis. *Acad Emerg Med* 2012;19(1):56-62.
76. Acharya A, Markar SR, Ni M, Hanna GB. Biomarkers of acute appendicitis: systematic review and cost-benefit trade-off analysis. *Surgical Endoscopy* 2017;31(3):1022-1031.
77. Terasawa T, Blackmore CC, Bent S, Kohlwes RJ. Systematic review: computed tomography and ultrasonography to detect acute appendicitis in adults and adolescents. *Ann Intern Med* 2004;141:537-46.
78. Weyant MJ, Eachempati SR, Maluccio MA, et al. Is imaging necessary for the diagnosis of acute appendicitis? *Adv Surg* 2003;37:327-45.
79. Sivit CJ, Applegate KE. Imaging of acute appendicitis in children. *Semin Ultrasound CT MR* 2003;24:74-82.
80. Sivit CJ, Applegate KE, Stallion A, et al. Imaging evaluation of suspected appendicitis in a pediatric population: effectiveness of sonography versus CT. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175:977-80.
81. Abu-Yousef MM, Bleicher JJ, Maher JW, et al. High-resolution sonography of acute. *AJR Am J Roentgenol* 1987;149:53-8.
82. Jeffrey RB, Laing FC, Townsend RR. Acute appendicitis: sonographic criteria based on 250 cases. *Radiology* 1988;167:327-9.
83. Leeuwenburgh MM, Wiezer MJ, Wiarda BM, et al. Accuracy of MRI compared with ultrasound imaging and selective use of CT to discriminate simple from perforated appendicitis. *Br J Surg* 2014; 101:147-55.
84. McBurney C. Experiences with early operative interference in cases of diseases of the vermiform appendix. *N Y Med J* 1889;50:676-84.

85. Terasawa T, Blackmore CC, Bent S, Kohlwes RJ. Systematic review: computed tomography and ultrasonography to detect acute appendicitis in adults and adolescents. *Ann Intern Med* 2004;141:537-46.
86. Cobben LP, Groot I, Haans L, Blickman JG, Puylaert J. MRI for clinically suspected appendicitis during pregnancy. *Am J Roentgenol* 2004;183:671-5.
87. Weston A, Jackson T, Blamey S. Diagnosis of appendicitis in adults by ultrasonography or computed tomography: a systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 2005;21:368-79.
88. Livingston EH, Woodward WA, Sarosi GA, Haley RW. Disconnect between incidence of nonperforated and perforated appendicitis: implications for pathophysiology and management. *Ann Surg* 2007;245:886Y892.
89. Velanovich V, Satava R. Balancing the normal appendectomy rate with the perforated appendicitis rate: Implications for quality assurance. *Am Surg* 1992;58:264-9.
90. Larsson PG, Henriksson G, Olsson M, Boris J, Ströberg P, Tronstad SE, et al. Laparoscopy reduces unnecessary appendicectomies and improves diagnosis in fertile women. A randomized study. *Surg Endosc* 2001;15:200-202.
91. Svensson JF, Patkova B, Almstrom M, et al. Nonoperative treatment with antibiotics versus surgery for acute nonperforated appendicitis in children: a pilot randomized controlled trial. *Ann Surg* 2015;261:67-71.
92. Muehlstedt SG, Pham TQ, Schmeling DJ. The management of pediatric appendicitis: A survey of North American Pediatric Surgeons. *J Pediatr Surg* 2004;39:875.
93. Daskalakis K, Juhlin C, Pahlman L. The use of pre- or postoperative antibiotics in surgery for appendicitis: a systematic review. *Scand J Surg* 2014;103:14-20.
94. van Rossem CC, Schreinemacher MH, Treskes K, van Hogezaand RM, van Geloven AA. Duration of antibiotic treatment after appendicectomy for acute complicated appendicitis. *Br J Surg* 2014;101:715-19.
95. Yu TC, Hamill JK, Evans SM, et al. Duration of postoperative intravenous antibiotics in childhood complicated appendicitis: a propensity score-matched comparison study. *Eur J Pediatr Surg* 2014; 24:341-49.
96. Gomes CA, Sartelli M, Di Saverio S, Ansaloni L, Catena F, Coccolini F, et al. Acute appendicitis: proposal of a new comprehensive grading system based on clinical, imaging and laparoscopic findings. *World J Emerg Surg* 2015;10:60.
97. O'Toole SJ, Karamanoukian HL, Allen JE, et al. Insurance-related differences in the presentation of pediatric appendicitis. *J Pediatr Surg*. 1996;31:1032-1034.

