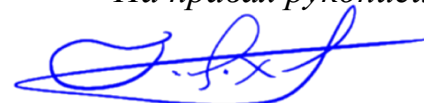


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



Горохов Константин Родионович

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

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Обнинск – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Эпидемиология и клинические особенности COVID-19 у детей.....	15
1.2. Особенности иммунного ответа и патогенеза COVID-19 у детей .....	18
1.2.1. Особенности вирусной инвазии SARS-CoV-2 .....	18
1.2.2. Ключевые отличия бессимптомных и тяжелых форм COVID-19 .....	18
1.2.3. Интерферон-зависимый сигнальный путь.....	20
1.2.4. Т-клеточный гомеостаз и иммунный ответ .....	21
1.2.5. Гуморальный ответ .....	21
1.2.6. Развитие синдрома мультисистемного воспаления у детей с COVID-19 .....	22
1.3. Особенности поражения органов желудочно-кишечного тракта при COVID-19 .....	24
1.4. Иммунная функция червеобразного отростка .....	25
1.4.1. Функциональная гистология червеобразного отростка .....	25
1.4.2. Иммунный ответ при остром аппендиците .....	27
1.5. Особенности острого аппендицита у детей.....	27
1.6. Обзор связи между COVID-19 и острым аппендицитом у детей.....	30
1.7. Заключение по обзору литературы.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	33
2.1. Характеристика материала.....	33
2.2. Методы исследования.....	34
2.2.1. Гистологическое исследование.....	34
2.2.2. Морфометрическое исследование .....	35
2.2.3. Иммуногистохимическое исследование .....	36
2.2.4. Гибридизация in situ.....	37
2.2.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	38
2.2.6. Статистические методы .....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	40

3.1. Клиническая характеристика .....	40
3.2. Морфологическая и морфометрическая характеристика червеобразных отростков пациентов .....	43
3.3. Иммуногистохимическое исследование и гибридизация <i>in situ</i> .....	54
3.4. Полимеразная цепная реакция .....	65
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	68
ВЫВОДЫ .....	78
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	83

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [20, 58]. 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 [4, 6, 190]. Такое разнообразие проявлений данного заболевания свидетельствует о мультисистемном характере, которое нередко заканчивается инвалидизацией пациентов или, даже летальным исходом [59, 191]. 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 [94, 147]. 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 (МВС, англ. Multisystem inflammatory syndrome in children). У большинства детей наблюдались боль в животе и диспепсические расстройства – тошнота, рвота, диарея, потеря аппетита, повышение маркеров системного воспаления (лейкоцитоз, СРБ и ИЛ-6), васкулит, повреждения миокарда (тропонины и NT-pro-BNP), коагулопатию (D-димер) [9, 18, 109, 149].

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 [13, 15, 16].

Этиология и патогенез воспаления червеобразного отростка в настоящее время до конца не изучен, однако по современным представлением 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 участия SARS-CoV-2 в качестве ведущего этиологического фактора [27, 121], требующего более детального изучения.

Необходимость проведения эпидемиологического и клинимо-морфологического анализа у детей-пациентов с COVID-19 поможет, в том числе, в понимании ранних и поздних постковидных осложнений и разработке мер профилактики.

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 [116]. 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 [116]. В этих немногочисленных работах преимущественно описан клинический аспект при малой выборке [105, 124, 199]. При этом морфологические исследования по данной теме единичны и включают сравнительный анализ аппендицита с мультисистемным воспалительным синдромом у детей с COVID-19 [152]. Авторы указывают на значительное повышение маркеров воспаления, таких как CD3, CD20, CD5, CD4, CD8 [47, 68]. 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 АПФ-2 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 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 АПФ-2 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 подсчёта 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), 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 на тему «Патоморфологические особенности воспаления червеобразного отростка у детей с COVID-19» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальности 3.3.2. Патологическая анатомия. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам 1, 2, 3, 4 паспорта научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия: пункту 1. Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных патологоанатомических исследований клеток, тканей, органов и организма при использовании современных методических и технологических возможностей морфологии в сочетании с молекулярной биологией, молекулярной генетикой и эпигенетикой; пункту 2. Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов; пункту 3. Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики; пункту 4. Исследование морфо- и танатогенеза заболеваний, роли различных органных, тканевых систем в становлении основного заболевания (полиорганность патологии) и его исходах.

### **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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Полученные с начала пандемии COVID-19 эпидемиологические и клинические данные свидетельствуют, что вирус новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) способен поражать в равной степени, как взрослых, так и детей. Инфицирование детей часто протекает в бессимптомной или легкой форме заболевания, однако известны случаи тяжелого течения с развитием мультисистемного воспалительного синдрома (MBS), а информация по развитию отдаленных осложнений у детей, перенесших новую коронавирусную инфекцию, представлена в малом количестве [102].

Изучение острого аппендицита, ассоциированного с COVID-19, у детей является актуальной исследовательской темой в свете глобальной пандемии. Распространение COVID-19 среди детской популяции вызывает вопросы о возможном влиянии вируса на здоровье детей и его тропизме к различным органам и системам органов. Развитие острого аппендицита на фоне инфицирования SARS-CoV-2 представляет теоретическую и практическую значимость в контексте понимания патогенеза вирусной инфекции и ее влияния на пищеварительную систему. Однако изучение механизмов патогенеза COVID-19 поможет всестороннему пониманию этого заболевания.

### 1.1. Эпидемиология и клинические особенности COVID-19 у детей

В конце 2019 года в китайском городе Ухань возникла внезапная эпидемия пневмонии, вызванной новым коронавирусом, которая привела к серьезным последствиям не только для Китая, но и для всего мирового сообщества. Международный комитет по таксономии вирусов обозначил новую коронавирусную инфекцию как SARS-CoV-2, а Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) присвоила заболеванию, вызванному SARS-CoV-2, название COVID-19 [36, 107]. Несмотря на определенную схожесть проявлений

COVID-19 с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS) и Ближневосточным респираторным синдромом (MERS), его основное клиническое проявление связано с тяжелой дыхательной недостаточностью. Существуют и свои особенности в эпидемиологии и клиническом течении. У взрослых COVID-19 характеризуется длительным периодом инкубации, высокой контагиозностью, атипичными клиническими симптомами и высокой смертностью среди пожилых людей [52, 54]. Данное заболевание может встречаться у людей любого возраста и широко распространено по всему миру, оно может оказывать влияние на здоровье человека в течение длительного промежутка времени, особенно у детей [51].

Проявления COVID-19 у взрослых изучены гораздо лучше, чем у детей. На сегодняшний день еще не полностью определены эпидемиологические и клинические особенности COVID-19 у детей младшей возрастной группы. С учетом быстрого распространения SARS-CoV-2 и бессимптомного течения, можно подозревать, что на самом деле количество инфицированных детей значительно больше, чем учтены в статистике. Однако, уже сейчас мы можем составить представление о течении COVID-19 у детей, благодаря опубликованным работам [88].

По данным масштабного метаанализа, проведенного Guo с соавторами, было выявлено, что большинство детей были заражены при контакте со своими родственниками. Медианное время инкубационного периода составило 9 дней (от 0 до 20 дней), а межквартильный размах составлял от 6 до 13 дней [87].

По результатам современных обзоров зарубежных авторов отмечается, что от 6% до 25% детей переносят новую коронавирусную инфекцию бессимптомно, однако у некоторых детей отмечались изменения при компьютерной томографии (КТ). У большинства детей-пациентов (более 90% случаев) была диагностирована легкая (клинические симптомы без визуализации признаков пневмонии) или умеренная (лихорадка и симптомы со стороны дыхательных путей с визуализацией признаков пневмонии) степень тяжести. На тяжелые и крайне тяжелые случаи суммарно приходилось меньше, чем 1,5% всех пациентов [55, 87].

При анализе отечественной литературы мы обнаружили схожие данные. Так, в своем исследовании, проведенном на 6580 пациентах, Горелов с соавторами выявили, что у большинства детей (86,6%) была диагностирована инфекция верхних дыхательных путей (ИВДП), что соответствует легкой степени тяжести течения заболевания [5]. Количество бессимптомных случаев в два раза превышало количество диагностированных пневмоний. В аналогичном исследовании, проведенном Болатовой с соавторами, было показано, что 67,6% детей переносят инфекцию в легкой форме, 31,2% в среднетяжелой форме, а остальные – в крайне тяжелой форме. У одного ребенка был выявлен мультисистемный воспалительный синдром (болезнь Kawasaki) [14].

Распространенность бессимптомного течения COVID-19 у детей по результатам проанализированных обзоров составляет гораздо больше, чем у взрослых пациентов [57, 72, 132]. Неожиданно, в некоторых случаях у детей с бессимптомным течением COVID-19, были обнаружены изменения при рентгенологическом исследовании, которые не коррелировали с тяжестью заболевания. Следует отметить, что в настоящее время также нет данных о бессимптомном клиническом течении при обнаружении рентгенологических изменений в легких у взрослых. Проявляющиеся клинические симптомы у детей с COVID-19 часто являются нетипичными. Лихорадка и кашель – это основные проявления, которые могут сопровождать поражения желудочно-кишечного тракта. Другими симптомами могут являться тошнота, рвота и диарея, а также чихание, заложенность носа, боль в горле, головокружение, головная боль, anosmia, агевзия, миалгии и конъюнктивит. Симптомы COVID-19 у детей в целом повторяют симптомы, наблюдаемые у взрослых, хотя степень их выраженности значительно меньше, а большая вариативность проявлений часто приводит к атипичному течению [54, 151]. Очевидным является тот факт, что среди детей развивается гораздо меньшее количество осложнений, так как число пациентов с хроническими заболеваниями по сравнению со взрослой популяцией значительно ниже. Так у детей с COVID-19 и наличием хронических заболеваний, таких как врожденный порок сердца или сахарный диабет I типа тяжелые осложнения в виде

острого респираторного дистресс синдрома, сердечной недостаточности, поражения миокарда или печени развиваются крайне редко [5, 14, 87].

## **1.2. Особенности иммунного ответа и патогенеза COVID-19 у детей**

### **1.2.1. Особенности вирусной инвазии SARS-CoV-2**

При попадании на слизистую оболочку дыхательных путей домен S-белка SARS-CoV-2 связывается с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ-2), затем происходит адгезия благодаря расщеплению вирусного S-белка протеазами в мембранах клеток хозяина – сериновая протеаза 2, катепсин L и Фурин и др., это позволяет вирусу проникнуть в клетки [25, 49, 185, 186].

Мета-анализ 31 исследования РНК-последовательности у 228 человек без наличия заболевания легких в анамнезе показал положительную корреляцию между возрастом и экспрессией АПФ-2 в альвеолоцитах [183], однако на сегодняшний день различия в экспрессии факторов вирусной инвазии у детей и взрослых менее очевидны, поскольку лишь некоторые исследователи поддерживают гипотезу о том, что сниженное количество рецепторов АПФ-2 у детей может объяснить более низкое проникновение вируса в легкие [31]. До сих пор в исследованиях не показана корреляция между уровнем вирусной нагрузки и тяжестью течения. А большинство работ, посвященных изучению вирусной нагрузки, содержат противоречивые данные и результаты [32, 122].

### **1.2.2. Ключевые отличия бессимптомных и тяжелых форм COVID-19**

Особого интереса заслуживает рассмотрение вопроса об иммунном ответе организма детей с COVID-19. По современным представлениям у взрослых пациентов повреждение легких и других внутренних органов при инфицировании SARS-CoV-2 происходит в результате чрезмерной активации провоспалительных

механизмов, которые впоследствии приводят к так называемому «цитокиновому шторму» и дисбалансу коагуляции и фибринолиза, что в конечном итоге проявляется тромбозом и мультисистемным воспалением [44, 125].

В целом, проведенные исследования показали, что бессимптомная и легкая формы заболевания после SARS-CoV-2 инвазии протекают практически одинаково. В последних работах было показано, что ответ на SARS-CoV-2 инвазию в детском возрасте протекает чаще всего в бессимптомной или легких формах и, в принципе, не отличается с течением легкой и средней тяжести COVID-19 у взрослых. В частности, было отмечено, что концентрация ключевых цитокинов не отличается у детей с легким течением заболевания и здоровыми детьми: является показателем степени воспалительного ответа.

Различие между содержанием  $\gamma$ -интерферона, синтезируемого CD4 или CD8 Т-лимфоцитами, и количеством Т-клеточных рецепторов также не было выявлено при бессимптомном течении у детей и у взрослых. В то же время было показано, что состояние Т-клеточного иммунитета у детей ниже, чем у взрослых, возможно это и обуславливает течение заболевания без выраженных клинических проявлений [89, 143, 177].

