

На правах рукописи



Горохов Константин Родионович

**Патоморфологические особенности воспаления червеобразного отростка у детей
с COVID-19**

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Официальные оппоненты:

Черняев Андрей Львович – Заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России, отдел фундаментальной пульмонологии, лаборатория патологической анатомии, главный научный сотрудник

Карев Вадим Евгеньевич – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел патоморфологии, заведующий отделом

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» «сентября» 2025 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>
Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В течение трех лет пандемия (была объявлена ВОЗ в марте 2020 г.) новой коронавирусной инфекции (COVID-19) была чрезвычайной ситуацией для здравоохранения и населения всего земного шара: она затронула не только здоровье людей, но и привнесла ряд социально-экономических проблем в жизнь каждого человека в мире [Коган Е.А. с соавт., 2021; С. Huang et al., 2020]. По данным ВОЗ, на 19.10.2024 г. было зарегистрировано 776 млн. случаев заболевания и 7 млн. смертей. У пациентов, с COVID-19 были выявлены различные симптомы, связанные с поражением дыхательной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, репродуктивной и других систем [Демяшкин Г.А. с соавт., 2023; Cereda D. et al., 2020]. Такое разнообразие проявлений данного заболевания свидетельствует о мультисистемном характере, которое нередко заканчивается инвалидизацией пациентов или, даже летальным исходом [Heesakkers H. et al., 2022; Hodgson C.L. et al., 2021]. Для совершенствования диагностики, лечения COVID-19 и профилактики его осложнений в том числе в отдаленные сроки (например, постковидный синдром) необходимо расширить уже имеющиеся представления о ключевых звеньях патогенеза.

В то же время особый интерес представляет заболеваемость COVID-19 у детей. При этом, стоит отметить, что педиатры часто сталкиваются с определенными сложностями при диагностировании: во-первых – у большинства детей отмечается «стертость» или мимикрия основных клинических признаков COVID-19, свойственных для взрослых; во-вторых – наличие возрастных физиологических изменений развивающегося организма, в том числе компенсаторного характера, несостоятельность и зыбкость иммунитета, сопровождающиеся «колебанием» ключевых иммунологических процессов как на системном, так и на местном уровнях; в третьих – затруднение сбора анамнеза у детей младшей возрастной группы; в четвертых – несовершенство социальной адаптации и психоэмоциональная лабильность и др.

Согласно данным специализированной литературы COVID-19 у детей, как правило, протекает бессимптомно или в легкой форме [Nikolopoulou, G. V. et al., 2022; A. Lo Vecchio et al., 2021]. В то же время описаны случаи тяжелого течения, проявляющиеся гетерогенностью симптомов, которые частично совпадают с признаками болезни Кавасаки или синдрома токсического шока и объединены в мультисистемный воспалительный синдром.

Учитывая, что у детей с COVID-19 можно наблюдать отчасти схожие клиническую картину и патоморфологические изменения как при МВС, так и при остром аппендиците это актуализирует проведение исследований в данном направлении для разработки диагностического алгоритма и выбора тактики лечения. В том числе, спорным остается вопрос

об ассоциации острого аппендицита с COVID-19 у детей [Кадыркулов, А. Ж. с соавт. 2021; Г. А. Демяшкин с соавт., 2021].

Этиология и патогенез воспаления червеобразного отростка в настоящее время до конца не изучен, однако по современным представлениям оно начинается с обструкции просвета органа, что приводит к компрессии лимфатических и кровеносных сосудов. Достоверно подтверждено, что в роли инициатора патологического процесса могут выступать различные инфекционные агенты, что не исключает участие SARS-CoV-2 в качестве ведущего этиологического фактора [Jones M.W et al., 2021; Bhangu A. et al., 2015], что требует более детального изучения.

Таким образом, целесообразно расширить представление об этиопатогенезе острого аппендицита у детей с COVID-19, в связи с чем необходимо проведение анализа морфологических и молекулярно-биологических изменений червеобразного отростка, особенностей локального иммунного ответа на SARS-CoV-2 инвазию в разных возрастных группах.

Степень разработанности темы исследования

Острый аппендицит является самым распространенным заболеванием в неотложной хирургии у детей, пик его приходится на старшую возрастную группу [Z. Pogorelić et al., 2022]. Большинство авторов указывают на затруднение постановки диагноза острого аппендицита у детей в период пандемии COVID-19, а также на учащение случаев перитонита, в том числе разлитого с гнойным компонентом [Z. Pogorelić et al., 2022]. В этих немногочисленных работах преимущественно описан клинический аспект при малой выборке [Haithem H.A. et al., 2022; Koloamatangi M. et al., 2022; Ayyıldız H.N. et al., 2022]. Авторы указывают на значительное повышение маркеров воспаления, таких как CD3, CD20, CD5, CD4, CD8 [Fabi M. et al., 2022; Anderson J.E. et al., 2021]. SARS-CoV-2 обнаружен только при ПЦР в режиме реального времени без дополнительной верификации в структурах червеобразного отростка посредством проведения иммуногистохимических реакций с антителами к нуклеокапсиду или Spike-белку. Кроме того, не акцентирована роль рецепторов, обеспечивающих SARS-CoV-2 инвазию, таких как АПФ2, фурин или CD147 и др. Недостаточно внимания уделено роли макрофагов и продукции ключевых цитокинов. Данные исследования частично раскрывают основные патогенетические механизмы, при этом не учитывая возрастные особенности.

Таким образом, разрозненность и противоречивость данных об остром аппендиците у детей с COVID-19, не дают полной информации о клинико-эпидемиологическом, иммунологическом и прогностическом аспектах, что требует выявления и оптимизации клинических и диагностических критериев.

Патогенетические механизмы, морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика аппендицита у детей с COVID-19 являются предметом дискуссии среди патологов, детских хирургов и педиатров. В связи с этим, крайне актуально проведение комплексного исследования червеобразных отростков у детей-пациентов с COVID-19 с применением гистологического, морфометрического, иммуногистохимического, ISH, молекулярно-генетического и других методов для установления ключевых механизмов цитопатического действия SARS-CoV-2 на структуры органа.

Цель и задачи исследования

Цель работы – выявление морфофункциональных и молекулярно-биологических особенностей червеобразного отростка у детей-пациентов с COVID-19.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный морфологический и морфометрический анализ червеобразных отростков у детей разных возрастов при остром аппендиците «ПЦР+» и «ПЦР-» на SARS-CoV-2 и контрольной группой.
2. Обнаружить SARS-CoV-2 в червеобразных отростках у детей с COVID-19 и оценить изменение экспрессии АПФ2 и сериновой протеазы фурина.
3. Определить клеточный характер воспалительного инфильтрата червеобразного отростка при остром аппендиците у детей с COVID-19 на основании уровней экспрессии CD3, CD4, CD20 и CD138; макрофагов CD68 и CD163.
4. Оценить состояние цитокинового баланса в червеобразных отростках при остром аппендиците у детей с COVID-19 на основании уровней экспрессии провоспалительных (IL-1, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) маркеров.
5. Обозначить патогенетические механизмы поражения червеобразного отростка у детей с COVID-19.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы в первую очередь связана с описанием патологической анатомии острого аппендицита у детей с подтвержденным COVID-19 разных возрастных групп: преобладание флегмонозно-язвенной и гангренозной морфологических форм.

Впервые выявлены патоморфологические особенности острого аппендицита у детей разных возрастных групп после SARS-CoV-2-инвазии. В стенке червеобразного отростка признаки аппендицита преимущественно вирусной этиологии: выраженная плазмоцитарная, лимфоцитарная и нейтрофильная инфильтрация, эндотелиит и множество интраваскулярных тромбов, полнокровие кровеносных сосудов.

Впервые выявлена инвазия SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки, иммунокомпетентные клетки и эндотелий червеобразного отростка детей. У COVID-19-положительных пациентов выявлено значительное увеличение количества АПФ2 и Фурина в гомогенате червеобразного отростка.

Впервые описан характер клеточного воспалительного инфильтрата при проведении иммуногистохимических реакций в червеобразном отростке у детей-пациентов с COVID-19 разных возрастных групп: увеличение субпопуляций иммунных клеток, а также уровней про- и противовоспалительных цитокинов. Показано увеличение количества CD163+ M2-макрофагов в червеобразных отростках у детей с COVID-19. Выявлен дисбаланс провоспалительных (IL-1, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в червеобразных отростках у детей в ответ на SARS-CoV-2 инвазию.