98. Flum DR, Morris A, Koepsell T, Dellinger EP. Has misdiagnosis of appendicitis decreased over time? a population-based analysis. *JAMA*. 2001;286:1748-1753.
99. Kaiser S, Frenckner B, Jorulf HK. Suspected appendicitis in children: US and CT: a prospective randomized study. *Radiology*. 2002;223:633-638.
100. Somekh E, Serour F, Gorenstein A, Vohl M, Lehman D. Phenotypic pattern of B cells in the appendix: reduced intensity of CD 19 expression. *Immunobiology*. 2000;201:461-469.
101. Pourhabibi Zarandi N, Javidi Parsijani P, Bolandparvaz S, Paydar S, Abbasi H. Accuracy of Surgeon's Intraoperation Diagnosis of Acute Appendicitis, Compared with the Histopathology Results. *Bulletin of Emergency & Trauma*. 2014;2(1):15-21.
102. Yilmaz M, Akbulut S, Kutluturk K, Sahin N, Arabaci E, Ara C, et al. Unusual histopathological findings in appendectomyspecimens from patients with suspected acute appendicitis. *World J Gastroenterol* 2013;19(25):4015-22.
103. Memon ZA, Irfan S, Fatima K, Iqbal MS, Sami W. Acute appendicitis: diagnostic accuracy of Alvarado scoring system. *Asian J Surg* 2013;36(4):144-9.
104. Riber C, Tønnesen H, Aru A, Bjerregaard B. Observer variation in the assessment of the histopathologicdiagnosis of acute appendicitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(1):46-9.
105. Ponsky TA, Hafi M, Heiss K, Dinsmore J, Newman KD, Gilbert J. Interobserver variation in the assessment of appendiceal perforation. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2009;19 Suppl 1:S15-8.
106. Monajemzadeh M, Haggghi-Ashtiani MT, Montaser-Kouhsari L, Ahmadi H, Zargoosh H, Kalantari M. Pathologic evaluation of appendectomy specimens in children: is routine histopathologic examination indicated *Iran J Pediatr* 2011;21(4):485-90.
107. Marudanayagam R, Williams GT, Rees BI. Review of the pathological results of 2660 appendectomy specimens. *J Gastroenterol* 2006;41(8):745-9.
108. Flum DR, Koepsell T. The clinical and economic correlates of misdiagnosed appendicitis: nationwide analysis. *Arch Surg* 2002;137(7):799-804; discussion 804.
109. Flum DR, Morris A, Koepsell T, Dellinger EP. Has misdiagnosis of appendicitis decreased over time? A population-based analysis. *JAMA* 2001;286(14):1748-53.
110. Schwartz SI, Brunickardi FC. Schwartz's principles of surgery. 9th ed. New York: McGraw- Hill, Medical Pub, Division, 2010; p.1075.
111. Bongard F, Landers DV, Lewis F. Differential diagnosis of appendicitis and pelvic inflammatory disease. A prospective analysis. *Am J Surg* 1985;150(1):90-6.