Известно, что помимо местного клеточного ответа, у детей в крови также происходит активация элементов гуморального ответа. Так, у детей и взрослых определяются примерно одинаковые уровни IgG к спайковому белку новой коронавирусной инфекции, способные активировать систему комплемента и фагоцитарные клетки [110]. В других исследованиях отмечалось, что у детей до 10 лет обнаруживается более высокая активность анти-SARS-CoV-2 антител, чем у подростков и взрослых молодого возраста [40, 41].

В то же время, у детей со средней или тяжелой формой заболевания, требующих госпитализации, обнаруживаются более высокие титры антител против S-белка и нуклеокапсида, по сравнению с пациентами детского возраста при бессимптомном течении [127, 129].

В отличие от сопоставимого иммунного ответа у детей и взрослых при легкой форме COVID-19, можно выявить определенные различия при сравнении разных

возрастных групп госпитализированных пациентов. По современным представлениям ключевую роль в развитии более тяжелых форм заболевания у детей представляет разница в становлении врожденного и приобретенного иммунитета. Особое внимание в исследованиях уделяется различиям в интерферон-опосредованном сигнальном пути и функции Т-клеток как факторам, способствующим повышенной уязвимости при более тяжелых формах COVID-19. В подтверждение этой теории было выявлено, что распространенность тяжелой формы COVID-19 выше в иммунодефицитных когортах пациентов, с наличием морфофункциональных нарушений Т-клеток [69, 115], по сравнению с другими детьми, страдающими различными первичными или вторичными иммунодефицитами, таких как дефицит антител, аутоиммунные нарушения или прием иммуносупрессивных препаратов. Увеличение частоты тяжелой формы COVID-19 у детей со сниженным количеством Т-клеток параллельна повышенной смертности от COVID-19 у пожилых людей – еще одной популяции со сниженным количеством и функцией Т-клеток [50, 56, 61, 73, 166].

### **1.2.3. Интерферон-зависимый сигнальный путь**

Несмотря на то, что АПФ-2 играет ключевую роль в вирусной инвазии SARS-CoV-2 в клетки, другие вирусные компоненты активно взаимодействуют с различными паттерн-распознающими рецепторами (PPR) для активации компонентов врожденного иммунного ответа [146]. S-белок SARS-CoV-2 воспринимаются Toll-подобным рецептором 2 (TLR2) и TLR4 [34, 146]. Одноцепочечная геномная РНК вируса активирует TLR7/8, двухцепочечные промежуточные РНК вируса связывают TLR3, а цитозольная РНК воспринимается RIG-I-подобными рецепторами [196], последующая активация TLRs и RIG-I приводит к выраженной ИФН-опосредованной реакции [50, 175, 192].

При исследовании различий сигнального каскада ИФН у детей и взрослых пациентов с COVID-19 было выявлено следующее. Взрослые с тяжелой формой

COVID-19 имеют более низкие циркулирующие уровни ИФН I типа, что объясняется нейтрализующими антителами [138, 146], а также снижением секреции ИФН I типа плазматическими и дендритными клетками [53, 151].

Продукция ИФН у детей с 5-ти лет не зависит от их возраста в отличие от взрослых, у которых его снижение отмечается с 65-ти лет.

#### **1.2.4. Т-клеточный гомеостаз и иммунный ответ**

Количество Т-клеток в крови является хорошо известным маркером для определения степени тяжести COVID-19 у детей и взрослых [77]. У детей с COVID-19 отметили более высокое содержание количества лимфоцитов [50, 93, 184], в частности о повышении CD4 и CD8 клеток после SARS-CoV-2 инвазии [50, 86, 93].

Возрастные физиологические особенности иммунного статуса ребенка напрямую коррелируют с течением COVID-19. Выработка Т-клеток является максимальной в возрасте 1 года, а затем постепенно снижается, и к ~85 годам практически останавливается. Разнообразие Т-клеточных рецепторов (TCR) – еще один фактор, характерный для детей. Диапазон патоген-специфических реакций расширяется по мере взросления, что связано с контактом иммунных клеток с новыми инфекциями. Это сопровождается формированием резидуальных тканевых Т-клеток памяти. Кроме того, некоторые исследования выявили перекрестную реактивность Т-клеток на эпитопы SARS-CoV-2 [50, 60, 119, 128, 136]. Поэтому необходимы дополнительные исследования, позволяющие дополнить и расширить представление о природе Т-клеточного ответа у детей, а также объяснить менее выраженную воспалительную реакцию при COVID-19.

#### **1.2.5. Гуморальный ответ**

SARS-CoV-2 способствует увеличению про-плазмоцитов и плазмоцитов как при легкой, так и при тяжелой форме COVID-19. Увеличение количества

плазматических клеток коррелирует с долей активных Т-клеток, особенно CD4+ [24, 50, 150, 163].

Количество В-клеток и плазматических клеток напрямую связано с возрастом ребенка, что и обеспечивает гуморальный ответ, в том числе на COVID-19. У младенцев вырабатывается больше IgG-1, чем IgG-2, последний из которых преимущественно распознает полисахаридные антигены [30]. Факторы окружающей среды также влияют на развитие В-клеток, что напрямую связано с взаимодействием с различными патогенами и микроорганизмами [156].

Профиль антител также изменяется с возрастом и частотой воздействия с инфекциями. Что касается других распространенных коронавирусов, таких как 229E, NL63, OC43 или HKU1, то исследование 231 ребенка и 1168 взрослых показало, что у детей повышается уровень антител против S-белка, нуклеокапсида и структурных белков матрикса, тогда как у взрослых наиболее распространенной мишенью для антител является специфический белок [50]. Различия в реактивности эпитопов в зависимости от возраста были также выявлены в антителах против других респираторных вирусов, включая респираторно-синцитиальный вирус человека (РСВЧ) и вирус гриппа, что позволяет предположить, что гуморальный иммунитет у детей формируется при контакте с различными вирусными эпитопами по сравнению со взрослыми [48].

Противоречивые результаты приведенных исследований свидетельствуют о сложности изучения гуморального ответа в зависимости от возраста, а также широкого спектра индивидуальных особенностей и экологического микроклимата.

### **1.2.6. Развитие синдрома мультисистемного воспаления у детей с COVID-19**

В апреле 2020 года, на фоне роста заболеваемости COVID-19, в ряде стран Европы у некоторых детей начали отмечать кожные проявления, напоминающие болезнь Кавасаки или синдром токсического шока. Это совпадает с пиком

активности SARS-CoV-2 в этих регионах по данным Feldstein *et al.* и Dufort *et al.*, на основании 300 клинических случаев в США [140, 141].

К основным диагностическим критериям МВС, разработанным Центром по контролю заболеваний США, относятся: лихорадка более 24 часов и системная воспалительная реакция в двух и более органах [141]. Эти симптомы должны быть обнаружены во время текущей или перенесенной инфекции SARS-CoV-2 или в течение 4 недель после контакта с пациентом с COVID-19 [112]. В опубликованных статьях сообщается, что более чем у 75% детей отмечали положительный анализ на антитела к SARS-CoV-2 [150]. К симптомам легкой степени течения МВС относят лихорадку, сыпь и желудочно-кишечные симптомы [141, 150].

Для МВС характерно подавление практически всех гемопоэтических ростков, а также повышение уровней воспалительных цитокинов, включая ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-17 [139]. Можно предположить, что мультисистемный воспалительный синдром у детей является аналогом тяжелого течения COVID-19 у взрослых с развитием «цитокинового шторма». Доказательства активации миелоидных клеток у детей с МВС включают повышенную экспрессию CD64 в моноцитах и нейтрофилах, а также генов *S100A*. Было показано, что НК-клетки у детей с МВС также являются высокоактивными [148]. При РНК-секвенировании мононуклеарных клеток у восьми детей с МВС, четырьмя детьми с пневмонией при COVID-19 и девятью здоровыми взрослыми было показано, что у детей с МВС и COVID-19 была повышена экспрессия генов, отвечающих за продукцию воспалительных цитокинов (ИФН I/II типа, ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-17) и активации NF- $\kappa$ B, несмотря на то, что все дети с МВС получали иммуномодулирующую терапию до начала исследования [188].

В соответствии с многофазной иммунной активацией, у детей с МВС наблюдается воспаление различных органов, преимущественно желудочно-кишечного тракта; повышенные циркулирующие уровни комплемента C5b9, что свидетельствует о микроангиопатии; высвобождение тропонина и натрийуретических пептидов, что свидетельствует о воспалении миокарда и

эндокарда [46, 82]. У детей с МВС могут также наблюдаться мукозит и аневризмы коронарных артерий – признаки, характерные для болезни Кавасаки. Однако исследования выявили значительные различия между иммунологическими профилями, связанными с развитием этих заболеваний. По сравнению с пациентами с болезнью Кавасаки, у пациентов с МВС наблюдается более выраженная лимфопения, нейтропения и тромбоцитопения, а также повышенная экспрессия HLA-DR, маркера активации Т-клеток, и CD57, маркера CD4+ Т-клеток [83]. Циркулирующие уровни белков, связанных с повреждением эндотелия, выше у людей с болезнью Кавасаки, чем у детей с МВС, что отражает более частое распространение артериита при болезни Кавасаки [197]. Эти различия могут объяснить, почему подавляющее большинство аневризм коронарных артерий при МВС рассасываются в течение 30 дней, что контрастирует с персистирующими аневризмами, связанными с болезнью Кавасаки.

### **1.3. Особенности поражения органов желудочно-кишечного тракта при COVID-19**

Нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2 часто обнаруживается в просвете пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки и железистых эпителиальных клетках прямой кишки [43]. В то же время в этих же органах была обнаружена повышенная экспрессия АПФ-2, что подтверждает связанную с ним SARS-CoV-2 инвазию [98, 184]. Известно, что после SARS-CoV-2 инвазии в эти органы запускается каскад воспалительных реакций, включая ряд этапов: прямой цитопатический эффект и дисрегуляция иммунной системы с избыточной секрецией провоспалительных цитокинов [100].

После вирусной инвазии происходит репликация РНК с образованием новых вирионов [81, 146]. В ответ CD4+ Т-клетки мигрируют в стенку органов пищеварительной трубки, что сопровождается иммунным повреждением и диареей [62]. Этот процесс регулируется экспрессией АПФ-2, являющегося ключевым

ферментом ренин-ангиотензиновой системы. Было показано, что потеря АПФ-2 приводит к накоплению ангиотензина II. Более того, в плазме крови пациентов с тяжелой формой заболевания COVID-19 наблюдаются более высокие уровни интерлейкина IL-7, IL-10, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и рекомбинантного человеческого интерферон-индуцированного протеина-10, моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1, макрофагального воспалительного протеина-1А и фактора некроза опухоли альфа [43]. Локальное воспаление в стенке органов желудочно-кишечного тракта приводит к денудации кишечного барьера, и, соответственно, повреждению клеток, вызванному репликацией и распространением вируса [29, 164, 180]. Этот процесс воспаления приводит к нарушению состава микробиоты, способствуя активации Тх17 в стенке кишки, привлечению других иммунных клеток, таких как нейтрофилы, что вызывает иммунное повреждение кишечника [63, 64, 75, 103].

В своей недавней работе Xiao et al. [92] показали, что среди 73 госпитализированных пациентов в 53,42% обнаружили положительный результат на SARS-CoV-2 в кале, а его значения сохранялись от 1 до 12 дней. Следует отметить, что у 23,29% пациентов при наличии положительного результата на SARS-CoV-2 в кале, и положительного маркирования АПФ-2 и нуклеокапсидного белка в биоптатах желудка, двенадцатиперстной кишки и прямой кишки отмечали отрицательный тест назофарингеального мазка.

## **1.4. Иммунная функция червеобразного отростка**

### **1.4.1. Функциональная гистология червеобразного отростка**

Стенка червеобразного отростка состоит из слизистой, подслизистой, мышечной и серозной оболочек, морфофункциональные особенности которых варьируют.

Так, слизистая оболочка состоит из однослойного цилиндрического эпителия с энтероцитами и бокаловидными клетками. Наряду с макрофагами в собственной пластинке в избытке присутствуют IgA- или IgG-продуцирующие плазматические клетки. Интраэпителиальные лимфоциты в червеобразном отростке представлены небольшим количеством CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (Treg). В слизистой оболочке также обнаруживаются Либеркрюновы железы (крипты) с расположенными на их дне клетками Панета, их основная функция – продукция различных антимикробных пептидов [198].

Подслизистая оболочка состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани и характеризуется наличием множества лимфоидных фолликулов, которые проникают из подслизистой оболочки в собственную пластинку слизистой оболочки. Мантийная зона лимфоидных фолликулов содержит большое количество плотно расположенных В-лимфоцитов и небольшим количеством Т-лимфоцитов. Темная зона внутри герминального центра состоит из макрофагов и центробластов, которые заселяют фолликул путем моноклональной экспансии. Центроциты образуют светлую зону вместе с дендритными клетками (ДК) фолликула. ДК способны активировать центроциты путем презентации антигена, что стимулирует выработку иммуноглобулинов. После взаимодействия с Т-клетками центроциты также могут дифференцироваться в плазмобласты или В-клетки памяти. Между эпителием и лимфоидными фолликулами находится отдельная зона иммунных клеток, состоящая из макрофагов, В- и Т-клеток. Кроме того, в Т-зоне лимфоидных фолликулов находятся Т-клетки и макрофаги, преимущественно CD4<sup>+</sup> [181].