Теоретическая и практическая значимость работы

У детей с COVID-19 разных возрастных групп SARS-CoV-2 инвазия приводит к деструктивным изменениям в червеобразных отростках: преобладание флегмонозно-язвенного и гангренозного аппендицита. У детей-пациентов с COVID-19 клеточный воспалительный инфильтрат указывает на повышение количества иммунных клеток и экспрессию интерлейкинов. При воспалении показана роль CD68-макрофагов и CD138-плазматических клеток в обеспечении адаптивно-приспособительных и регенеративных механизмов в червеобразных отростках у детей с новой коронавирусной инфекцией. Повышение экспрессии АПФ2 и фурина обеспечивает SARS-CoV-2 инвазию в эпителиальные клетки червеобразного отростка.

Полученные в ходе проведения исследования результаты можно использовать в диагностике аппендицита у детей с COVID-19, это необходимо для совершенствования методов этиотропной и патогенетической терапии в дополнение к хирургическому лечению.

По результатам настоящего исследования **решена актуальная научная задача** – выявлены морфологические изменения червеобразного отростка у детей с новой коронавирусной инфекцией, раскрыты механизмы SARS-CoV-2 инвазии и особенности локального иммунного ответа.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проводили на червеобразных отростках 42 детей-пациентов с установленным диагнозом «Новая коронавирусная инфекция» и контрольными группами, умерших вне пандемии COVID-19. Автором проведен анализ медицинской документации детей-пациентов с COVID-19 и других исследуемых групп. Методы исследования: клиничко-лабораторный, гистологический, иммуногистохимический, морфометрический, молекулярно-генетический, статистический.

Положения, выносимые на защиту

1. При остром аппендиците у детей с новой коронавирусной инфекцией преобладают деструктивные формы (флегмонозно-язвенная, гангренозная), характеризующиеся увеличением толщины стенки и уменьшением внутрипросветного диаметра, а также гиперплазией лимфоидной ткани, полнокровием кровеносных сосудов с наличием микротромбов.

2. Обнаружение SARS-CoV-2 преимущественно в эпителии червеобразных отростков у детей с новой коронавирусной инфекцией, а также увеличение экспрессии CD- популяций иммунных клеток (CD138+, CD20+, CD68+) про- и противовоспалительных цитокинов и рецепторов АПФ2 и фурина, свидетельствуют о наличии РНК вируса и не исключает COVID-19-ассоциированную природу аппендицита.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения, сформированы группы с однородной выборкой из 135 пациентов, в том числе 42 детей с установленным клиническим диагнозом «Новая коронавирусная инфекция».

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Медицинские данные пациентов были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну.

Для всех количественных данных проводили проверку на нормальность. При нормальном распределении вычисляли среднее групповое арифметическое (M) и стандартную ошибку (SE) / стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Полученные в результате подсчета данные иммуногистохимического и морфометрического исследований обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Сравнения проводили с использованием дисперсионного анализа. Для проверки выборки на нормальность распределения использовали Критерий Шапиро-Уилка. Для определения корреляции использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

Полученные основные результаты научной работы были доложены и обсуждены на научных конференциях: «60 лет НИИ Морфологии человека им. акад. А.П. Авцына» (г. Москва, 2022 г.); «Окружающая среда и здоровье населения» (г. Курск, 2023 г.).

Апробация диссертационной работы состоялась на научной конференции Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 14.02.2024 г.).

Личный вклад автора

Все этапы проведенного научного исследования: постановка цели и задач, выбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, а также новизны полученных результатов, выполнены автором самостоятельно. Автором лично проведен подбор и анализ научной литературы в русле выбранной темы, разработан дизайн исследования, скомплектованы базы данных пациентов и цифровой архив изображений, к анализу привлечен комплекс современных методов патологической анатомии. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял гистологическое, морфометрическое, иммуногистохимическое (на маркеры CD3, CD4, CD20, CD138, CD68, IL1, IL4, IL6, IL10 клеток), молекулярно-генетическое (мРНК SARS-CoV-2 ISH, ПЦР-РВ на ангиотензинпревращающий фермент 2, фурин) исследования биопсийного и аутопсийного материала – червеобразного отростка детей с COVID-19, проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую практику патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы» (Акт внедрения (использования) новой технологии б/н от 16.01.2024 г.).

Полученные в ходе исследования результаты включены и используются в учебном процессе отдела патоморфологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении дисциплины «Патологическая анатомия» ординаторами по направлению подготовки (специальности) 31.08.07 Патологическая анатомия (Акт внедрения б/н от 17.01.2024 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует отрасли медицинских наук, паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, в области исследования согласно пунктам: 1, 2, 3, 4.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Разделы и главы диссертационной работы: введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные результаты, заключение с обсуждением полученных результатов, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Последний содержит 200 источников литературы: 23 отечественных и 177 зарубежных. Материалы диссертации изложены на 107 страницах машинописного компьютерного текста и иллюстрированы 19 рисунками (микрофотографиями, рисунками-графиками), 14 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала

Согласно анамнестическим, клиническим (симптомы, назофарингеальный мазок, КТ легких) и морфологическим данным были сформированы следующие группы: I (n = 42; возрастом от 2 до 18 лет, средний – 10,8 лет) – операционный материал червеобразных отростков после аппендэктомии у детей с установленным клиническим диагнозом: коронавирусная инфекция (COVID-19, ПЦР+); II (n = 55; возрастом от 2 до 18 лет, средний – 9,7 лет) – операционный материал червеобразных отростков после аппендэктомии у детей с установленным клиническим диагнозом: острый аппендицит; получены до начала пандемии COVID-19 (за период 2017 – 2019 гг.); III (n = 38; возрастом от 2 до 18 лет, средний – 10,3 лет) – контрольная группа. Аутопсийный материал интактных червеобразных отростков, полученных не позднее 6 часов после констатации биологической смерти (таблица 1).

Макроскопические признаки наличия воспалительного и/или опухолевого процесса отсутствовали. Критерии исключения во всех группах: группа детских инфекций, эндокринные заболевания, аутоиммунные заболевания, сепсис, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты В и С, сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника, лимфопролиферативные заболевания.

Таблица 1 – Возрастная периодизация детей (Ваганов П.Д. с соавт., 2018)

Группа	n
COVID-19	
3 – 7 (первый период детства, младшее детство)	9
7 – 12 (второй период детства, детство)	13
12 – 18 (старший школьный возраст, подростки)	20
Острый аппендицит	
3 – 7 (первый период детства, младшее детство)	15
7 – 12 (второй период детства, детство)	19
12 – 18 (старший школьный возраст, подростки)	21
Контроль	
3 – 7 (первый период детства, младшее детство)	8
7 – 12 (второй период детства, детство)	13
12 – 18 (старший школьный возраст, подростки)	17

Методы исследования

После извлечения оценивали внешний вид червеобразных отростков и мезоаппендикса. Фрагменты червеобразных отростков (из трех участков: основание, середина, верхушка) фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина в течение 72 часов с фосфатным буфером, → дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации, → заливали в парафин, → нарезка парафиновых блоков толщиной около 3 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, готовили для гистохимического и иммуногистохимического исследований.