112. Knight PJ, Vassy LE. Specific diseases mimicking appendicitis in childhood. *Arch Surg* 1981;116(6):744-6.
113. J.K. Roberts, M. Behraves, J. Dmitrewski. Macroscopic findings at appendicectomy are unreliable: implications for laparoscopy and malignant conditions of the appendix. *Int J Surg Pathol* 2008;16(4):386-390.
114. A. Hussain, H. Mahmood, T. Singhal, S. Balakrishnan, S. El-Hasani. What is positive appendicitis? A new answer to an old question. Clinical, macroscopical and microscopical findings in 200 consecutive appendectomies. *Singap Med J* 2009;50(12):1145-49.
115. S.H. Teh, S. O'Ceallaigh, J.G. McKeon, M.K. O'Donohoe, W.A. Tanner, F.B. Keane. Should an appendix that looks 'normal' be removed at diagnostic laparoscopy for acute right iliac fossa pain? *Eur J Surg* 2000;166(5):388-9.
116. W.T. van den Broek, A.B. Bijnen, P. de Rooter, D.J. Gouma. A normal appendix found during diagnostic laparoscopy should not be removed. *Br J Surg* 2001;88(2):251-4.
117. R. Al-Ghnaniem, H.M. Kocher, A.G. Patel. Prediction of inflammation of the appendix at open and laparoscopic appendicectomy: findings and consequences. *Eur J Surg* 2002;168(1):4-7.
118. B. Navez, A. Therasse, Should every patient undergoing laparoscopy for clinical diagnosis of appendicitis have an appendicectomy? *Acta Chir Belg* 2003;103(1):87-9.
119. L. Graff, J. Russell, J. Seashore, J. Tate, A. Elwell, M. Prete, et al. False-negative and false-positive errors in abdominal pain evaluation: failure to diagnose acute appendicitis and unnecessary surgery. *Acad Emerg Med* 2000;7(11):1244-55.
120. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657-670.
121. Ross R. The role of T lymphocytes in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(8):2879.
122. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential Haematology* Oxford: Blackwell; 2006: 94-103.
123. Jahangiri M, Wyllie JH. Peripheral blood lymphopenia in gangrenous appendicitis. *BMJ* 1990; 301: 215.
124. Erturk A, Tuncer IS, Balci O, Karaman I, Karaman A, Afsarlar CE et al. The Value of Pediatric Appendicitis Score and Laboratory Findings on the Diagnosis of Pediatric Appendicitis. *Turk J Pediatr* 2015; 2:79-84.



125. Bhatt M, Joseph L, Ducharme FM, Dougherty G, McGillivray D. Prospective Validation of the Pediatric Appendicitis Score in a Canadian Pediatric Emergency Department. *Acad Emerg Med* 2009;16(7):591-6.
126. Goldman RD, Carter S, Stephens D, Antoon R, Mounstephen W, Langer JC. Prospective validation of the pediatric appendicitis score. *J Pediatr* 2008;153(2):278-82.
127. Yazici M, Ozkisacik S, Oztan MO, Gursoy H. Neutrophil/lymphocyte ratio in the diagnosis of childhood appendicitis. *Turk J Pediatr* 2010; 52:400-403.
128. Kahramanca S, Ozgehan G, Seker D, Gökce EI, Seker G, Tunç G, Küçükpınar T, Kargıcı H. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2014;20(1):19-22.
129. Shimizu T, Ishizuka M, Kubota K. A lower neutrophil to lymphocyte ratio is closely associated with catarrhal appendicitis versus severe appendicitis. *Surg Today* 2016;46(1):84-89.
130. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004;279:48487-490.
131. Paajanen H, Mansikka A, Laato M, et al. Novel serum inflammatory markers in acute appendicitis. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(8):579-84.
132. Buzukbese SS, Sarac F. Diagnostic Value of White Blood Cell and C-Reactive Protein in Pediatric Appendicitis. *Biomed Res Int*. DOI: 10.1155/2016/6508619.
133. Kwan KY, Nager AL. Diagnosing pediatric appendicitis: usefulness of laboratory markers. *Am J Emerg Med* 2010;28(9):1009-15.
134. Brown L, Elliott MR, Durbin DR. Diagnostic accuracy of C-reactiveprotein in children with suspected appendicitis. San Francisco, Ca: Pediatric Academic Societes Meeting; 2004.
135. Akhtar K, Kamalky-asl ID, Lamb WR, Laing I, Walton L, Pearson RC et al. Metabolic and inflammatory responses after laparoscopic and open inguinal hernia repair. *Ann R Coll Surg Engl* 1998;80(2):125-130.
136. Rothrock SG, Pagane J. Acute appendicitis in children: emergency department diagnosis and management. *Ann Emerg Med* 2000;36:39- 51.
137. Monsalve S, Ellwanger A, Montedonico S. White blood cell count and C-reactive protein together remain useful for diagnosis and staging of acute appendicitis in children. *S Afr Med J* 2017;107(9):773-776.