В червеобразном отростке имеется значительное количество НК-клеток, которые могут продуцировать цитокины и хемокины после активации. Также по сравнению с остальной частью кишечника локально повышено количество CD3<sup>+</sup> клеток с CD45-R, которые обеспечивают миграцию прежде всего Т-лимфоцитов. CCL21 способствует хемотаксису Т- и В-лимфоцитов в лимфоидную ткань червеобразного отростка и миграцию активированных дендритных клеток обратно в лимфатические узлы [167].

### 1.4.2. Иммунный ответ при остром аппендиците

В течение многих лет исследователи пытаются выявить закономерности в степени и характере локального иммунного ответа при остром аппендиците, однако данные остаются довольно противоречивыми. Тем не менее, в последнее время появляется все больше данных, которые помогают систематизировать знания о природе иммунного ответа.

По мнению некоторых авторов, наблюдается четкая тенденция к повышению уровня IL-10 у пациентов с осложненным аппендицитом по сравнению с неосложненными формами [79]. Полиморфизм IL-6 также связывают с тяжестью течения острого аппендицита и более выраженный IL-6-опосредованный ответ у пациентов с гангренозной формой острого аппендицита [37, 118].

Стоит отметить, что в своей работе Peeters et al. при анализе иммунного ответа, обнаружили повышение концентрации IL-6 и IL-10. Это показывает, что данные цитокины (про- и противовоспалительные) являются ключевыми участниками при развитии острого аппендицита. При этом уровень IL-6 не коррелировал с содержанием С-реактивного белка или количеством лейкоцитов, а IL-10, напротив, демонстрировал корреляцию с СРБ. Это можно объяснить вариабельностью концентрации указанных биологически активных веществ и их участием в воспалительной реакции. Соотношение IL-10, IL-6, IL-1Ra и MCP-1 указывает на то, что сочетание этих цитокинов имеет важное значение при развитии острого аппендицита [37].

### 1.5. Особенности острого аппендицита у детей

Острый аппендицит является одним из основных заболеваний в педиатрии, требующим хирургического лечения. Это одна из наиболее частых причин госпитализации в развивающихся странах. Наиболее подвержены возникновению заболевания дети после 10 лет; однако мы должны уделять особое внимание детям

до 5 лет, поскольку у них наблюдается нетипичная клиническая картина, которая может осложнить постановку диагноза и выбор правильной тактики лечения [35].

В норме червеобразный отросток служит резервуаром для нормальной кишечной микрофлоры и состоит преимущественно из лимфоидной ткани, что делает его иммунокомпетентным органом [198].

По современным представлениям наиболее частой причиной воспаления червеобразного отростка является обструкция просвета проксимального сегмента в месте возле аппендикулярного отверстия слепой кишки. Все, что препятствует естественному дренажу из полости червеобразного отростка (фекалит, инородное тело, кишечные паразиты, гиперплазия / гипертрофия лимфоидной ткани, первичные опухоли – карциноид, аденокарцинома, лимфома или метастазы) вызывает структурно-функциональные изменения. В зависимости от длительности обтурации складывается специфическая клиническая картина и гистопатологические формы заболевания [27].

Образование фекалитов происходит, когда каловые массы, задерживаясь в аппендикулярном просвете, постоянно омываются минералами и уплотняются. Как и желчные камни, фекалиты и камни червеобразного отростка могут увеличиваться до критического диаметра, что приводит к полной обструкции просвета. Следствием этого является повышение внутрипросветного давления в обтурированной части червеобразного отростка, что нарушает кровообращение в слизистой оболочке кишечника и изменяет венозный дренаж, вызывая тромбоз аппендикулярной артерии, что приводит к трансмуральному инфаркту и перфорации. Наличие фекалитов в аппендикулярном отделе связано с высокой частотой осложнений острого аппендицита – перфорации в 18% случаев, аппендикулярного абсцесса в 42%. Таким образом, фекалит и аппендикулярные камни играют важную роль в патогенезе острого аппендицита [45].

Большинство авторов, ставящих под сомнение теорию обструкции, предполагают инфекционную природу острого аппендицита. При развитии инфекционного заболевания системный воспалительный ответ способен приводить к гиперплазии лимфоидных фолликулов, которые, в свою очередь, будут оказывать

влияние как на локальную микробиоту кишечника, так и на размер и диаметр червовидного отростка.

Ассоциация между инфекциями и развитием острого аппендицита обсуждается уже в течение многих лет, и несмотря на то, что точная причина острого аппендицита до сих пор остается неизвестной, в работах многих авторов прослеживается связь между вирусными заболеваниями и развитием острого аппендицита. Так, в своей работе Adler et al. выявили, что частота острого аппендицита была заметно выше в регионах и очагах, где наблюдались вспышки вирусных заболеваний [35]. В другом недавнем метаанализе, который включал в себя результаты 19 исследований и больше 900 пациентов была обнаружена взаимосвязь между развитием острого аппендицита и заболеваемостью вирусом кори, вирусами гриппа, флавивирусами, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), герпесвирусами человека, ротавирусом и аденовирусом [194]. В исследовании, проводившемся у детей, обнаружили, что аденовирус был самым распространенным вирусом с частотой встречаемости 5,4%, за ним следовал ротавирус (4,7%) [90]. Другие исследования продемонстрировали аналогичные и более высокие показатели встречаемости аденовируса от 4,7% до 48,7% [28, 195].

В то же время многие авторы отмечают, что в их работах прослеживается определенная связь между клинико-морфологической формой острого аппендицита и предполагаемым видом возбудителя. Richardsen et al., оценивая результаты гистопатологических исследований, обнаружили, что в случаях перфоративного аппендицита преобладало инфицирование бактериями *E. coli*, стрептококками и *Pseudomonas aeruginosa*, в то время как хроническое воспаление с формированием инфильтрата чаще наблюдали при инфицировании иерсиниями [90].

## 1.6. Обзор связи между COVID-19 и острым аппендицитом у детей

Как уже было показано, на сегодняшний день данные об этиопатогенезе острого аппендицита у детей с COVID-19 немногочисленны и противоречивы, а вирусная инфекция способна провоцировать развитие этого состояния. В то же время инвазия SARS-CoV-2 в организм хозяина способна как активировать системный иммунный ответ, с возможным вовлечением червеобразного отростка, так и оказывать прямое цитопатическое действие на стенку желудочно-кишечного тракта.

В настоящее время информация о возможной связи между COVID-19 и острым аппендицитом представлена в мизерном количестве и нуждается в значительном дополнении и расширении. В исследовании Malhorta et al. сообщали о нескольких случаях острого аппендицита у детей, ассоциированных с положительными результатами исследования тестов на новую коронавирусную инфекцию. В той же работе авторы сообщали, что у детей с положительным результатом на SARS-CoV-2 количество деструктивных форм аппендицита преобладало по сравнению с контрольной группой [154]. В другой работе авторы сообщали о двух случаях острого аппендицита у детей, ассоциированном с развитием МВС [153].

При попытке раскрытия патогенеза COVID-19-ассоциированного аппендицита авторы ссылаются на высокую экспрессию рецептора АПФ-2 в стенке кишечника; SARS-CoV-2 может инфицировать стенку кишечника, нарушая барьерную функцию и способствуя микробной транслокации [80, 161]. Кроме того, обнаружение структурно-функциональных особенностей червеобразного отростка, таких как микротромбы, фибриноидный некроз кровеносных сосудов и периваскулярная лимфоцитарная воспалительная инфильтрация свидетельствуют об инфекции SARS-CoV-2, косвенно подтверждая связь между SARS-CoV-2 инвазией и острым аппендицитом, а схожие гистологические особенности были описаны при исследовании легочной ткани пациентов с COVID-19 [66, 173].

## 1.7. Заключение по обзору литературы

Тяжесть течения COVID-19 у детей существенно отличается от взрослых пациентов, что требует отдельного и более тщательного подхода в изучении заболевания. Кроме того, инвазия SARS-CoV-2 может оказывать влияние не только на текущее заболевание, но и участвовать в развитии отсроченных осложнений, связанных с функциональным статусом детей.

Молекулярно-биологические исследования инвазии SARS-CoV-2 и клинические наблюдения позволяют предположить, что высокий уровень АПФ-2 и других белков, необходимых для вирусной инвазии, способствует высокому уровню инфицирования детей. В то же время более эффективный иммунный ответ у детей и взрослых молодого возраста приводит к более легкому течению заболевания.

В научной литературе с начала пандемии появилось несколько сообщений о развитии COVID-19-ассоциированного аппендицита у детей. Патогенетические особенности заболевания недостаточно изучены, однако авторы отмечают сходство между специфическим воспалением в тканях червеобразного отростка и в легких у детей-пациентов с COVID-19. Для более подробной характеристики необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, является ли развитие острого аппендицита последствием вирусной инфекции или развивается независимо от основного заболевания.

На сегодняшний день имеется достаточное количество работ, в которых описывается, что SARS-CoV-2 инвазия в органы, прежде всего в эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта у взрослых, способствует прогрессированию гастроинтестинальных симптомов. Однако у детей такая инвазия может протекать в бессимптомной форме и вызывать развитие острого аппендицита на фоне мнимого благополучия.

На данный момент накоплено недостаточно данных о том, как коронавирусные инфекции способны влиять на течение и прогрессирование

острого аппендицита у детей, однако некоторые авторы указывают на преобладание деструктивных форм, возможно, ассоциированных с COVID-19.

Для подтверждения гипотезы о тропизме SARS-CoV-2 в отношении эпителиальных клеток и других структур червеобразного отростка у детей, в частности, требуется проведение морфологических и молекулярно-генетических и других комплексных исследований.

Отдельно следует подчеркнуть, что необходимо проведения анализа локального иммунного ответа червеобразного отростка у детей не только с COVID-19, но и в условиях неинфекционной природы острого аппендицита, что позволит определиться с механизмами иммунных реакций при остром аппендиците в целом (возможно выявить один из этиопатогенетических факторов) и, COVID-19-ассоциированном в частности.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проводили на базе отдела патоморфологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### 2.1. 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 «новая 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», полученных 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. Макроскопические признаки наличия воспалительного и/или опухолевого процесса отсутствовали. Причины смерти у детей представлены в таблицах 3.3 и 3.4. Операционный и аутопсийный материал получали в патологоанатомическом отделении ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗМ» (за представление материала для исследования выражаем признательность заведующему ПАО ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ» Кислякову А.Н.).

Материал всех парафиновых блоков трех групп был предварительно исследован полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на SARS-CoV-2.

Критерии исключения во всех группах: группа детских инфекций, эндокринные заболевания, аутоиммунные заболевания, сепсис, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты В и С, сахарный диабет, другие воспалительные заболевания кишечника, опухоли органов кроветворения, лимфопролиферативные заболевания.

Проведение настоящего исследования одобрено Локальным этическим комитетом МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России (Протокол № 6 от 04.06.20).

## **2.2. Методы исследования**

Морфологическое исследование операционного и аутопсийного материала червеобразных отростков детей проводили в отделе патоморфологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России.

Методы исследования:

- 1) гистологический;
- 2) морфометрический;
- 3) иммуногистохимический;
- 4) *in situ* гибридизация;
- 5) полимеразная цепная реакция в режиме реального времени;
- 6) статистический.

### **2.2.1. Гистологическое исследование**

После извлечения оценивали внешний вид червеобразных отростков и мезоаппендикса. Фрагменты червеобразных отростков (из трех участков: основание, середина, верхушка) (Рисунок 2.1) 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.