Методы исследования: а) гистологический; б) морфометрический (длина органа, толщина стенки, диаметр (наружный и внутренний), глубина кишечных крипт, наибольший диаметр лимфоидного фолликула при максимальной толщине); в) иммуногистохимический. Иммуногистохимическое исследование на CD маркеры проводили в иммуногистостейнере (Bond-Max «Leica», Германия). Первичные антитела – готовые к использованию (Ready-to-use, RTU; Leica) к: CD3 (клон LN10), CD4 (клон 4B12), CD20 (клон MJ1), CD138 (клон MI15), CD68 (клон 514H12), CD163 (клон 10D6). Количество CD-позитивных клеток определяли при компьютерной морфометрии в 10 полях зрения суммарной площадью 1,6 мм², затем количественную плотность CD+ клеток на 1 мм² рассчитывали по формуле [Демяшкин Г.А. с соавт., 2023] и переводили в балльную шкалу, где 1 балл – менее 5 CD+ клеток, 2 балла – от 5 до 15 CD+ клеток, 3 балла – от 15 до 25 CD+ клеток, 4 балла – от 25 до 45 CD+ клеток. Иммуногистохимические реакции на интерлейкины проводили в ручном режиме. Первичные антитела (ThermoFisher) к: IL-1 beta (разведение 1:100), IL-4 (разведение 1:100), IL-6 (разведение 1:100), IL-10 (разведение 1:100). Вторичные – универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Количество клеток после ИГХ-реакции с антителами к

провоспалительным и противовоспалительным цитокинам подсчитывали в процентном отношении на 1 мм²; г) *in situ* гибридизация на РНК SARS-CoV-2; д) полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для выявления SARS-CoV-2 и анализа экспрессии генов АПФ2 и фурина; е) статистический. Микроскопирование проводили с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп Leica DM2000) с использованием программного обеспечения Leica Application Suite, Version 4.9.0. Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи программы анализа изображений ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика пациентов

Клинический анализ проводили на 42 детей-пациентах с острым аппендицитом с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией, 55 пациентах с острым аппендицитом и 38 умерших вне пандемии COVID-19. Всем детям I и II группы была выполнена лапароскопическая аппендэктомия. Диагноз у всех пациентов I группы (n=42), согласно медицинской документации: Основное заболевание – Новая коронавирусная инфекция (подтвержденная результатами назофарингеального мазка ПЦР+). Сопутствующее заболевание – Острый аппендицит. У детей всех возрастов наблюдали среднюю степень тяжести состояния, обусловленную течением острой хирургической патологии – острым аппендицитом. В общем анализе крови у всех пациентов (n=42) отмечали лейкоцитоз со смещением лейкоцитарной формулы влево; СОЭ – ускорение. При ультразвуковом исследовании у всех пациентов (n=42) были выявлены признаки острого аппендицита: в правой подвздошной области визуализировалась тубулярная структура с увеличением диаметра, утолщением стенок в поперечном сечении. Всем пациентам была выполнена лапароскопическая аппендэктомия. Осложнений в постоперационный период не обнаружили; заживление операционной раны – первичным натяжением; дети были выписаны в среднем на 8 сутки после операции. Смерть пациентов, умерших вне пандемии COVID-19 (контрольная группа), наступила в результате декомпенсации или осложнения течения ряда заболеваний: врожденные пороки развития, спонтанное нетравматическое субарахноидальное кровоизлияние в области мозжечка с прорывом в желудочковую систему головного мозга, синдром Гудпасчера: диффузный гломерулонефрит с глобулярными отложениями фибрина, сегментарным некрозом и полулуниями и др.

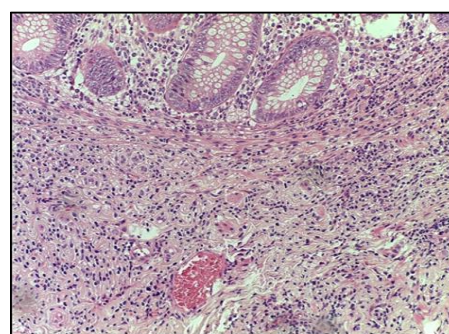
Морфологическая и морфометрическая характеристика червеобразных отростков пациентов

Во всех образцах червеобразных отростков у детей I группы наблюдали следующие морфологические формы острого аппендицита [«Патологическая анатомия. Национальное

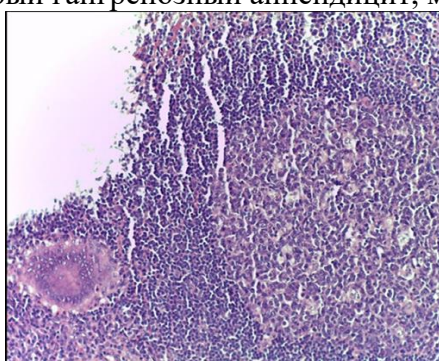
руководство», под ред. М.А. Пальцева и соавт., 2013 г.]: простой аппендицит (n=1), флегмонозно-язвенный аппендицит (n=33) и гангренозный аппендицит (n=8). Особенности флегмонозно-язвенного аппендицита. Макроскопически: червеобразные отростки были увеличены в размерах, серозная оболочка тусклая, гиперемирована, стенка отечна, с наличием гнойных пленок, распространяющихся на брыжейку. При микроскопическом исследовании отмечали отек стенки, полнокровие кровеносных сосудов с наличием микротромбов, расширение крипт, гиперплазию лимфоидной ткани и диффузную лейкоцитарную инфильтрацию слизистой и подслизистой оболочки, преимущественно за счет нейтрофилов, с участками изъязвлений и эрозий (Рисунки 1, 2). Во всех образцах червеобразных отростков у детей II группы наблюдали следующие морфологические формы острого аппендицита [«Патологическая анатомия. Национальное руководство», под ред. М.А. Пальцева и соавт., 2013 г.]: простой аппендицит (n=16), флегмонозный аппендицит (n=31), гангренозный аппендицит (n=6) и гангренозно-перфоративный (n=2). При морфологическом исследовании червеобразных отростков детей III группы признаков воспалительного процесса и/или опухолевого роста не обнаружили.



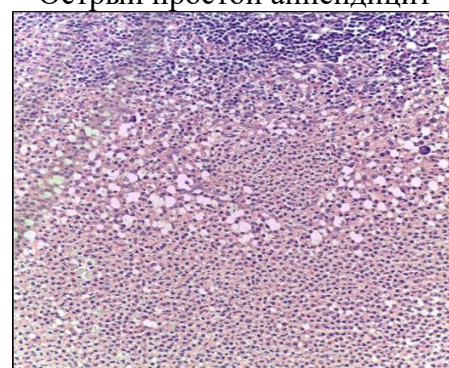
Острый гангренозный аппендицит, макро



Острый простой аппендицит



Острый флегмонозно-язвенный аппендицит



Острый гангренозный аппендицит

Рисунок 1 – Морфологическая (макро- и микроскопическая) картина острого аппендицита у детей с новой коронавирусной инфекцией. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.×200

При морфометрическом исследовании червеобразных отростков детей с новой коронавирусной инфекцией учитывали, как основные группы, так и возрастные подгруппы детей-пациентов. При исследовании длины червеобразного отростка не выявили

статистически значимую разницу, как при сравнении интактных органов (вне пандемии), так и при сравнении по возрастным подгруппам ($p > 0,05$). При исследовании наружного диаметра также не наблюдали статистических значимых различий между червеобразными отростками исследуемых групп и возрастными подгруппами ($p > 0,05$). Наиболее значимые изменения отмечали при сравнении толщины стенки червеобразного отростка и внутреннего диаметра, который отражает ширину просвета органа. Так, во всех исследуемых возрастных подгруппах было выявлено, что толщина стенки червеобразного отростка больше у пациентов с острым аппендицитом (II группа) и COVID-19-ассоциированным аппендицитом (I группа). У детей-пациентов с COVID-19 толщина стенки червеобразного отростка была на 20 – 25 % больше, чем у пациентов контрольной группы, в зависимости от возрастных подгрупп ($p < 0,05$). При сравнении I и II группы не выявили статистически достоверной разницы в толщине стенки ($p > 0,05$). В то же время внутрипросветный диаметр червеобразного отростка у детей-пациентов с аппендицитом при COVID-19 уменьшился на 13 – 20 % по сравнению с контрольной группой, в зависимости от возрастной подгруппы ($p < 0,05$).