138. Kim E, Subhas G, Mittal VK, Golladay ES. C-reactive protein estimation does not improve accuracy in the diagnosis of acute appendicitis in pediatric patients. *Int J Surg* 2009;7(1):74-77.
139. Wu HP, Fu YC. Application with repeated serum biomarkers in pediatric appendicitis in clinical surgery. *Pediatr Surg Int* 2010;26(2):161-166.
140. Okamoto T, Sano K, Ogasahara K. Receiver-operating characteristic analysis of leukocyte counts and serum C-reactive protein levels in children with advanced appendicitis. *Surg Today* 2006;36(6):515-518.
141. Vons C, Barry C, Maitre S, Pautrat K, Leconte M, Costaglioli B *et al.* Amoxicillin plus clavulanic acid *versus* appendectomy for treatment of acute uncomplicated appendicitis: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 377:1573–1579.
142. Yu CW, Juan LI, Wu MH, Shen CJ, Wu JY, Lee CC. Systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of procalcitonin, C-reactive protein and white blood cell count for suspected acute appendicitis. *Br J Surg* 2013;100(3):322-9.
143. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 1998;92(9):3007-3017.
144. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598–625.
145. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes:neutrophils and monocytes. *Blood* 2008;112:935–45.
146. Krause JR, Costello RT, Krause J, Penchansky L. Use of the Technicon H-1 in the characterization of leukemias. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:889-894.
147. Ross DW, Bentley SA.. Evaluation of an automated hematology system (Technicon H-1). *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:803-808.
148. Gulley ML, Bentley SA, Ross DW. Neutrophil myeloperoxidase measurement uncovers masked megaloblastic anemia. *Blood* 1990;76:1004-1007.
149. Eivazi-Ziaei J, Dastgiri S, Sanaat ZRK. Estimation of the diagnostic value of myeloperoxidase index and lactate dehydrogenase in megaloblastic anemia. *J Clin Diagn Res* 2007;1:380–4.
150. Yonezawa K, Horie O, Yoshioka A, Matsuki S, Tenjin T, Tsukamura Y, *et al.* Association between the neutrophil myeloperoxidase index and subsets of bacterial infections. *Int J Lab Hematol* 2010;32:598-605.

151. Yonezawa K, Morimoto N, Matsui K, Tenjin T, Yoneda M, Emoto T, et al. Significance of the Neutrophil Myeloperoxidase Index in Patients with Atherosclerotic Diseases. *Kobe J Med Sci* 2013;58(5):E128-37.
152. Nikulshin S, Tolstikova I, Bartule A, Kviluna D, Gravele D, Gardovska D. Intracellular neutrophil myeloperoxidase level in pediatric patients: significant age and gender variability. *Int J Lab Hematol* 2015;37:120-124.
153. Romeo C, Crucetti A, Turiaco A, Impellizzeri P, Turiaco N, Di Bella C, et al. Monocyte and neutrophil activity after minor surgical stress. *J Pediatr Surg* 2002; 37(5):741-4.
154. Ciepichał J, Kübler A. Effect of general and regional anesthesia on some neutrophil functions. *Arch Immunol Ther Exp* 1998;46(3):183-92.
155. Tabuchi Y, Shinka S, Ishida H. The effects of anesthesia and surgery on count and function of neutrophils. *J Anesth* 1989;3(2):123-31.
156. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173–82.
157. Yong-Jun Liu, et al. TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annu Rev Immunol* 2007. 25:193–219.
158. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol* 2001;47(4):695-702.
159. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997;2:12-26.
160. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:933–944.
161. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 2009;39:2076–2082.
162. Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2005;25(2):75-102.
163. Mesquita D Jr, Kirsztajn GM, Franco MF, Reis LA, Perazzio SF, Mesquita FV et al. CD4+ T helper cells and regulatory T cells in active lupus nephritis: an imbalance towards a predominant Th1 response? *Clin Exp Immunol* 2018;191(1):50-59.
164. Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 2012;3:274.