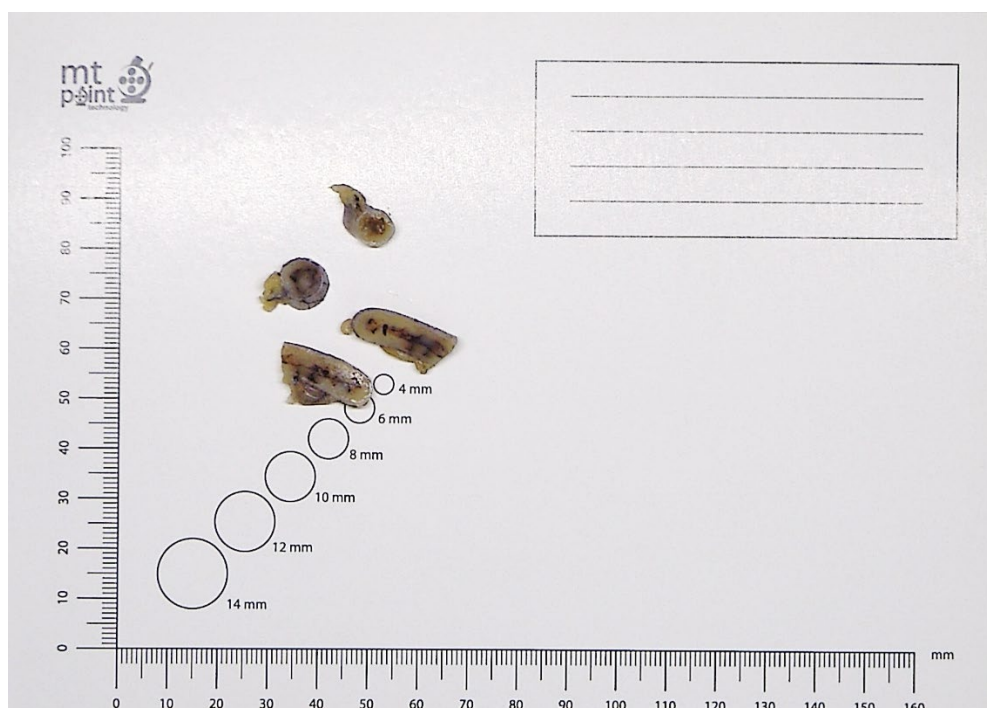


Рисунок 2.1 – Макроскопическая картина острого аппендицита у детей с новой коронавирусной инфекцией. Вырезка червеобразного отростка. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

### 2.2.2. Морфометрическое исследование

Каждый отрезок червеобразного отростка, представляющий сегмент, тщательно изучался под световым микроскопом с учетом следующих гистоморфометрических параметров: длина органа, толщина стенки, диаметры, глубина кишечных крипт, наибольший диаметр лимфоидного фолликула при максимальной толщине. Диаметры отростка (наружный и внутренний) рассчитывали с помощью формул  $[D = C/\pi, A = rD^2 /4]$ , толщина стенки = D

серозно-мукозной оболочки / 2, учитывая значения наружной (серозной) окружности и внутренней (мукозной) окружности. Данные параметры рассчитывали в микрометрах: средний люминальный диаметр, средний диаметр лимфоидных фолликулов и средняя окружность условной линии «tunica serosamucosa» – толщина стенки).

В микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином проводили морфометрическое и другие исследования в 10-ти случайно выбранных полях зрения светового микроскопа при увеличении  $\times 400$  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.

### 2.2.3. Иммуногистохимическое исследование

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  $1,6 \text{ мм}^2$ , затем количественную плотность CD+ клеток на  $1 \text{ мм}^2$  рассчитывали по формуле:

$$N \text{ в } 1 \text{ мм}^2 = \frac{\sum N \times 1000000 \text{ мкм}^2}{N \text{ полей зрения} \times S \text{ одного поля (мкм}^2)}$$

где  $\sum N$  – суммарное количество CD+ клеток во всех исследуемых полях.

Затем полученные количественные данные переводили в баллы от 1 до 4 баллов, 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 мм<sup>2</sup>.

Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи системы анализа изображений ImageJ для оценки результатов иммуногистохимической реакции и определения площади позитивно окрашенных объектов в поле зрения. Проводили микрофотосъемку в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении ×200 на микропрепаратах с выполненной ИГХ реакцией с соответствующими первичными антителами. Далее полученное изображение подвергали автоматической нормализации и переводили из режима цветной 24-битной картинки (RGB) в режим 256 градаций серого, после чего выполняли бинаризацию объектов с заданным уровнем чувствительности. При дальнейшей обработке микрофотографий системой анализа изображений отсекались бинарные объекты с уровнем яркости >150 и выполнялось определение суммарной площади позитивно окрашенных объектов от общей площади микрофотографий.

Анализ иммуногистохимических реакций проводили при использовании микроскопа при разных увеличениях, как при помощи программного обеспечения, так и исследователем.

#### **2.2.4. Гибридизация in situ**

Для визуализации вирусной РНК применялась RNAscope согласно рекомендациям производителя. Вначале проводилось окрашивание с помощью набора Multiplex Fluorescent Detection Kit v2 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с протоколами производителя. Предметные стекла высушивали при 55°C в течение ночи, затем предварительно обрабатывали перекисью водорода с последующей пермеабиллизацией в реактиве для демаскировки мишеней в течение 3 минут в

парогенераторе, после чего стекла помещали в раствор протеазы III (Sigma-Aldrich, США) при 40°C на 15 мин. Комбинацию зондов для обнаружения РНК-мишени гибридизовали при 40°C в течение 2 часов. Зонды в канале С4 были разработаны с помощью вспомогательного набора RNAscope 4-Plex (Sigma-Aldrich, США). Для мультипликации сигнала последовательно применялись красители Opal 520 (Sigma-Aldrich, США), Opal 570 (Sigma-Aldrich, США) и Opal 690 (Sigma-Aldrich, США). Для проведения оценки фонового окрашивания применяли отрицательный контроль в виде зонда для гена *dapB* штамма SMY *Bacillus subtilis* с использованием реагента 3-plex Negative Control (Sigma-Aldrich, США). Далее на завершающей стадии проводилось окрашивание DAPI (Sigma-Aldrich, США) для выявления ядер. Стекла покрывали с помощью среды Mount Solid (Sigma-Aldrich, США). Затем проводилась визуализация с помощью конфокальной микроскопической системы Leica STELLARIS.

### **2.2.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени**

РНК выделяли из ткани червеобразного отростка с помощью набора RNeasy FFPE (Qiagen, Германия). Для выявления SARS-CoV-2 была проведена ПЦР-РВ с использованием набора для одностадийной ПЦР QuantiTect (Qiagen).

Анализ экспрессии генов *АПФ2* и *Фурина* проводили с использованием метода определения порогового цикла ( $\Delta C_t$ ) и расчета относительной экспрессии генов по протоколу. Нормирование и внутренний контроль проводили для гена GAPDH. Статистический контроль проводили относительно контрольной группы, статистически достоверным считали значения при  $p < 0,01$ .

Подбор праймеров осуществлялся на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Праймеры, используемые для идентификации SARS-CoV-2, АПФ2 и Фурина

Ген	5' - праймер	3' - праймер
<i>SARS-CoV-2</i>	WuhanCoV-spk2-f 5'-TTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGT-3'	
	WuhanCoV -spk2-r 5'-TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG-3'	
	WuhanCoV-spk2-hex-p5'-HEX-TCAAATGGCACACACTGGTTTGT-BHQ1	
<i>АПФ2</i>	ACCTCACTATTTGAAAGCACTT GGT	GCTTGCTTGAGCAGGAAGTTT ATTT
<i>Фурин</i>	CCACATGACTACTCTGCTGATG G	CGAGAGTGAACCTGGTTCAGCG T

### 2.2.6. Статистические методы

Для всех количественных данных проводили проверку на нормальность. При нормальном распределении вычисляли групповое среднее 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 проводились 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  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этот раздел посвящен характеристике операционного и аутопсийного материала червеобразных отростков детей, полученного от пациентов с установленной новой коронавирусной инфекцией и вне пандемии, а также клиническим данным.

### 3.1. Клиническая характеристика

Клинический анализ проводили на 42 детях-пациентах с острым аппендицитом с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией, 55 пациентах с острым аппендицитом и 38 умерших вне пандемии COVID-19 (Таблица 3.1). Всем детям I и II группы была выполнена лапароскопическая аппендэктомия.

Таблица 3.1 – Возрастная периодизация детей [2]

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

### *Характеристика пациентов с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией*

При включении в исследование для достоверности полученных результатов проводили тщательный анализ историй болезни для исключения возможного влияния хронических заболеваний или получаемых лекарственных препаратов.

Диагноз у всех пациентов I группы (n=42), согласно медицинской документации: Основное заболевание – Новая коронавирусная инфекция (подтвержденная результатами нозофарингеального мазка ПЦР+). Сопутствующее заболевание – Острый аппендицит. У детей всех возрастов наблюдали среднюю степень тяжести состояния, обусловленную течением острой хирургической патологии – острым аппендицитом (Таблица 3.2). В общем анализе крови у всех пациентов (n=42) отмечали лейкоцитоз со смещением лейкоцитарной формулы влево; СОЭ – увеличение. 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 послеоперационный период не обнаружили; заживление операционной раны – первичным натяжением; дети были выписаны в среднем на 8 сутки после операции.

Таблица 3.2 – Клинические симптомы у детей с COVID-19

<b>Критерий тяжести течения заболевания</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Легкая форма</b>		
Результаты лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 – положительные. Лихорадка <38,0 °С, симптомы интоксикации (слабость) и поражение верхних дыхательных путей (заложенность носа). При осмотре: изменения в ротоглотке; аускультативных изменений в легких нет. Во всех случаях наблюдались только гастроинтестинальные симптомы (тошнота, рвота, боль в животе и диарея).	42	100

Смерть пациентов, умерших вне пандемии COVID-19 (контрольная группа), наступила в результате декомпенсации или осложнения течения ряда заболеваний (Таблица 3.3, Таблица 3.4).

Таблица 3.3 – Основное заболевание умерших детей вне пандемии COVID-19 (контрольная группа)

Основное заболевание	n	%
<b>Контроль</b>	38	100
3 – 7 (первый период детства)		
Врожденные пороки развития	8	21
7 – 12 (второй период детства)		
Врожденные пороки развития	6	15,7
Идиопатическая апластическая анемия, сверхтяжелая форма	2	5,2
Спонтанное нетравматическое субарахноидальное кровоизлияние в области мозжечка с прорывом в желудочковую систему головного мозга	1	2,6
Детский церебральный паралич	2	5,2
Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшена	2	5,2
Дилатационная кардиомиопатия	1	2,6
12 – 18 (старший школьный возраст, подростки)		
Врожденные пороки развития	7	18,4
Диффузная глиома высокой степени злокачественности	4	10,5
Синдром Гудпасчера: диффузный гломерулонефрит с глобулярными отложениями фибрина, сегментарным некрозом и полулуниями	4	10,5
Дилатационная кардиомиопатия	1	2,6

Таблица 3.4 – Причина смерти у детей вне пандемии COVID-19 (контрольная группа)

<b>Непосредственная причина смерти</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Острая сердечно-сосудистая недостаточность	4	10,5
Хроническая сердечно-сосудистая недостаточность	16	42,1
Отек головного мозга с дислокацией створчатых структур	2	5,2
Острый респираторный дистресс-синдром	4	10,5
Полиорганная недостаточность	12	31,5
<b>Итого:</b>	<b>38</b>	<b>100</b>

### **3.2. Морфологическая и морфометрическая характеристика червеобразных отростков пациентов**

Во всех образцах червеобразных отростков у детей I группы наблюдали следующие морфологические формы острого аппендицита [21]: простой аппендицит (n=1), флегмонозно-язвенный аппендицит (n=33) и гангренозный аппендицит (n=8) (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Морфологические формы острого аппендицита у детей с COVID-19

<b>Группа/Форма</b>	<b>n</b>	<b>простой</b>	<b>флегмонозно-язвенный</b>	<b>гангренозный</b>
3 – 7 (младшее детство)	9	1	7	1
7 – 12 (детство)	13	0	10	3
12 – 18 (подростки)	20	0	16	4
<b>Итого:</b>	<b>42</b>	<b>1</b>	<b>33</b>	<b>8</b>

При макроскопическом исследовании червеобразного отростка с простым аппендицитом отмечали слабую гиперемию серозной оболочки. При микроскопическом исследовании образца (n=1) обнаружили полнокровие кровеносных сосудов с наличием микротромбов, слабую лимфоцитарную

инфильтрацию слизистой оболочки, гиперплазию лимфоидной ткани и фекалит (Рисунок 3.1).

В большинстве микропрепаратов червеобразных отростков (n=33) при патоморфологическом исследовании был выявлен флегмонозно-язвенный аппендицит. Макроскопически: червеобразные отростки были увеличены в размерах, серозная оболочка тусклая, гиперемирована, стенка отечна, с наличием гнойной инфильтрации, распространяющейся на брыжейку и единичными очагами некроза в подслизистой оболочке. При микроскопическом исследовании отмечали отек стенки, полнокровие кровеносных сосудов с наличием микротромбов, расширение крипт, очаговую гиалинизацию стромы, гиперплазию лимфоидной ткани и диффузную лейкоцитарную инфильтрацию слизистой и подслизистой оболочки, преимущественно за счет нейтрофилов, с участками изъязвлений и эрозий (Рисунок 3.2).