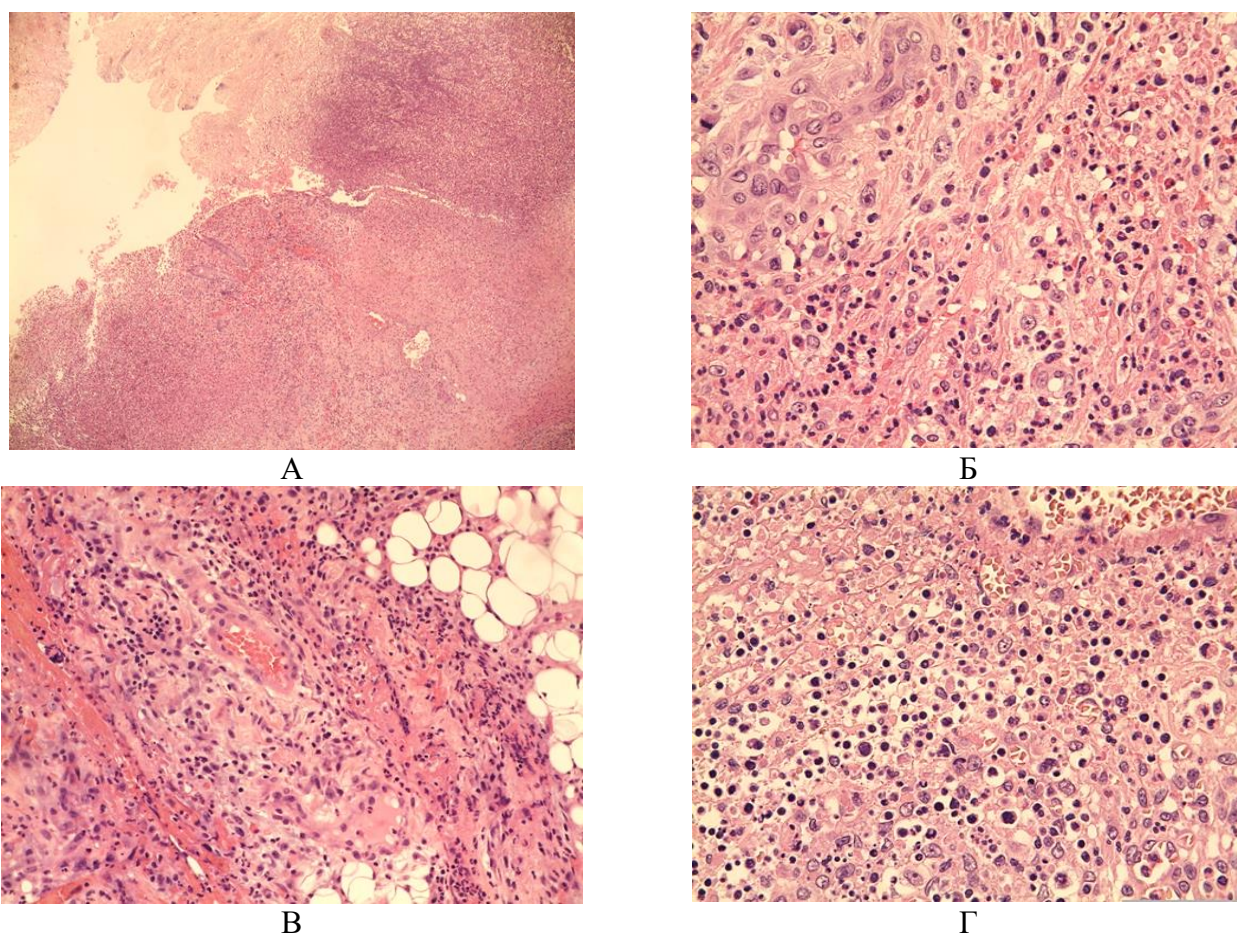


Рисунок 2 – Патологоанатомические особенности острого аппендицита у детей с новой коронавирусной инфекцией. Окраска: гематоксилин и эозин. А) деструктивные изменения, увел.×200. Б) выраженная воспалительная реакция, увел.×200. В) полнокровие, сладж, тромбы, увел.×200. Г) плазмоцитарная инфильтрация, увел.×200

При сравнении I и II группы не выявили статистически достоверной разницы во внутреннем диаметре червеобразного отростка. При сравнении диаметров самого большого лимфоидного фолликула не выявили статистически значимую разницу при изучении между группами или возрастными подгруппами, однако при сравнении средних показателей можно выявить небольшое увеличение диаметра у детей- пациентов с COVID-19-ассоциированным аппендицитом.

Так же стоит отметить, что по результатам морфометрического исследования червеобразных отростков у детей в разных возрастных группах не была обнаружена корреляция между возрастом пациента и основными (заявленными) количественными морфометрическими показателями.

Иммуногистохимическое исследование и флуоресцентная гибридизация *in situ*

При конфокальной микроскопии червеобразных отростков детей-пациентов с новой коронавирусной инфекцией после флуоресцентной гибридизации *in situ* во всех изучаемых образцах отмечали положительный сигнал вирусной РНК SARS-CoV-2 в цитоплазме большинства энтероцитов однослойного цилиндрического эпителия и единичных иммунных клеток. Интенсивность сигнала оставалась одинаковой во всех микропрепаратах I группы, не зависимо от возраста (Таблица 2) (Рисунок 3).

Таблица 2 – Усредненное распределение клеток с выявленной РНК SARS-CoV-2 по возрастным группам, в %

возраст	группа	РНК SARS-CoV-2
3 – 7 (младшее детство)	I – COVID-19	34,26±10.7
7 – 12 (детство)	I – COVID-19	33,78±8.7
12 – 18 (подростки)	I – COVID-19	34,68±9.3

Стоит отметить, что при детальном изучении в каждой возрастной группе выявили образцы, в которых количество клеток с положительным сигналом резко отличалось от среднего арифметического для данной группы, что не соответствовало нормальному распределению.

Для определения достоверности различий между возрастными группами использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса, который составил 5,46 ($p = 0.065$).

Различия в экспрессии SARS-CoV-2-позитивных клеток в 3 исследуемых возрастных выборках оказались статистически незначимыми. При микроскопическом исследовании выявили, что SARS-CoV-2 преимущественно реплицируется в эпителии кишечных крипт. В инфицированных клетках отмечали преимущественно перинуклеарное распределение РНК SARS-CoV-2 (Рисунок 3). При конфокальной микроскопии червеобразных отростков детей II и III групп после флуоресцентной гибридизации *in situ* не выявили наличия SARS-CoV-2.