165. Jotwani R, Moonga BS, Gupta S, Cutler CW. Nuclear factor-kappaB p50 subunits in chronic periodontitis and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192:278–285.
166. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ et al. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun* 2012;39:294–303.
167. Tew JG, El Shikh ME, El Sayed RM, Schenkein. Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation. *J Dent Res* 2012;91:8–16.
168. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2011;38:509–516.
169. Laurence A, O’Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* 2007;8:903-905.
170. Mark H. Kaplan. Th9 cells: differentiation and disease *Immunol Rev* 2013;252(1):104–115.
171. Jia L, Wu C. Differentiation, regulation and function of Th9 cells. *Adv Exp Med Biol* 2014;841:181-207.
172. Shevach EM. Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol* 2011;112:137-76.
173. Jandl C, Loetsch C, King C. Cytokine Expression by T Follicular Helper Cells. *Methods Mol Biol* 2017;1623:95-103.
174. Aziz N. Measurement of Circulating Cytokines and Immune-Activation Markers by Multiplex Technology in the Clinical Setting: What Are We Really Measuring? *Forum ImmunDis Ther* 2015;6:19-22.
175. Türkyilmaz Z, Sönmez K, Karabulut R, Elbeğ S, Moralioglu S, Demirtola A et al. Sequential cytokine levels in the diagnosis of appendicitis. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66(8):723-31.
176. Wang Y, Reen DJ, Puri P. Is a histologically normal appendix following emergency appendectomy always normal? *Lancet* 1996;347:1076-9.
177. Hachim MY, Ahmed AH. The role of the cytokines and cell-adhesion molecules on the immunopathology of acute appendicitis. *Saudi Med J* 2006;27:1815-21.
178. Dalal I, Somekh E, Bilker-Reich A, Boaz M, Gorenstein A, Serour F. Serum and peritoneal inflammatory mediators in children with suspected acute appendicitis. *Arch Surg* 2005;140:169-73.

179. Míguez C, Tomatis SC, Haro A, Guerrero G, Pérez-Egido L, García-Gamiz M et al. Evaluation of proadrenomedullin as a diagnostic or prognostic biomarker of acute appendicitis in children. *Am J Emerg Med* 2016;34(12):2298-2305.
180. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9–18.
181. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601.
182. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633–52.
183. Arend WP, Gabay C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res*. 2000;2(4):245–8.
184. Man SM, Kanneganti T-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 2016;16(1):7-21.
185. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES et al. Basophils Produce IL-4 and Accumulate in Tissues after Infection with a Th2-inducing Parasite. *The Journal of Experimental Medicine* 2004;200(4):507-517.
186. McLeod JJ, Baker B, Ryan JJ. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine*. 2015;75(1):57-61.
187. Wang M, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived. *Clin Immunol* 1999;90(1):47-54.
188. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):721-32.
189. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 Immunity. *Cytokine* 2015;75(1):25-37.
190. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(10):a016295.
191. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical immunology* 2009;130(1):27-33.
192. Tajika K, Ikebuchi K, Inokuchi K, Hasegawa S, Dan K, Sekiguchi S et al. IL-6 and SCF exert different effects on megakaryocyte maturation. *Br J Haematol* 1998;100(1):105-11.

193. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101(2):311-320.
194. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10(5):593-619.
195. Hébert CA, Luscinskas FW, Kiely JM, Luis EA, Darbonne WC, Bennett GL et al. Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J Immunol* 1990;145(9):3033-40.
196. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: Relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996; 87: 4245-54.
197. Zeillemaker AM, Hoyneck van Papendrecht AA, Hart MH, Roos D, Verbrugh HA, Leguit P. Peritoneal interleukin-8 in acute appendicitis. *J Surg Res* 1996;62(2):273-7.
198. Kevin N. Couper, Daniel G. Blount and Eleanor M. Riley. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* 2008;180:5771-5777.
199. Trinchieri G: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;84(12):4008–27.
200. Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, et al.: Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. *J Immunol* 2001;167(1):221–7.
201. Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol* 2002;22(5-6):373-90.
202. Méndez-Samperio P. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int J Infect Dis* 2010;14(5):e366-71.
203. Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, Meier-Schellersheim M, Yamane H, Donnelly RP et al. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammac regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med* 2008. 205: 2595-608.
204. Kasaian MT, Miller DK. IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol* 2008 Jul 15;76(2):147-55.

205. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003;21:425-56. Epub 2001 Dec 19.
206. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK et al. Human IL-17: A novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155:5483–5486.
207. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:155–174.
208. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 2007;17:435–440.
209. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467–476.
210. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 2008;43(3):402-7.
211. Roesch F, Richard L, Rua R, Porrot F, Casartelli N, Schwartz O. Vpr Enhances Tumor Necrosis Factor Production by HIV-1-Infected T Cells. *J Virol* 2015;89(23):12118-30.
212. Efimov GA, Kruglov AA, Tillib SV, Kuprash DV, Nedospasov SA. Tumor Necrosis Factor and the consequences of its ablation in vivo. *Mol Immunol* 2009;47(1):19-27.
213. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2010;20(2):87-103.
214. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(3-4):185-91.
215. Sack U, Biereder B, Elouahidi T, Bauer K, Keller T, Tröbs RB. Diagnostic value of blood inflammatory markers for detection of acute appendicitis in children. *BMC Surg* 2006;6:15.
216. Xu S, Höglund M, Håkansson L, Venge P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines in vivo. *Br J Haematol* 2000;108(4):848-53.
217. Sung L, Dror Y. Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor. *Front Biosci* 2007;12:1988–2002.
218. Allister L, Bachur R, Glickman J, Horwitz B. Serum markers in acute appendicitis. *J Surg Res* 2011;168(1):70-5.
219. Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 1996;59(1):61-6.

220. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT et al. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988;167(2):570-81.
221. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001;2(12):1126-32.
222. Colotta F, Borré A, Wang JM, Tattaneli M, Maddalena F, Polentarutti N et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1992;148(3):760-5.
223. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2009;29(6):313-326.
224. Zviedre A, Engelis A, Tretjakovs P, Jurka A, Zile I, Petersons A. Role of serum cytokines in acute appendicitis and acute mesenteric lymphadenitis among children. *Medicina* 2016;52(5):291-297.
225. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 1998;10(5):383-90.
226. Tilg H, Peschel C. Interferon-alpha and its effects on the cytokine cascade: a pro- and anti-inflammatory cytokine. *Leuk Lymphoma* 1996;23(1-2):55-60.
227. Evereklioglu C, Er H, Turkoz Y, Cekmen M. Serum levels of TNF-alpha, IL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behcet's disease. *Mediators Inflamm* 2002;11(2):87-93.
228. Chia YW, Carachi R, Armstrong AA, McGarry GW, Carrington D. Serum alpha interferon in children with right iliac fossa pain. *J R Soc Med* 1993;86(5):259-60.
229. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96:41-101.
230. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II). *Clin Ter* 2006;157(4):377-86.
231. Hachim MY, Ahmed AH. The role of the cytokines and cell-adhesion molecules on the immunopathology of acute appendicitis. *Saudi Med J* 2006;27(12):1815-21.
232. Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis* 2004;172(2):299-308.



233. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P et al. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):478-85.
234. Sato H, Usuda N, Kuroda M, Hashimoto S, Maruta M, Maeda K. Significance of serum concentrations of E-selectin and CA19-9 in the prognosis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(11):1073-80.
235. Brochhausen C, Bittinger F, Schmitt VH, Kommoss F, Lehr HA, Heintz A et al. Expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in so-called 'negative' appendices: first results to support the pathological diagnosis in borderline cases. *Eur Surg Res* 2010;45(3-4):350-5.
236. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 2000;28(9):1379-86.
237. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physio* 2008;295(3):926-927.
238. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 2004;15(2):91-8.
239. Liu M, Guo S, Stiles JK. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncology Letters* 2011;2(4):583-589.
240. Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2004;35(1):43-51.
241. Falconer K, Askarieh G, Weis N, Hellstrand K, Alaeus A, Lagging M. IP-10 predicts the first phase decline of HCV RNA and overall viral response to therapy in patients co-infected with chronic hepatitis C virus infection and HIV. *Scand J Infect Dis* 2010;42:896-901.
242. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(10):616-30.
243. Rezende RM, da Cunha AP, Kuhn C, Rubino S, M'Hamdi H, Gabriely G et al. Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing  $\gamma\delta$  T cells. *Nat Commun* 2015;6:8726.
244. Janeway CA, Travers MW, Shlomcick MJ. Immunobiology – the Immune System in Health and Disease, 6th edn. New York: Garland Science Publishing, 2004.
245. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55–66.

246. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001;22:450–457.
247. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol* 2001;123:294–300.
248. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000* 2007;43:14–40.
249. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Ávila-Campos MJ et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect* 2008;10:489–496.
250. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2011;38:509–516.
251. Laurence A, O’Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* 2007;8:903–905.
252. Rubér M, Berg A, Ekerfelt C, Olaison G, Andersson RE. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;143(1):117-124.
253. B. Toorenvliet, A. Vellekoop, R. Bakker, F. Wiersma, B. Mertens, J. Merkus. Clinical differentiation between acute appendicitis and acute mesenteric lymphadenitis in children. *Eur J Pediatr Surg* 2011;21:120-123.
254. Erkasap S, Ates E, Ustuner Z, Sahin A, Yilmaz S, Yasar B, Kiper H. Diagnostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in acute appendicitis. *Swiss Surg* 2000;6(4):169-72.
255. Brănescu C, Serban D, Dascălu AM, Oprescu SM, Savlovschi C. Interleukin 6 and lipopolysaccharide binding protein - markers of inflammation in acute appendicitis. *Chirurgia (Bucur)* 2013;108(2):206-14.
256. Eriksson S, Granström L, Olander B, Wretling B. Sensitivity of interleukin-6 and C-reactive protein concentrations in the diagnosis of acute appendicitis. *Eur J Surg* 1995;161(1):41-5.
257. Paajanen H, Mansikka A, Laato M, Kettunen J, Kostianen S. Are serum inflammatory markers age dependent in acute appendicitis? *J Am Coll Surg* 1997;184(3):303-8.
258. Goodwin AT, Swift RI, Bartlett MJ, Fernando BS, Chadwick SJ. Can serum interleukin-6 levels predict the outcome of patients with right iliac fossa pain? *Ann R Coll Surg Engl* 1997;79(2):130-3.

259. Yildirim O, Solak C, Koçer B, Unal B, Karabeyoğlu M, Bozkurt B, Aksaray S, Cengiz O. The role of serum inflammatory markers in acute appendicitis and their success in preventing negative laparotomy. *J Invest Surg* 2006;19(6):345-52.
260. Eriksson S, Granström L, et al. Laboratory tests in patients with suspected acute appendicitis. *Acta Chir Scand* 1989;155:117–120.
261. Waal MR, Abrams J. Interleukin-10 inhibits cytokines synthesis by human monocytes: An auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209–1020.
262. Eriksson S, Olander B, Pira U, Granström L. White blood cell count, leucocyte elastase activity, and serum concentrations of interleukin-6 and C-reactive protein after open appendectomy. *Eur J Surg* 1997;163(2):123-7.
263. Hata H. Bone lesions and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1a) in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2005;46(7):967-72.
264. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(6):455-81.
265. Noguchi A, Watanabe K, Narumi S, Yamagami H, Fujiwara Y, Higuchi K et al. The production of interferon-gamma-inducible protein 10 by granulocytes and monocytes is associated with ulcerative colitis disease activity. *J Gastroenterol* 2007;42(12):947-56.
266. Clifford V, Tebruegge M, Zufferey C, Germano S, Denholm J, Street A et al. Serum IP-10 in the diagnosis of latent and active tuberculosis. *J Infect* 2015;71(6):696-8.
267. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001;344(11):808-14.
268. Cluitmans FH, Esendam BH, Veenhof WF, Landegent JE, Willemze R, Falkenburg JH. Extramedullary hematopoietic growth factor and cytokine gene expression indicate endocrine regulation of hematopoiesis in patients with acute appendicitis. *Ann Hematol* 1997;75(5-6):201-5.
269. Holzheimer RG, Schein M, Wittmann DH. Inflammatory response in peritoneal exudate and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. *Arch Surg* 1995;130(12):1314-9.
270. Herwig R, Glodny B, Kühle C, Schlüter B, Brinkmann OA, Strasser H et al. Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. *Dis Colon Rectum* 2002;45(4):514-21.