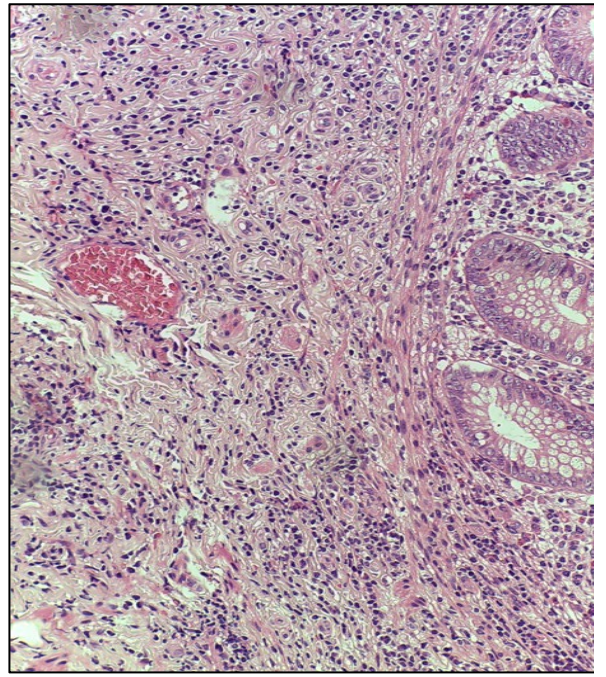
У 8-и детей выявили гангренозный аппендицит. Макроскопическая характеристика червеобразного отростка: увеличен в размерах, отечный и гиперемированный, с наличием изъязвлений; стенка и брыжейка с инфильтрацией и очагами некрозов. При микроскопическом исследовании: стертая демаркация между оболочками, отек стенки, полнокровие кровеносных сосудов, массивная лимфоцитарная инфильтрация, очаги коагуляционного некроза с эрозиями (в 2 микропрепаратах – некроз слизистой оболочки) и изъязвлениями. В просвете червеобразных отростков визуализировали гнойный экссудат с геморрагическим компонентом (Рисунок 3.2).

Следует отметить, что во всех микропрепаратах, независимо от формы аппендицита, наблюдали микротромбы, фибриноидный некроз стенки кровеносных сосудов и периваскулярную лимфоцитарную инфильтрацию.



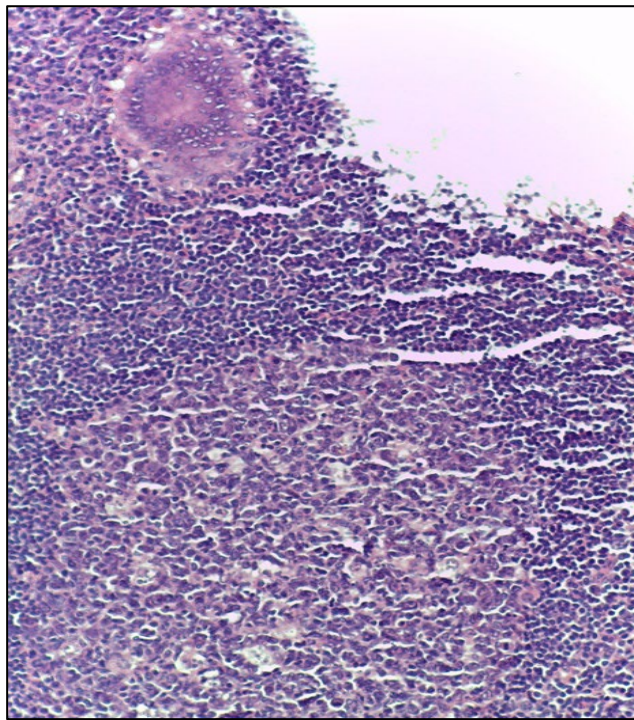
А

Макроскопическое строение,  
гангренозный аппендицит



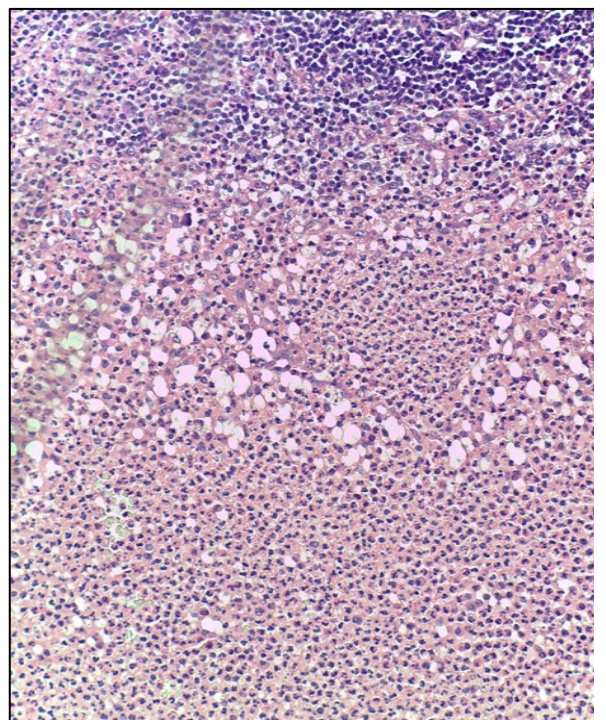
Б

Острый простой аппендицит



В

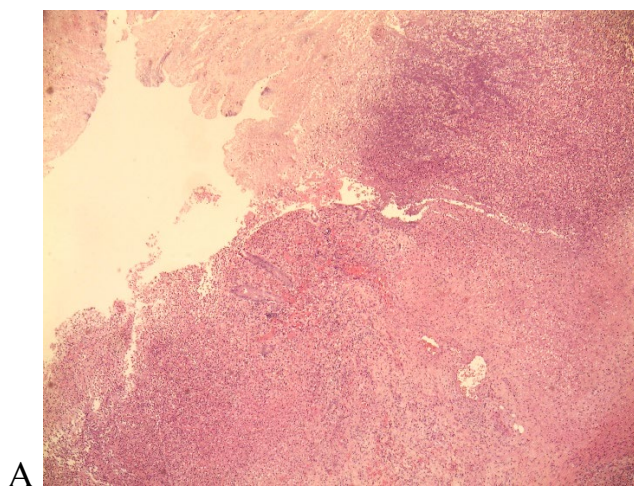
Острый флегмонозно-язвенный  
аппендицит



Г

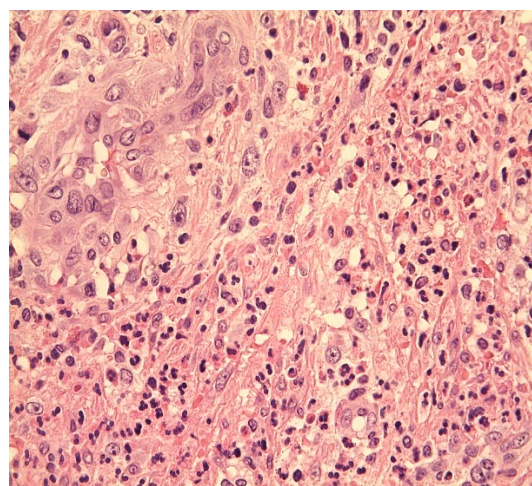
Острый гангренозный аппендицит

Рисунок 3.1 – Морфологическая (макро- и микроскопическая) картина острого аппендицита у детей с новой коронавирусной инфекцией. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$



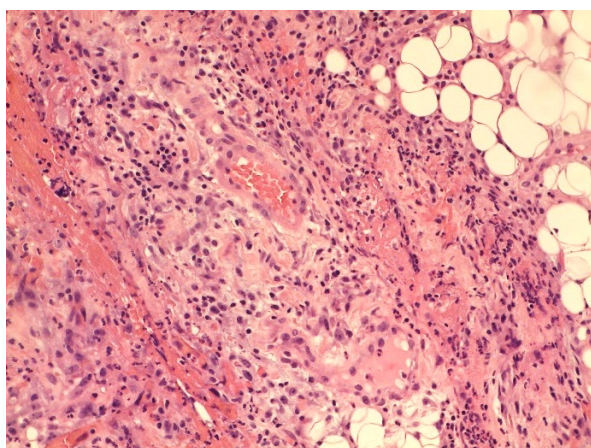
А

Деструктивные изменения  
червеобразного отростка



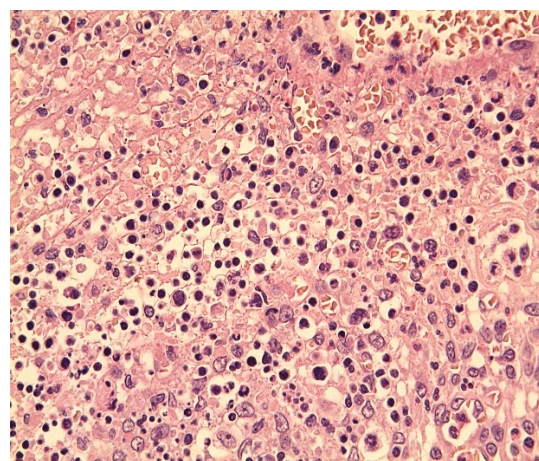
Б

Отёк, воспалительная инфильтрация,  
преобладание плазмоцитов



В

Полнокровные кровеносных сосудов,  
сладж, тромбы



Г

Отёк, воспалительная инфильтрация,  
преобладание плазмоцитов

Рисунок 3.2 – Патологоанатомические особенности острого аппендицита у детей с новой коронавирусной инфекцией. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

Во всех образцах червеобразных отростков у детей II группы наблюдали следующие морфологические формы острого аппендицита [21]: простой аппендицит (n=16), флегмонозный аппендицит (n=31), гангренозный аппендицит (n=6) и гангренозно-перфоративный (n=2) (Таблица 3.6) (Рисунок 3.3, Рисунок 3.4).

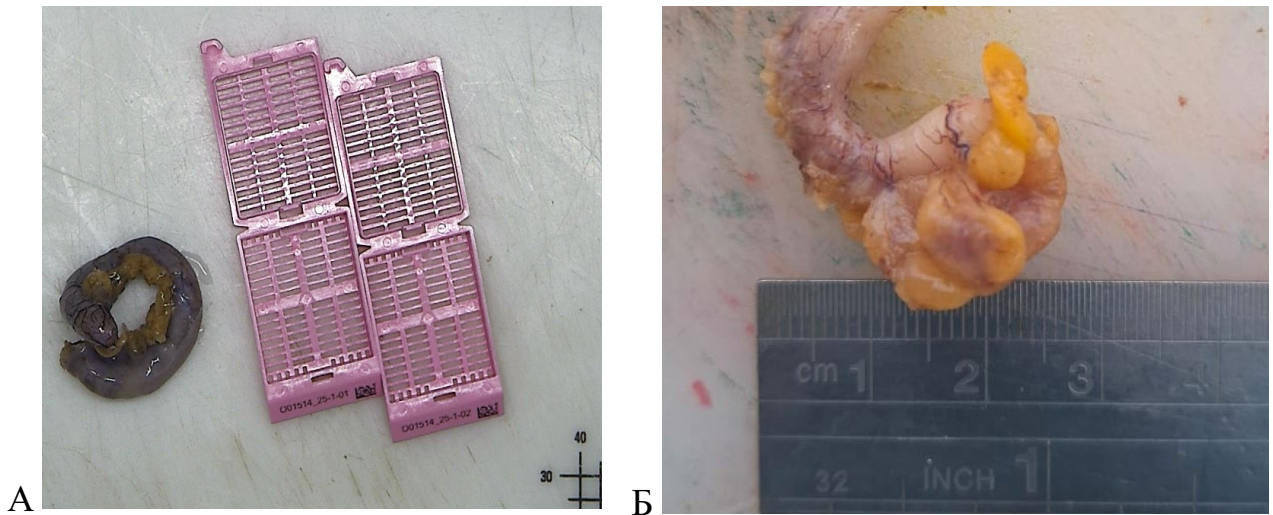


Рисунок 3.3 – Макроскопическое строение червеобразного отростка детей II-ой (острый флегмонозный аппендицит) и III-ей (интактной) групп

Таблица 3.6 – Морфологические формы острого аппендицита у детей II группы

Группа	n	П	Ф	Г	ГП
3 – 7 (младшее детство)	15	9	5	1	0
7 – 12 (детство)	19	5	13	1	0
12 – 18 (подростки)	21	2	13	4	2
<b>Итого:</b>	<b>55</b>	<b>16</b>	<b>31</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

Примечание: П – простой, Ф – флегмонозный, Г – гангренозный, ГП – гангренозно-перфоративный