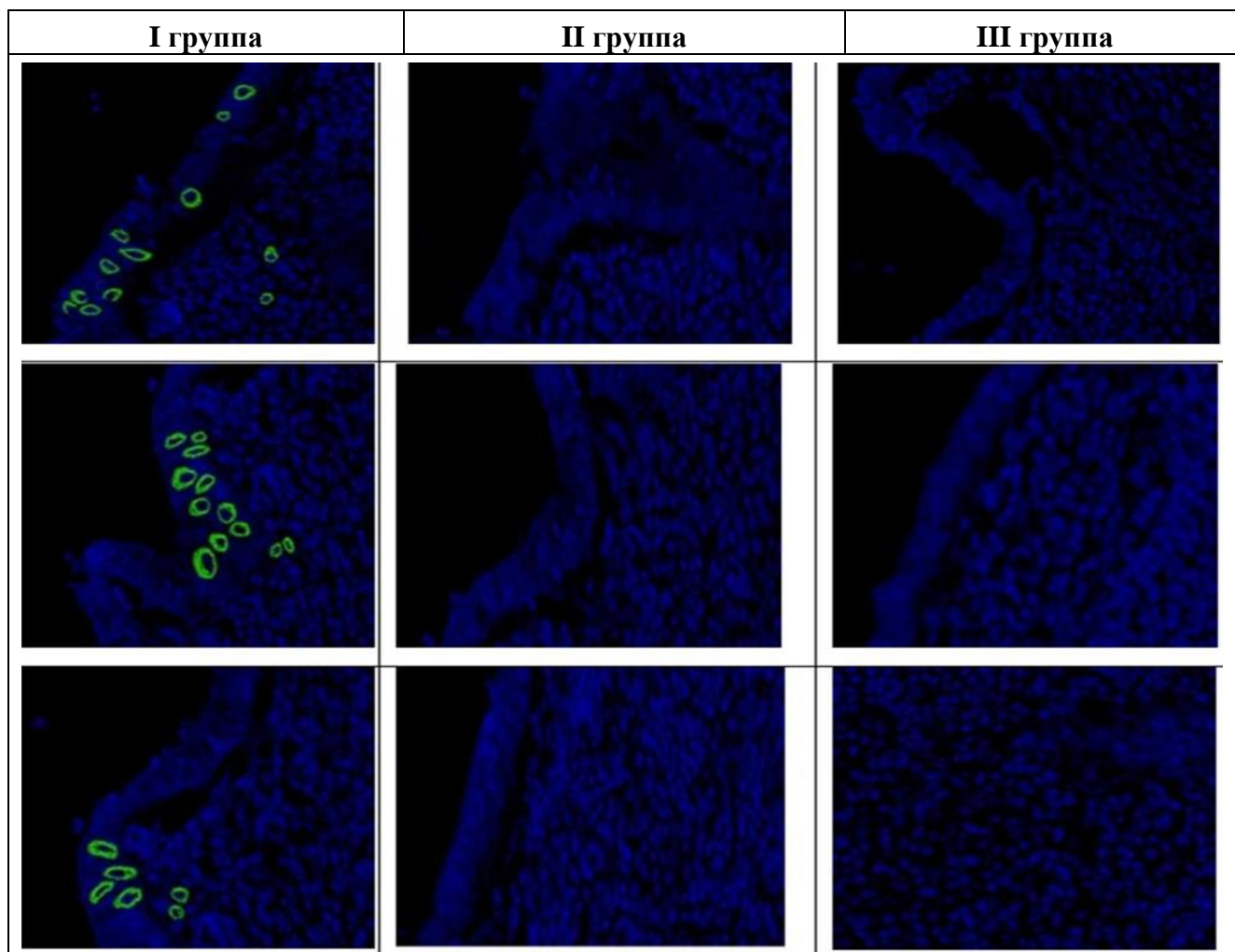


Рисунок 3 – РНК SARS-CoV-2 в червеобразных отростках детей при флуоресцентной гибридизации *in situ*, увеличение $\times 200$. Ряды: верхний – 3 – 7 (младшее детство); средний – 7 – 12 (детство); нижний – 12 – 18 (подростки)

CD-субпопуляции иммунных клеток

При иммуногистохимическом исследовании обнаружили CD-позитивные клетки в слизистой оболочке червеобразного отростка детей-пациентов всех исследуемых групп, при этом их количество варьировало. При иммуногистохимическом исследовании отмечали увеличение количества CD-позитивных клеток в слизистой оболочке червеобразных отростков и мезоаппендиксе детей I и II группы по сравнению с контрольной (III) группой. В то же время преобладание изучаемых маркеров наблюдали у детей с COVID-19. При распределении на площади доля CD-позитивных иммунных клеток в I группе варьировала: наибольшее значение обнаружили у CD3 (субпопуляция Т-лимфоцитов), CD68 (функционально активные макрофаги), CD20 (субпопуляции В-лимфоцитов), CD138 (плазмоциты), а маркирование на CD4 (Т-хелперы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки) в периваскулярном пространстве было меньше. Также количество CD68-позитивных макрофагов было значительно увеличено у детей с острым аппендицитом без ковидной инфекции (Таблица 3) (Рисунки 4, 5, 6, 7, 8).

Таблица 3 – Количество CD-позитивных клеток в 1 мм², в баллах

Группа	n	CD3	CD4	CD20	CD138	CD68
COVID-19	11	3	2	3	3	4
Острый аппендицит	26	2	1	2	1	3
Контроль	51	1	1	1	1	1

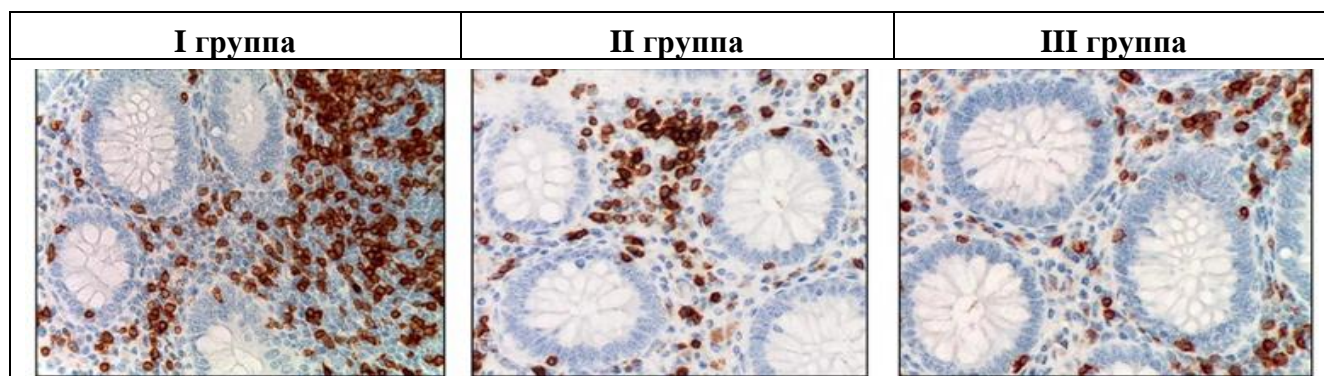


Рисунок 4 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD3, докрасивание – гематоксилином, увелич. ×400

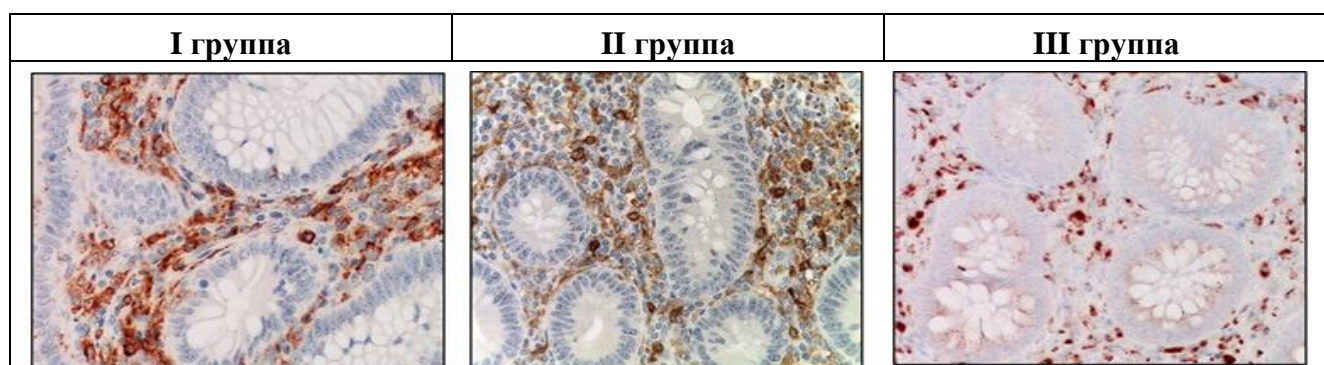


Рисунок 5 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD4, докрасивание – гематоксилином, увелич. ×400

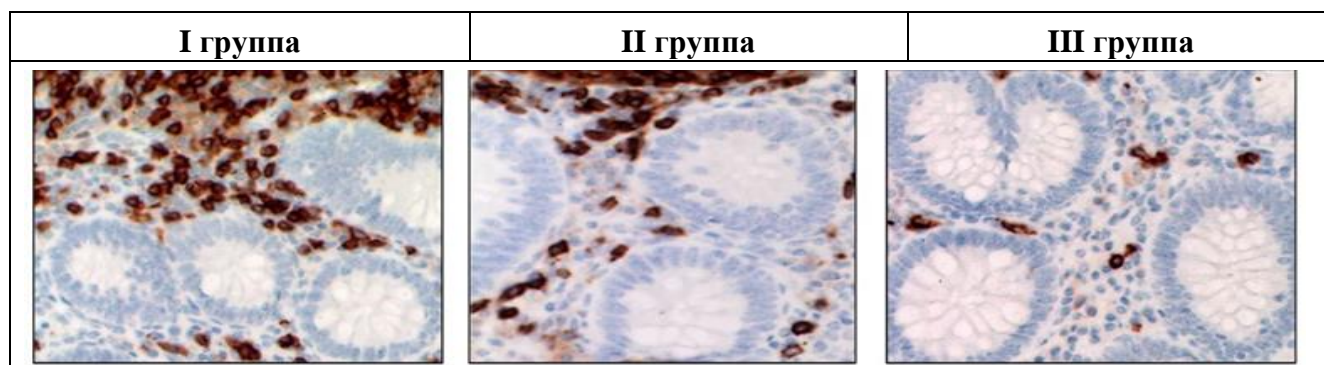


Рисунок 6 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD20, докрасивание – гематоксилином, увелич. ×400