271. Uğraş B, Giriş M, Erbil Y, Gökpınar M, Citlak G, İşsever H et al. Early prediction of anastomotic leakage after colorectal surgery by measuring peritoneal cytokines: prospective study. *Int J Surg* 2008;6(1):28-35.
272. Yamamoto T, Umegae S, Matsumoto K, Saniabadi AR. Peritoneal cytokines as early markers of peritonitis following surgery for colorectal carcinoma: a prospective study. *Cytokine* 2011;53(2):239-42.
273. Topley N, Jörres A, Luttmann W, Petersen MM, Lang MJ, Thierauch KH et al. Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: induction by IL-1 beta and TNF alpha. *Kidney Int* 1993;43(1):226-33.
274. Xiao J, Gong Y, Chen Y, Yu D, Wang X, Zhang X et al. IL-6 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells possibly through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;313(2):310-318.
275. Mahamid A, Jabarin B, Almogy G. Systemic Inflammatory Response during Laparotomy. *Int J Inflamm* 2014;2014:674303.
276. Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Abel PD, Williamson RC, Thompson JN. Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg* 1996;83(3):347-8.
277. Sista F, Schietroma M, Santis GD, Mattei A, Cecilia EM, Piccione F et al. Systemic inflammation and immune response after laparotomy vs laparoscopy in patients with acute cholecystitis, complicated by peritonitis. *World J Gastrointest Surg* 2013;5(4):73–82.
278. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85(1):9-18.
279. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(5):878-88.
280. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(5):878-88.
281. Chen ZY, Raghav K, Lieu CH, Jiang ZQ, Eng C, Vauthey JN et al. Cytokine profile and prognostic significance of high neutrophil-lymphocyte ratio in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015;112(6):1088-97.
282. Saied A, Licata L, Burga RA et al. Neutrophil:lymphocyte ratios and serum cytokine changes after hepatic artery chimeric antigen receptor modified T cell infusions for liver metastases. *Cancer gene therapy* 2014;21(11):457-462.

283. Groselj-Grenc M, Repse S, Dolenc-Strazar Z, Hojker S, Derganc M. Interleukin-6 and lipopolysaccharide-binding protein in acute appendicitis in children. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67(2):197-206.
284. Gürleyik G, Gürleyik E, Cetinkaya F, Unalmiser S. Serum interleukin-6 measurement in the diagnosis of acute appendicitis. *ANZ J Surg* 2002;72(9):665-7.
285. Yang HR, Wang YC, Chung PK, Chen WK, Jeng LB, Chen RJ. Laboratory tests in patients with acute appendicitis. *ANZ J Surg* 2006;76(1-2):71-4.
286. Eklund CM. Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv Clin Chem* 2009;48:111-36.
287. Rezende-Neto JB, Moore EE, Melo de Andrade MV, Teixeira MM, Lisboa FA, Arantes RM et al. Systemic inflammatory response secondary to abdominal compartment syndrome: stage for multiple organ failure. *J Trauma* 2002;53(6):1121-8.
288. von Elten KA, Duran LL, Banks TA, Banks TA, Collins LC, Collins LC. Systemic inflammatory reaction after pneumococcal vaccine: a case series. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10(6):1767-70.
289. Lord JM, Midwinter MJ, Chen Y-F, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet* 2014;384(9952):1455-1465.
290. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, et al. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998;351:950–953.
291. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, et al. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000;181:176–180.
292. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, et al. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med* 2001;29:129–133.
293. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:316–321.
294. Wong HR, Salisbury S, Xiao Q et al. The pediatric sepsis biomarker risk model. *Critical Care* 2012;16(5):R174.
295. Salö M, Marungruang N, Roth B et al. Evaluation of the microbiome in children's appendicitis. *International Journal of Colorectal Disease* 2017;32(1):19-28.
296. Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* 2014;157(1):121-141.

297. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology* 2009;9(5):313-323.
298. Ergul E. Heredity and familial tendency of acute appendicitis. *Scand J Surg* 2007;96(4):290-2.
299. Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC et al. Innate Immunity Genes Influence the Severity of Acute Appendicitis. *Annals of Surgery* 2004;240(2):269-277.
300. Kristjansson RP, Benonisdottir S, Oddsson A, Galesloot TE, Thorleifsson G, Aben KK et al. Sequence variant at 4q25 near PITX2 associates with appendicitis. *Sci Rep* 2017;7(1):3119.
301. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(5):541-547.
302. Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, Revillard JP. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(4):267-85.