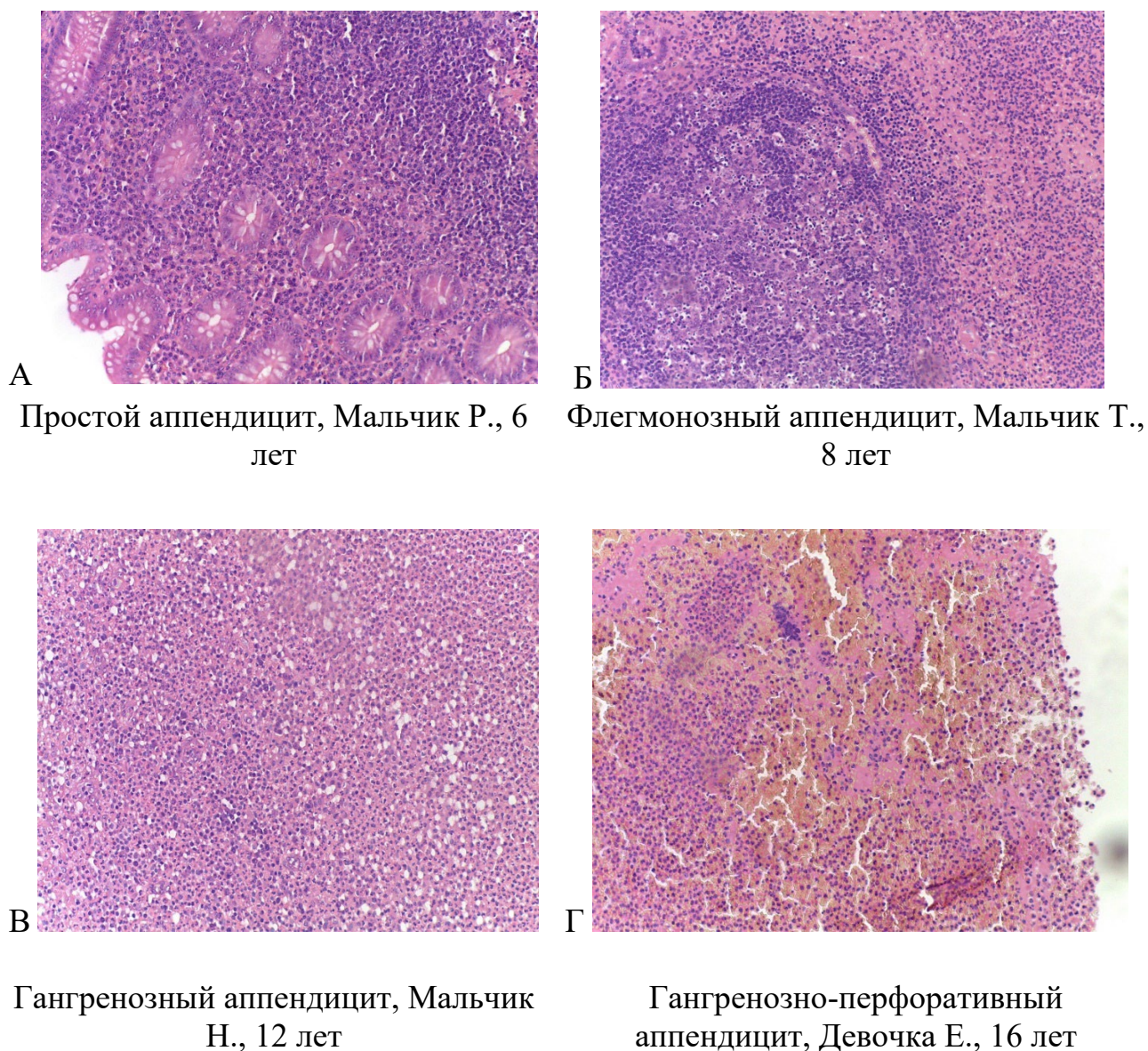


Рисунок 3.4 – Микроскопическая картина острого аппендицита у детей II группы.  
Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

При морфологическом исследовании червеобразных отростков детей III группы признаков воспалительного процесса и/или опухолевого роста не обнаружили (Рисунок 3.5 – Рисунок 3.7).

Слизистая оболочка червеобразного отростка выстлана однослойным цилиндрическим эпителием, образующим инвагинации в собственную пластинку – кишечные крипты, окруженные тонкой мышечной пластинкой и зонами лимфоцитарной инфильтрации. Подслизистая оболочка представлена рыхлой

волокнистой соединительной тканью. В собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой оболочке находятся многочисленные лимфоидные фолликулы. В-зоны соответствуют собственно фолликулу, а Т-зона – это парафолликулярная зона. В их реактивных центрах и мантийных зонах происходит созревание преимущественно В-лимфоцитов. Мышечная оболочка образована наружным – продольным и внутренним – циркулярным слоями пучками гладких миоцитов. Снаружи червеобразный отросток покрыт висцеральным листком брюшины, который образует серозную (наружную) оболочку с однослойным плоским эпителием (мезотелием).

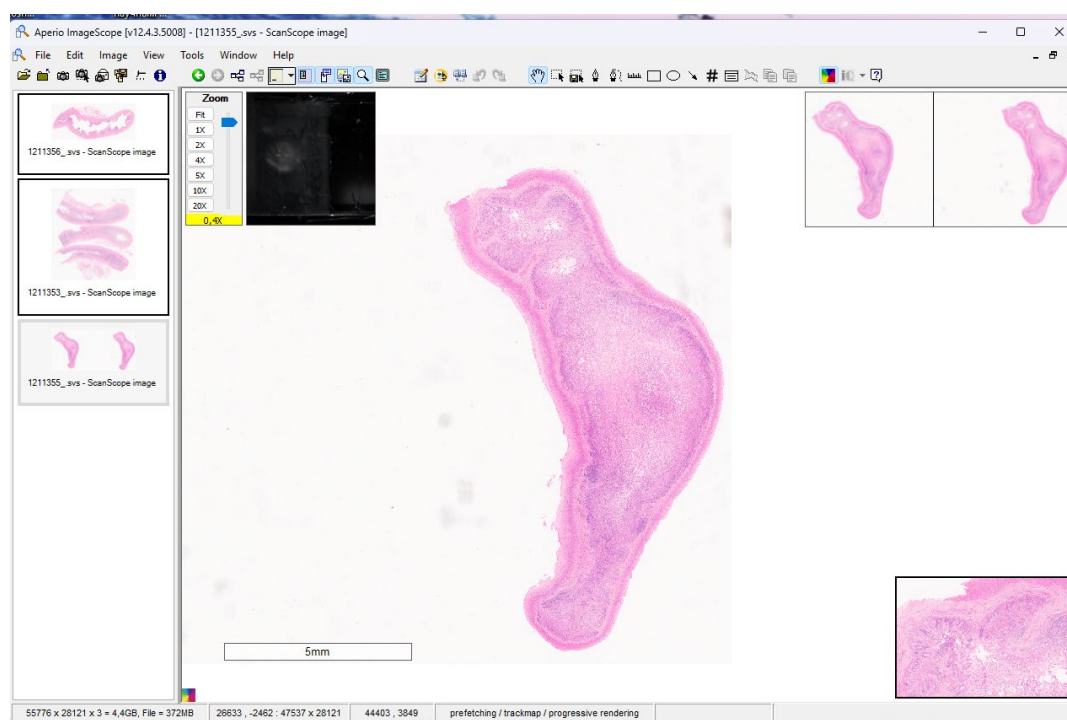


Рисунок 3.5 – Морфологическая картина червеобразного отростка у детей контрольной группы, возраста 3 – 7 (младшее детство). Девочка, Т., 4 г. Признаков воспалительного процесса и/или опухолевого роста не обнаружено. Гистоскан, программа – Aperio Image Scope [v12.4.3.5008], файлы\_svs. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

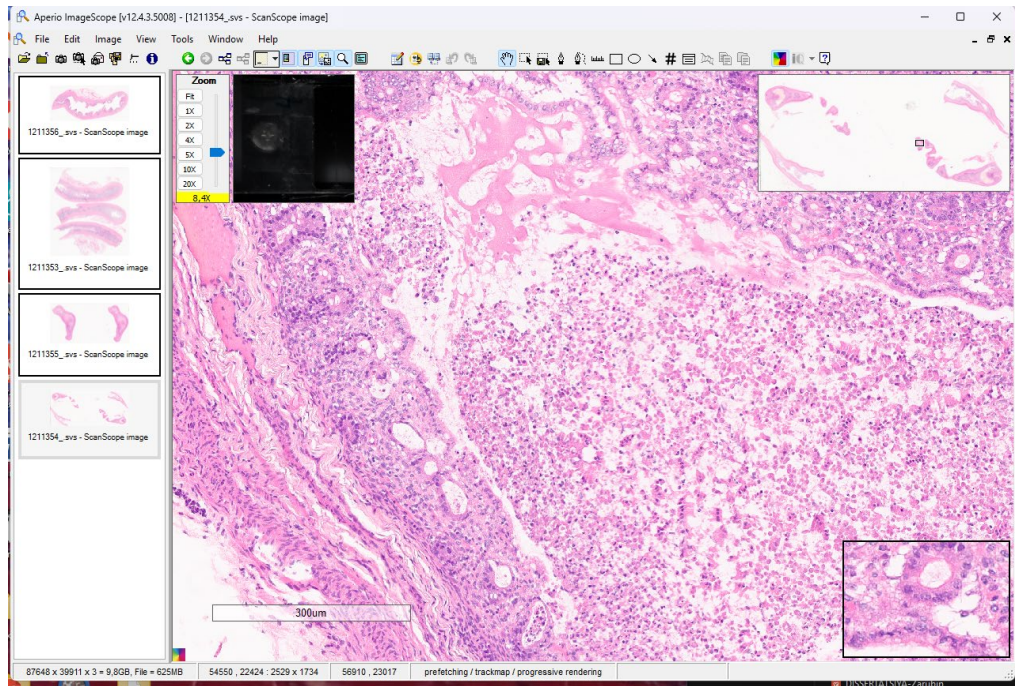


Рисунок 3.6 – Морфологическая картина червеобразного отростка у детей контрольной группы, возраста 7 – 12 (детство). Мальчик, К., 7 л. Признаков воспалительного процесса и/или опухолевого роста не обнаружено. Гистоскан, программа – Aperio Image Score [v12.4.3.5008], файлы\_svs. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

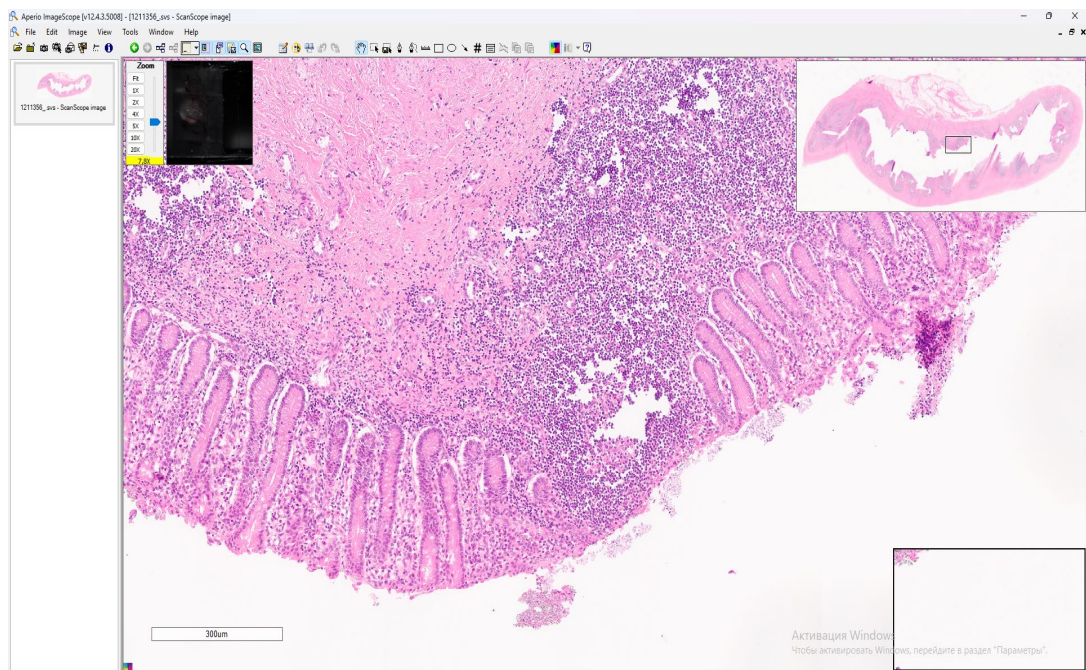


Рисунок 3.7 – Морфологическая картина червеобразного отростка у детей контрольной группы, возраста 12 – 18 (подростки). Мальчик, В., 17 л. Признаков воспалительного процесса и/или опухолевого роста не обнаружено. Гистоскан, программа – Aperio Image Score [v12.4.3.5008], файлы\_svs. Окраска: гематоксилин и эозин, увел.  $\times 200$

При морфометрическом исследовании червеобразных отростков детей с новой коронавирусной инфекцией обнаружили определенные гистоморфометрические особенности, результаты которых отображены в Таблице 3.7.