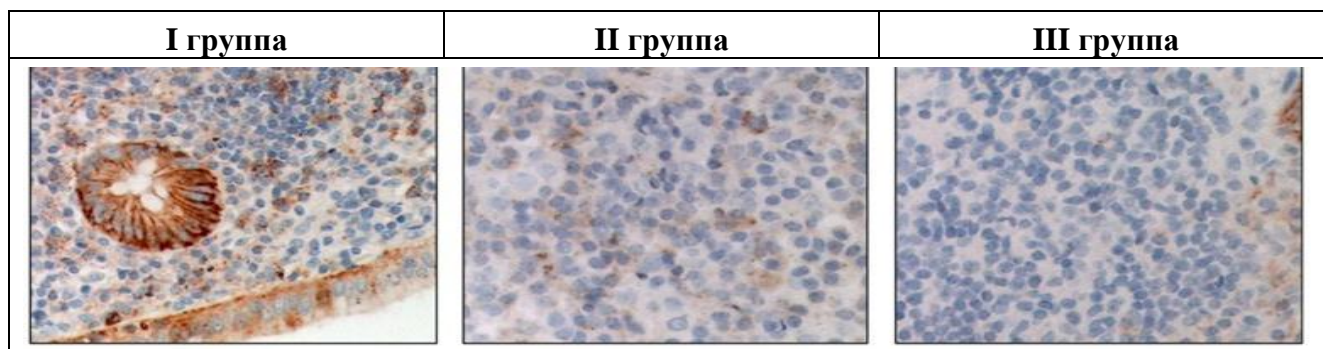


Рисунок 7 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD138, докрасивание – гематоксилином, увелич. $\times 400$

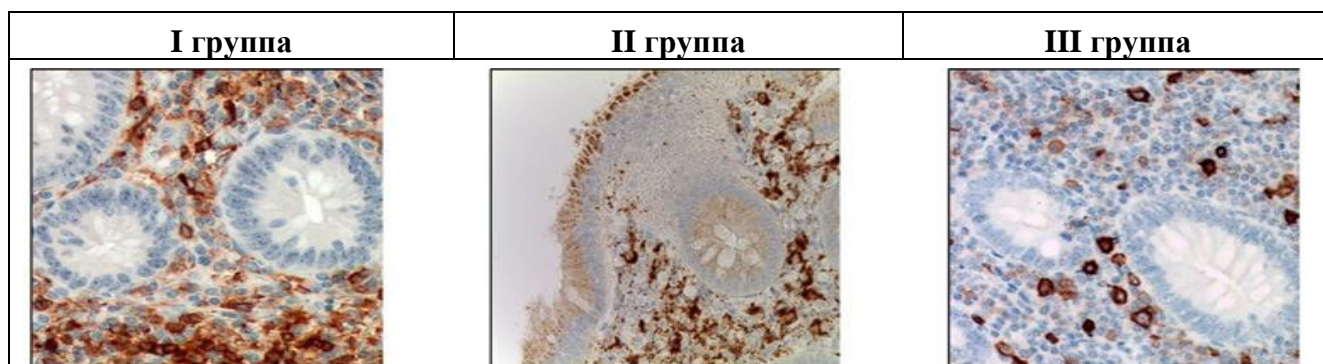


Рисунок 8 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD68, докрасивание – гематоксилином, увелич. $\times 400$

Экспрессия цитокинов

При иммуногистохимическом исследовании обнаружили IL-позитивные клетки в слизистой и подслизистой оболочках червеобразного отростка детей-пациентов всех исследуемых групп, преимущественно в иммунных клетках и единичных энтероцитах, при этом их количество варьировало в зависимости от морфологической формы острого аппендицита и наличия SARS-CoV-2. При иммуногистохимическом исследовании отмечали увеличение количества IL-1- и IL-6-позитивных клеток в слизистой оболочке червеобразных отростков и мезоаппендиксе детей I и II группы по сравнению с контрольной (III) группой (Рисунок 9). В то же время преобладание изучаемых маркеров наблюдали у детей с COVID-19. Обнаружено выраженное увеличение экспрессии цитокинов, прежде всего – провоспалительных, таких как IL-1 и IL-6, и компенсаторное увеличение противовоспалительных интерлейкинов – IL-4 и IL-10 у пациентов при новой коронавирусной инфекции. При распределении на площади доля IL-позитивных иммунных клеток в I группе варьировала: наибольшее значение обнаружили у IL-1 и IL-6. При оценке микропрепаратов в зависимости от морфологической формы наибольшее распределение IL-1 и IL-6 отмечали при гангренозном аппендиците, меньше – при флегмонозном аппендиците, по сравнению с простым аппендицитом (Таблица 4).

Таблица 4 – Экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов в червеобразных отростках при остром аппендиците у пациентов с COVID-19 +, COVID-19 -, и в контрольной группе, % / мм²

Группа	n	IL-1	IL-6	IL-4	IL-10
COVID-19					
-простой	1	11,6	12,6	10,8	21,3
- флегмонозно-язвенный	33	22,7	31,1	16,2	34,5
- гангренозный	8	48,6	58,9	25,3	46,9
Острый аппендицит					
- простой	16	8,5	10,2	9,3	18,9
- флегмонозный	31	18,3	27,6	12,4	29,7
- гангренозный	6	34,7	47,8	24,8	41,5
гангренозно-перфоративный	2	43,8	62,4	36,1	52,4
Контроль	38	8,3	9,5	8,6	15,4

Статистически достоверная разница между группой COVID-19 и контрольной группой (*) и по сравнению с предыдущим возрастом в исследуемых группах (**); $p < 0,05$

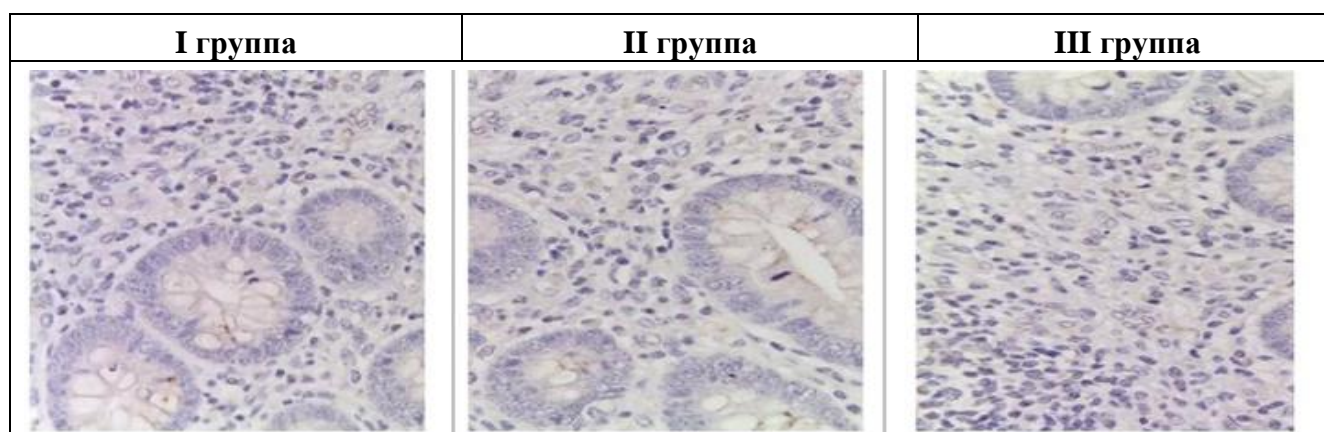


Рисунок 9 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к IL-1, докрасивание – гематоксилином, увелич. $\times 400$

Полимеразная цепная реакция (ПЦР-РВ)

Во всех изучаемых образцах I группы ($n=42$) в ткани червеобразного отростка при ПЦР-РВ обнаружен SARS CoV-2. При ПЦР-РВ анализе экспрессии *АПФ2* и *фурина* в ткани червеобразного отростка детей показали приблизительно схожие паттерны экспрессии, нормализованные по *GAPDH* (Таблица 5). В ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19 отмечали увеличение экспрессии *АПФ2* по сравнению с контрольной группой почти в 1,5 раза – $8,62 \pm 0,85$ против $5,6 \pm 0,42$, $p < 0.01$, соответственно. Корреляционной связи с возрастом не было обнаружено (Таблица 6). Экспрессия фурина в червеобразном отростке у детей с COVID-19 была незначительно выше по сравнению с контрольной группой – $38,28 \pm 1,42$ против $36,1 \pm 1,18$, $p < 0.01$, соответственно, степень ее не демонстрировала зависимость от возраста (Таблица 7).

Таблица 5 – Результаты ПЦР-РВ на АПФ2 и фурин (усл. ед.)

Гены	червеобразный отросток		
	I – COVID-19	II – острый аппендицит	III – контроль
АПФ2	8,62±0,85	6,2±0,62	5,6±0,42
Фурин	38,28±1,42	37,9±1,32	36,1±1,18

Таблица 6 – Распределение экспрессии АПФ2 при ПЦР-РВ по возрастам (усл. ед., $p < 0.01$)

возраст	подгруппа	АПФ2
3 – 7 (младшее детство)	I – COVID-19	8,72±0,83
	II – острый аппендицит	5,62±0,15
	III – контроль	
7 – 12 (детство)	I – COVID-19	8,76±0,43
	II – острый аппендицит	
	III – контроль	5,62±0,15
12 – 18 (подростки)	I – COVID-19	8,65±0,39
	II – острый аппендицит	
	III – контроль	5,62±0,15

Таблица 7 – Распределение экспрессии фурина при ПЦР-РВ по возрастам (усл. ед., $p < 0.01$)

возраст	подгруппа	Фурин
3 – 7 лет (младшее детство)	I – COVID-19	39,28±1,83
	II – острый аппендицит	
	III – контроль	36,03±1,07
7 – 12 лет (детство)	I – COVID-19	35,77±1,43
	II – острый аппендицит	
	III – контроль	35,97±1,17
12 – 18 лет (подросток)	I – COVID-19	38,41±1,39
	II – острый аппендицит	
	III – контроль	36,01±1,23

Особенности воспаления червеобразного отростка у детей после инвазии SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 обладает тропизмом практически ко всем тканям и органам экспрессирующим рецептор АПФ2. Вирус связывается с этими рецепторами, после чего происходит двухэтапный процесс протеолиза S-белка, необходимого для инвазии. Первый этап осуществляется за счет протеолитической активности преимущественно фурина либо трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2, расщепляющих S-белок на участке между S1 и S2 доменами. Затем наступает второй этап протеолиза S2 домена с помощью TMPRSS2 сразу на поверхности клетки, либо с помощью катепсина L уже внутри эндолизосомы. Таким образом, можно выделить два механизма инвазии в клетку. Первый – прямое мембранное слияние если АПФ2-позитивная клетка экспрессирует TMPRSS2, что позволяет активировать S-белок. Второй – рецептор-опосредованный эндоцитоз, если АПФ2-позитивная клетка не экспрессирует TMPRSS2, в таком случае активация S-белка происходит уже внутри

эндолизосомы с помощью катепсина L. После внедрения вируса в клетку, АПФ2-рецептор отделяется от плазмолеммы и попадает в кровоток, за счет чего в крови повышается концентрация Ангиотензина-2, что вызывает вазоконстрикцию, воспалительную реакцию и формирование тромбов. Во время инвазии, вирус активирует различные паттерн-распознающие рецепторы (PRR), что ведет к усилению активности провоспалительных факторов транскрипции, таких как NF-κB, за счет чего клетка начинает активно секретировать множество провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-альфа, трансформирующий фактор роста-бета, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 и хемокины, такие как CCL2, CCL3, CCL5 и т.д. Секретируемые интерфероны распознаются рецепторами ближайших клеток, что активизирует факторы транскрипции, участвующие в противовирусной защите. Кроме того, секреция провоспалительных цитокинов привлекает в очаг воспаления множество моноцитов, нейтрофилов и макрофагов, которые тоже в свою очередь начинают секретировать провоспалительные цитокины, а также большое количество АФК, повреждающих окружающие ткани. Замыкается порочный круг, при котором инфицированные клетки секретируют провоспалительные цитокины, привлекающие иммунные клетки, которые дополнительно секретируют цитокины, привлекающие большее количество иммунных клеток, активность которых разрушает ткани в очаге воспаления. Погибающие клетки высвобождают еще больше DAMP, распознаваемых PRR ближайших клеток и те опять же начинают секретировать провоспалительные цитокины. Дополнительно повреждение тканей усугубляет то, что вирус SARS-CoV-2 нарушает внутриклеточные антиоксидантные механизмы. Так, вирусный белок ORF6 подавляет работу фактора транскрипции NRF2 – главного регулятора антиоксидантной внутриклеточной активности.

На основании вышеизложенного, повышение экспрессии мембранного рецептора АПФ2 на энтероцитах слизистой оболочки червеобразного отростка обеспечивает инвазию SARS-CoV-2 с дальнейшей репликацией вируса и гибелью части клеток. Параллельно, запускается каскад воспаления с повышением количества клеток, экспрессирующих провоспалительные и противовоспалительные цитокины; высвобождаются хемоаттрактанты и активные формы кислорода, что усугубляет ишемию органа, усиливает отек и инфильтрацию плазматическими клетками, макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами. Происходит гиперплазия лимфоидных фолликулов, нарушение кровообращения – тромбоз кровеносных сосудов стенки червеобразного отростка. Всё это в совокупности проявляется преимущественно деструктивными формами острого аппендицита, такими как – флегмонозно-язвенной и гангренозной.

Таким образом червеобразный отросток представляет собой уникальный «орган-мишень» для SARS-CoV-2, где сочетание анатомо-функциональных особенностей создает условия для развития острого аппендицита при COVID-19 (Рисунок 10).