При сравнении 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 ( $p < 0,05$ ). 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.

Таблица 3.7 – Морфометрическая характеристика червеобразного отростков у детей исследуемых групп

Возраст (группа)	количество пациентов	длина органа, мм	толщина стенки, мкм	наружный диаметр, мм	внутренний диаметр, мкм	диаметр самого большого лимфоидного фолликула, мкм
Младшее детство (3 – 7 лет)						
COVID-19	9	65,3 ± 18,1	198,3 ± 72,6	6,2 ± 1,7	121,9 ± 62,7	112,2 ± 26,4
Острый аппендицит	15	63,1 ± 11,9	204,7 ± 66,8	6,3 ± 1,1	125,3 ± 69,2	92,1 ± 27,5
Контроль	20	62,3 ± 13,4	166,8 ± 75,9	6,1 ± 1,4	149,7 ± 101,4	83,5 ± 31,8
Детство (7 – 12 лет)						
COVID-19	13	69,5 ± 21,4	214,5 ± 62,1	7,1 ± 1,3	130,5 ± 51,8	115,3 ± 35,2
Острый аппендицит	19	67,3 ± 15,7	218,6 ± 61,7	6,5 ± 1,6	129,4 ± 53,9	93,7 ± 27,4
Контроль	21	65,7 ± 19,9	172,1 ± 71,3	6,6 ± 1,5	151,7 ± 84,6	84,2 ± 34,3
Подростки (12 – 18 лет)						
COVID-19	20	64,8 ± 16,5	221,9 ± 61,8	7,2 ± 1,9	132,9 ± 57,9	111,8 ± 23,7
Острый аппендицит	21	65,7 ± 16,1	217,9 ± 59,7	6,8 ± 2,1	136,7 ± 62,1	94,2 ± 28,1
Контроль	17	69,3 ± 17,4	181,7 ± 65,1	6,9 ± 1,8	162,3 ± 91,3	89,3 ± 31,8

### 3.3. Иммуногистохимическое исследование и гибридизация *in situ*

При конфокальной микроскопии червеобразных отростков детей-пациентов с новой коронавирусной инфекцией после 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 3.8, Рисунок 3.8).

Таблица 3.8 – Усредненное распределение клеток с выявленной РНК SARS-CoV-2 по возрастным группам, в %

возраст	подгруппа	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 3.8).

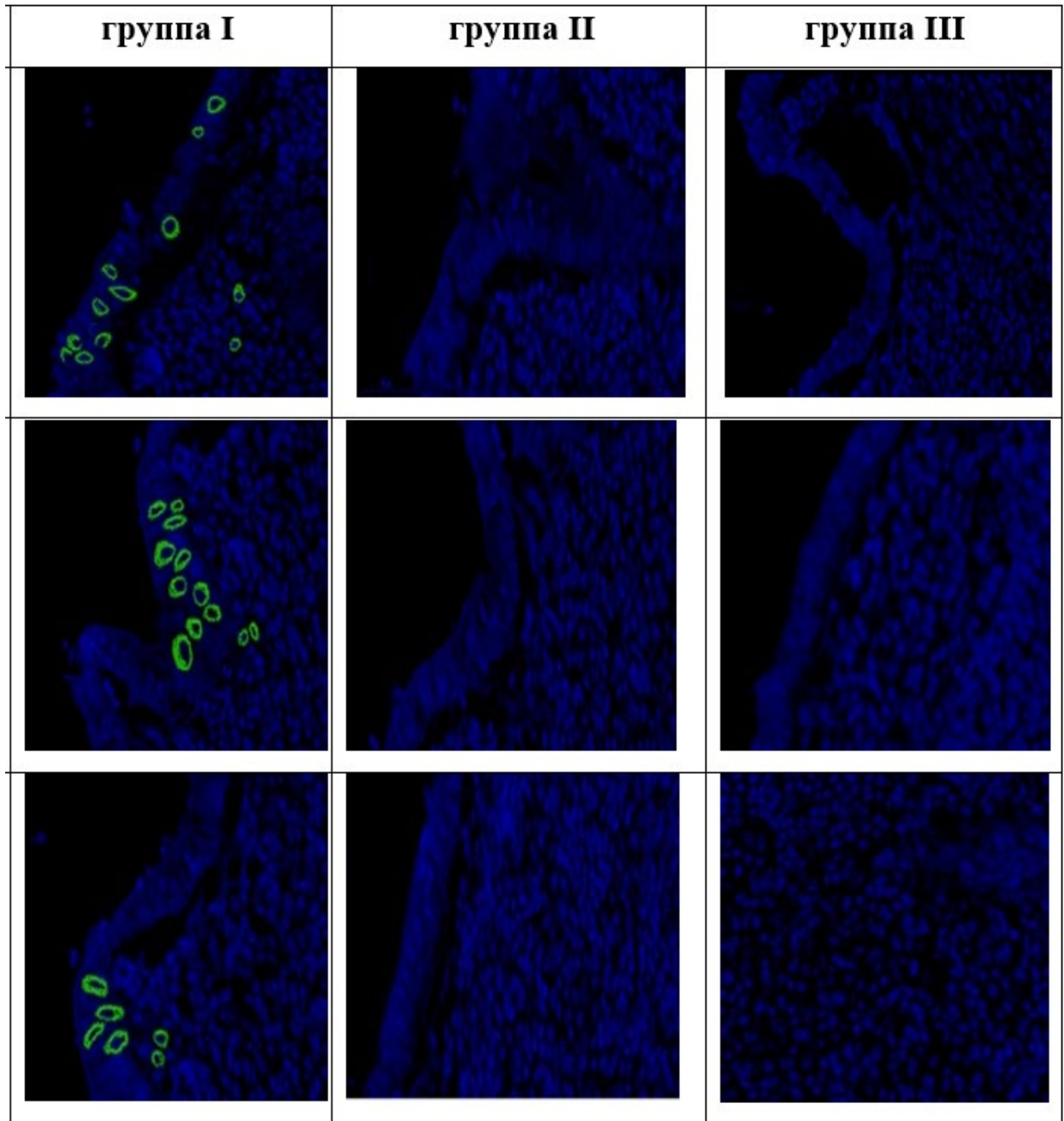


Рисунок 3.8 – РНК SARS-CoV-2 в червеобразных отростках детей при флуоресцентной гибридизации *in situ*, увеличение  $\times 200$ . Ряды: верхний – 3 – 7 (младшее детство); средний – 7 – 12 (детство); нижний – 12 – 18 (подростки)

При конфокальной микроскопии червеобразных отростков детей II и III групп после флуоресцентной гибридизации *in situ* не выявили наличия SARS-CoV-2.

### **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 (Таблица 3.9).

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 (Таблица 3.9).

При распределении на площади доля CD-позитивных иммунных клеток в I группе варьировала с наибольшим количеством 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 снижено. Также количество CD68-позитивных макрофагов было значительно увеличено у детей с острым аппендицитом без COVID-19.

Таблица 3.9 – Количество CD-позитивных клеток в 1 мм<sup>2</sup>, 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

### **CD3**

Маркер Т-лимфоцитов визуализировали в иммунных клетках слизистой оболочки червеобразного отростка детей всех групп. В то же время при новой

коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами. При использовании 4-х балльной оценочной шкалы у детей данной группы иммуномечение соответствовало 3 баллам, при этом среднее количество CD3 клеток составило  $18,2 \pm 0,4$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  (Таблица 3.7) (Рисунок 3.9).

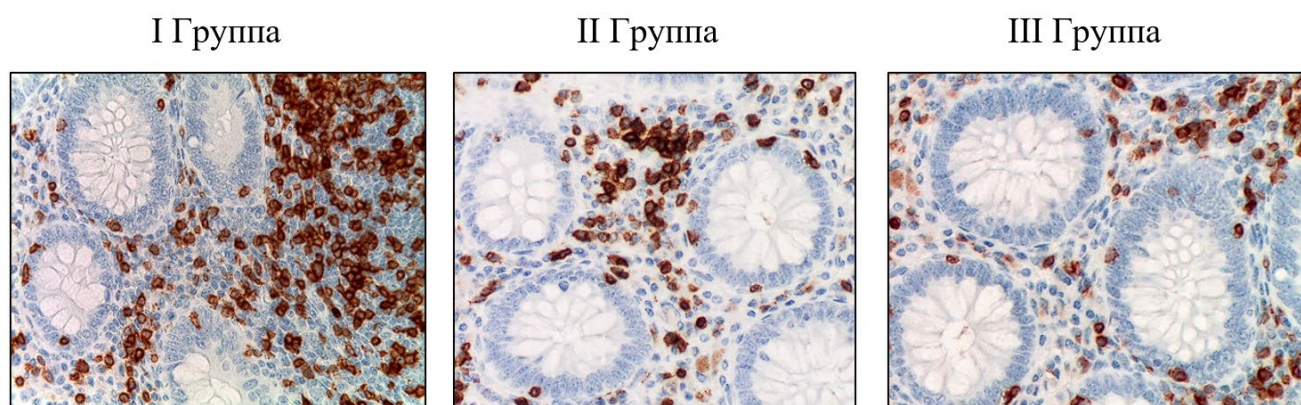


Рисунок 3.9 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD3, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

#### CD4

Позитивные иммуногистохимические реакции на CD4 (Т-хелперы) наблюдали в иммунных клетках слизистой оболочки червеобразного отростка детей всех групп. В то же время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами. При использовании 4-х балльной оценочной шкалы у детей данной группы иммуномечение соответствовало 2 баллам, а среднее количество CD4 клеток составило  $11,2 \pm 0,2$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  (Таблица 3.7, Рисунок 3.10).

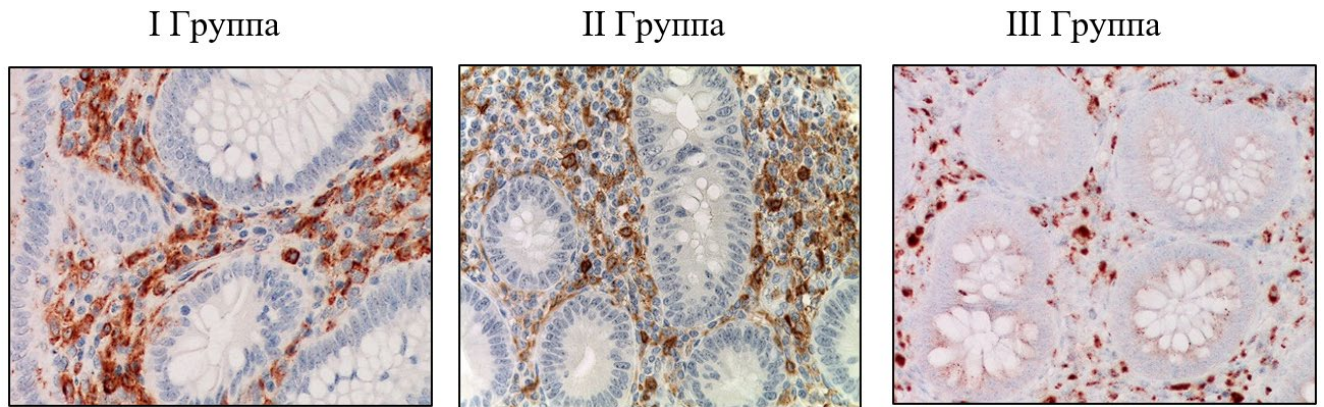


Рисунок 3.10 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD4, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

### CD20

В слизистой оболочке червеобразного отростка детей всех групп обнаружили CD20 В-лимфоциты. В то же время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами. При использовании 4-х балльной оценочной шкалы у детей данной группы иммуномечение соответствовало 4 баллам, а среднее количество CD20 клеток составило  $36,7 \pm 2,1$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  (Таблица 3.7, Рисунок 3.11).