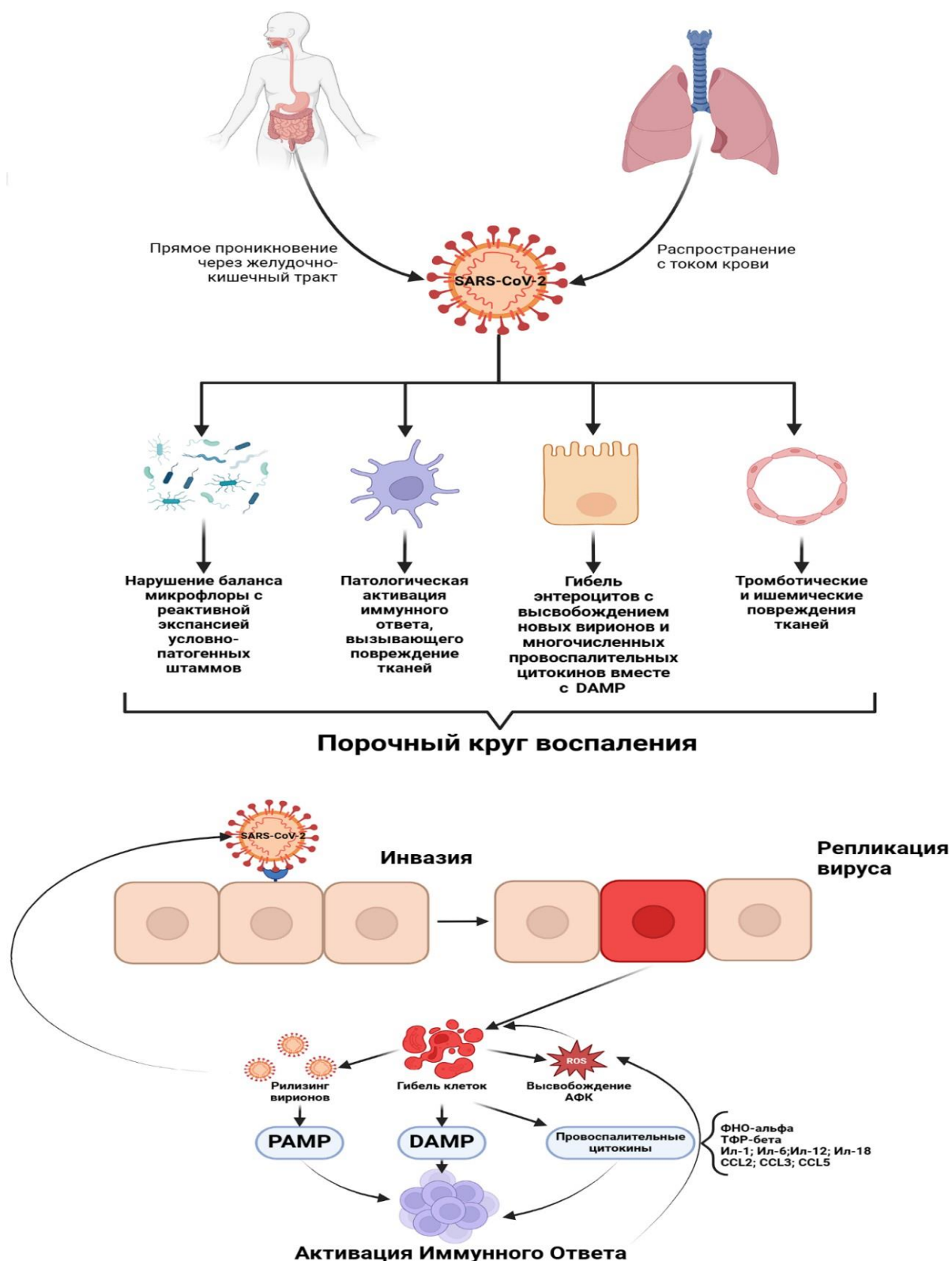


Рисунок 10 – Схема патогенеза поражения червеобразного отростка после инвазии SARS-CoV-2 (у детей)

ВЫВОДЫ

1. Острый аппендицит у детей-пациентов с COVID-19 характеризуется преимущественно деструктивными формами – флегмонозно-язвенный аппендицит (76,1%) и гангренозный аппендицит (19,0%): червеобразные отростки увеличены в размерах, отечные и гиперемированные, с наличием изъязвлений; их стенка и брыжейка с воспалительной инфильтрацией и очагами некрозов.

2. При микроскопическом исследовании червеобразных отростков у детей с COVID-19 разных возрастных групп наблюдается отек стенки, стертая демаркация между оболочками, массивная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация, очаги коагуляционного некроза с эрозиями и изъязвлениями, наличие в просвете гнойного экссудата с геморрагическим компонентом, а также независимо от формы аппендицита, выявлены признаки коагулопатии – микротромбы (100%), фибриноидный некроз стенки кровеносных сосудов, что подтверждают COVID-19-ассоциированную природу аппендицита. Червеобразные отростки данной группы также характеризуются увеличением толщины стенки и уменьшением величины внутрисветного диаметра, гиперплазией лимфоидной ткани.

3. У детей с COVID-19 независимо от возрастной группы SARS-CoV-2 проникает прежде всего в энтероциты однослойного цилиндрического эпителия и единичные иммунные клетки, а повышение уровней АПФ2 и фурина указывают на их потенциальную роль в инвазии данного вируса. Обнаруженный паттерн не коррелирует как в количественном, так и в качественном отношении, от формы аппендицита.

4. При иммуногистохимическом исследовании выявили увеличение количества CD-позитивных клеток в слизистой оболочке червеобразных отростков и мезоаппендиксе детей I и II группы по сравнению с контрольной (III) группой. При распределении на площади доля иммунных клеток в червеобразных отростках у детей с COVID-19 независимо разного возраста варьировала: резкое увеличение количества CD3 (Т-лимфоциты; $18,2 \pm 0,4$ кл./мм²), особенно – CD68 (макрофаги; $36,7 \pm 2,1$ кл./мм²), CD20 (В-лимфоциты; $36,7 \pm 2,1$ кл./мм²), CD138 (плазмоциты; $19,6 \pm 0,4$ кл./мм²), а доля CD4 (Т-хелперы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки; $11,2 \pm 0,2$ кл./мм²) была меньше. Это указывает на активацию как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета. Также количество CD68-позитивных макрофагов было значительно увеличено у детей с острым аппендицитом без ковидной инфекции.

5. Патоморфологические изменения червеобразных отростков у детей с новой коронавирусной инфекцией сопровождаются дисбалансом про- и противовоспалительных цитокинов. Маркирование отмечали в основном в эпителии и иммунных клетках. Резкое увеличение количества IL-1- и IL-6-позитивных клеток наблюдаются преимущественно при гангренозной форме аппендицита. При этом, доля IL-4- и IL-10- позитивных клеток также

повышена. Увеличение указанных цитокин-продуцирующих клеток также обнаружены при аппендиците у детей без ковидной инфекции, однако их значения были ниже.

6. Идентификация SARS-CoV-2 в эпителии и иммунных клетках червеобразных отростков детей с COVID-19 различных возрастных групп, указывает на тропность вируса, а возникающие изменения местных иммунологических процессов и нарушение кровообращения, можно рассматривать в качестве одного из этиопатогенетического фактора развития острого аппендицита и обеспечивают степень выраженности форм заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Наличие деструктивных морфологических форм аппендицита у детей-пациентов с COVID-19 следует учитывать при выборе длительности этиопатогенетической терапии и тактики хирургического вмешательства (выборе оперативного пособия), а также врачам-патологоанатомам во время вырезки операционного материала.

2. Поражения кровеносных сосудов мелкого калибра червеобразных отростков у детей-пациентов с COVID-19 обуславливает в том числе новый стратегический поиск в терапии системной коагулопатии.

3. Полученные результаты об особенностях течения инфекционного процесса в червеобразных отростках детей-пациентов с COVID-19 помогут врачам педиатрам и инфекционистам при назначении лекарственной терапии и профилактики осложнений.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молекулярно-генетические изменения ткани червеобразного отростка детей с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, А. Ю. Цибулевский, **К. Р. Горохов** // **Вестник Новгородского государственного университета**. – 2021. – № 1(122). – С. 62-66.

2. Демяшкин Г.А., **Горохов К.Р.** Молекулярно-генетические изменения ткани червеобразного отростка детей с COVID-19. Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына). – М.: ФГБНУ НИИМЧ им. академика А.П. Авцына, 2021. – С. 61.

3. Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Furin Expression in the Appendix of Children with COVID-19 / G. Demyashkin, **K. Gorokhov**, I. Zorin [et al.] // **Surgical Infections**. – 2022. – Vol. 23, No. 5. – P. 470-474. [**Scopus**]

4. Выявление РНК SARS-CoV-2 в слизистой оболочке червеобразного отростка у детей с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, **К. Р. Горохов**, П. В. Никитин, И. А. Зорин, С. И. Вознесенская // **Архив патологии**. – 2023. – Т. 85. – № 3. – С. 23-28. [Scopus]

5. Иммунокомпетентные клетки червеобразного отростка при остром аппендиците у детей с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, **К. Р. Горохов**, А. А. Пилипенко // **Казанский медицинский журнал**. – 2023. – Т. 104, № 4. – С. 623-629.

6. Морфологические особенности червеобразного отростка при остром аппендиците у детей с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, **К. Р. Горохов**, И. А. Зорин // **Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины**. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 18-22.

7. **Горохов, К. Р.** Морфологические особенности острого аппендицита у детей с COVID-19 / К. Р. Горохов, И. А. Зорин, Г. А. Демяшкин // **Окружающая среда и здоровье населения: Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции, Курск, 23 марта 2023 года / Сост. В.А. Ряднова, отв. редактор А.М. Черных**. – Курск: Курский государственный медицинский университет, 2023. – С. 20-22.

8. Demyashkin G, **Gorokhov K**, Shchekin V, Vadyukhin M, Matevosyan A, Rudavina A, Pilipchuk A, Kochetkova S, Atiakshin D, Shegay P, Kaprin A. Features of Appendix and the Characteristics of Appendicitis Development in Children with COVID-19. **Biomedicines**. 2024 Jan 29;12(2):312. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПФ2 – ангиотензинпревращающий фермент 2;

ИГХ – иммуногистохимия;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени;

CD – англ. cluster of differentiation – кластер дифференцировки (иммунокомпетентных клеток);

IL – англ. Interleukin – интерлейкин;

ISH – англ. in situ hybridization – общий молекулярно-биологический метод, используемый для определения пространственно-временной экспрессии генов;

S-белок – спайковый белок или пепломерный белок