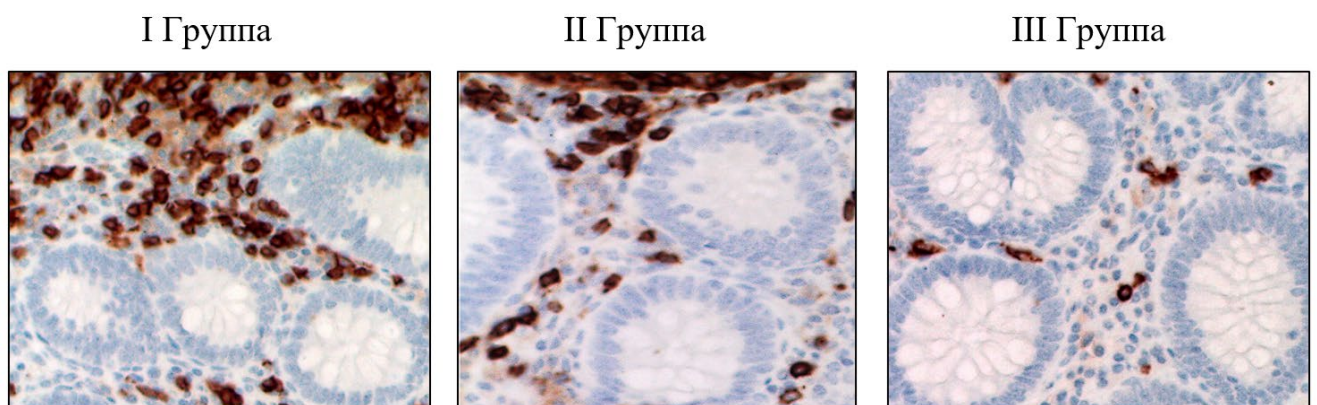


Рисунок 3.11 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD20, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

### CD138

В слизистой оболочке червеобразного отростка детей всех групп выявили CD138 (плазмоциты). В то же время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами. При использовании 4-х балльной оценочной шкалы у детей данной группы иммуномечение соответствовало 3 баллам, а среднее количество CD138 клеток составило  $19,6 \pm 0,4$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  (Таблица 3.7, Рисунок 3.12).

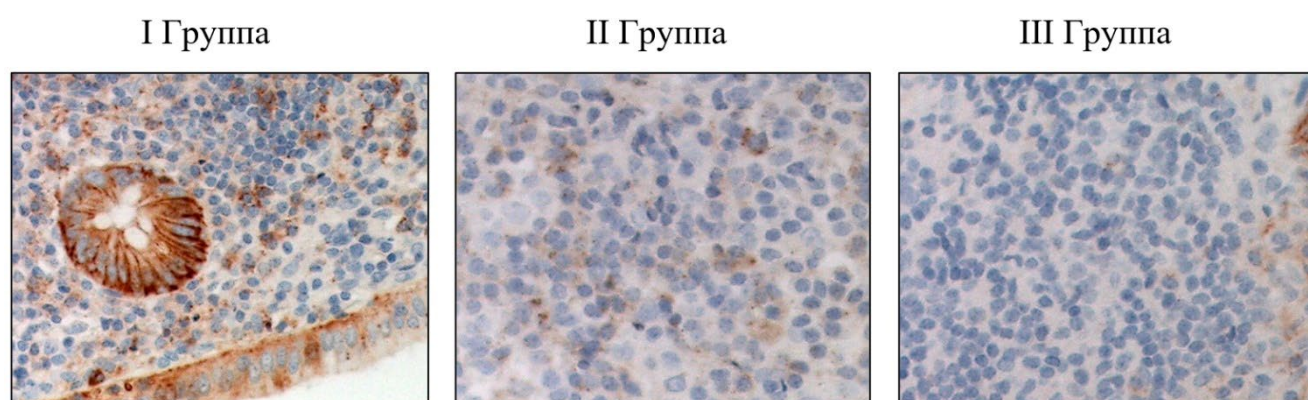
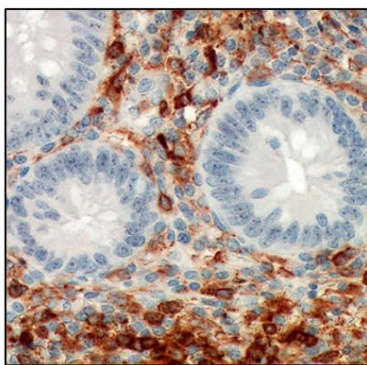


Рисунок 3.12 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD138, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

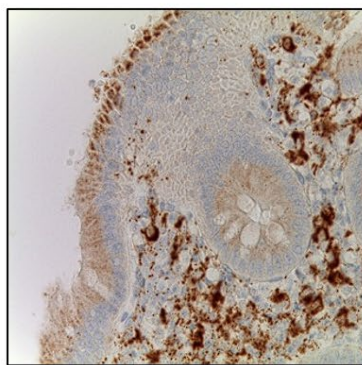
### CD68

В слизистой оболочке червеобразного отростка детей всех групп обнаружили CD68 (макрофаги). В то же время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами. При использовании 4-х балльной оценочной шкалы у детей данной группы иммуномечение соответствовало 4 баллам, а среднее количество CD68 клеток составило  $36,7 \pm 2,1$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  (Таблица 3.7, Рисунок 3.13).

I Группа



II Группа



III Группа

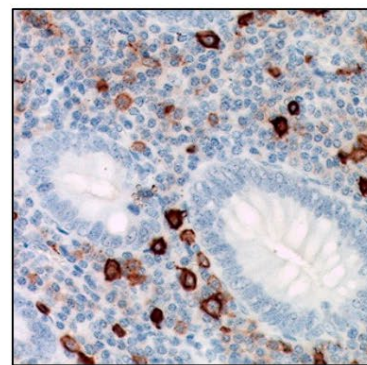


Рисунок 3.13 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD68, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

### Экспрессия цитокинов

При иммуногистохимическом исследовании обнаружили интерлейкин-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 (Таблица 3.8).

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. В то же время преобладание изучаемых маркеров наблюдали у детей с COVID-19 (Таблица 3.8).

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 (Таблица 3.10).

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 3.10 – Экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов в червеобразных отростках при остром аппендиците у пациентов с COVID-19 +, COVID-19 -, и в контрольной группе, % / мм<sup>2</sup>

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

В червеобразных отростках детей III группы (интактные), выявили лишь единичные иммунные клетки, а количество экспрессирующих провоспалительные цитокины, такие как – IL-1 и IL-6 и противовоспалительных – IL-4 и IL-10 интерлейкинов не превышала 10 %. Обнаруженные показатели можно отнести к физиологической норме, учитывая сохраняющийся баланс во группах независимо от возраста (Таблица 3.8).

### Интерлейкин-1

Экспрессию IL-1 наблюдали в иммунных клетках и в цитоплазме единичных энтероцитов, преимущественно мононуклеарных и полиморфноядерных, в слизистой оболочке червеобразного отростка во всех группах наблюдения. В то же

время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами, особенно с контрольной.

В группе детей-пациентов с COVID-19 уровень экспрессии IL-1 резко возрастал независимо от возраста, превышая контрольные показатели в 6,1 раза аналогичного возраста. При сравнении экспрессии IL-1 II группы и III группы обнаружили увеличение в 2,5 раза в зависимости от морфологической формы острого аппендицита: при гангренозном и перфоративном – она была значительно выше (Таблица 3.8, Рисунок 3.14).

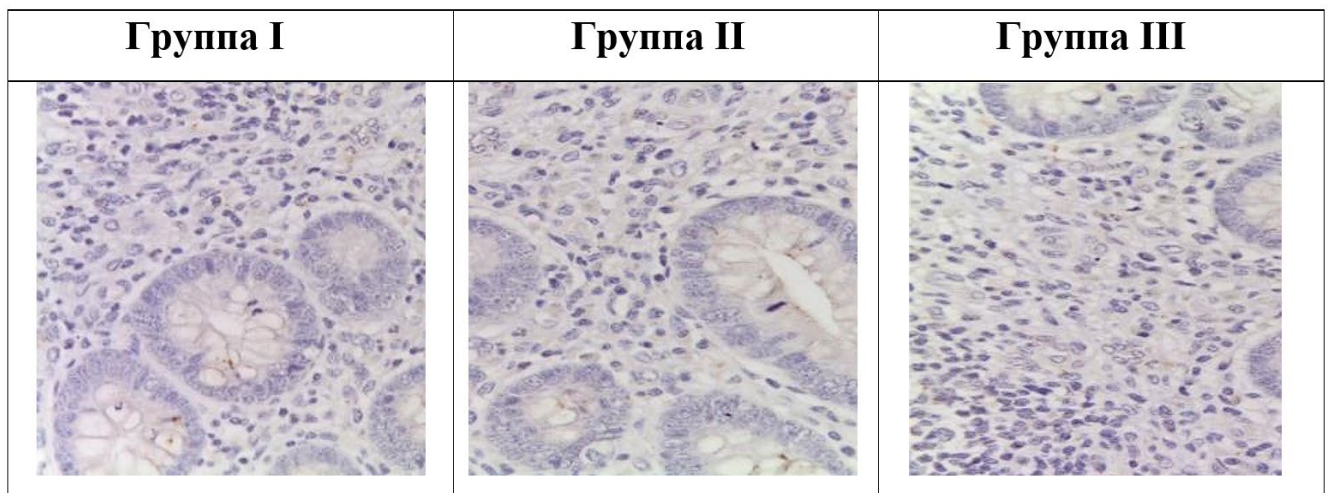


Рисунок 3.14 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к IL-1, докрасивание – гематоксилином, увелич. ×400

### **Интерлейкин-6**

При иммуногистохимическом исследовании для анализа степени воспалительной реакции оценивали экспрессию провоспалительного цитокина IL-6. Во всех группах отмечали экспрессию IL-6 в иммунных клетках слизистой оболочки червеобразного отростка, преимущественно в мононуклеарных и полиморфноядерных клетках, а также в цитоплазме единичных эпителиальных клеток. В то же время при новой коронавирусной инфекции субпопуляция иммунных клеток была увеличена по сравнению с другими группами, особенно с III-ей (интактные червеобразные отростки). Количество IL-6 позитивных клеток

резко возрастало у детей-пациентов с COVID-19 независимо от возраста, превышая в 7,7 раза контрольные значения аналогичного возраста. При сравнении экспрессии IL-6 между II и III группами обнаружили увеличение в 4,1 раза в зависимости от морфологической формы острого аппендицита: при гангренозном и перфоративном она была значительно выше (Таблица 3.8, Рисунок 3.15).

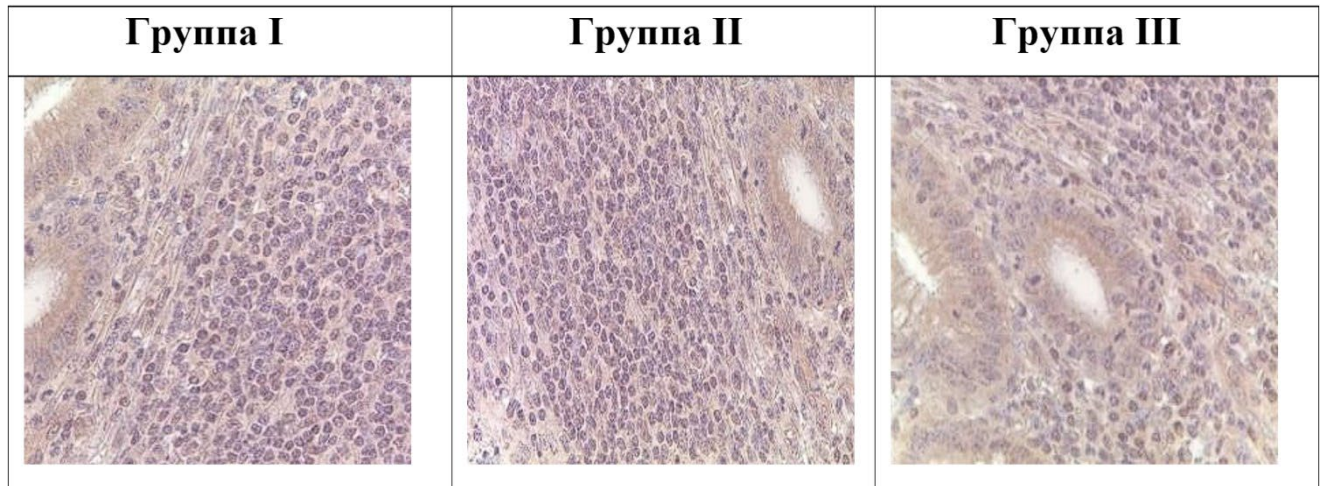


Рисунок 3.15 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к IL-6, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

#### Интерлейкин-4

Для анализа воспалительной реакции при иммуногистохимическом исследовании оценивали экспрессию противовоспалительного цитокина IL-4. Во всех группах отмечали экспрессию IL-4 в иммунных клетках слизистой оболочки червеобразного отростка, преимущественно в мононуклеарных и полиморфноядерных клетках, а также в цитоплазме единичных эпителиальных клеток. В то же время при новой коронавирусной инфекции доля иммунных клеток этой субпопуляции была увеличена по сравнению с другими группами, особенно с пациентами III-ей группой. Количество IL-4 позитивных клеток резко возрастало у детей-пациентов с COVID-19 независимо от возраста, превышая в 3,8 раза контрольные значения аналогичного возраста. При сравнении экспрессии IL-4

между II и III группами обнаружили увеличение в 2,7 раза в зависимости от морфологической формы острого аппендицита: при гангренозном и перфоративном – она была значительно выше (Таблица 3.8, Рисунок 3.16).

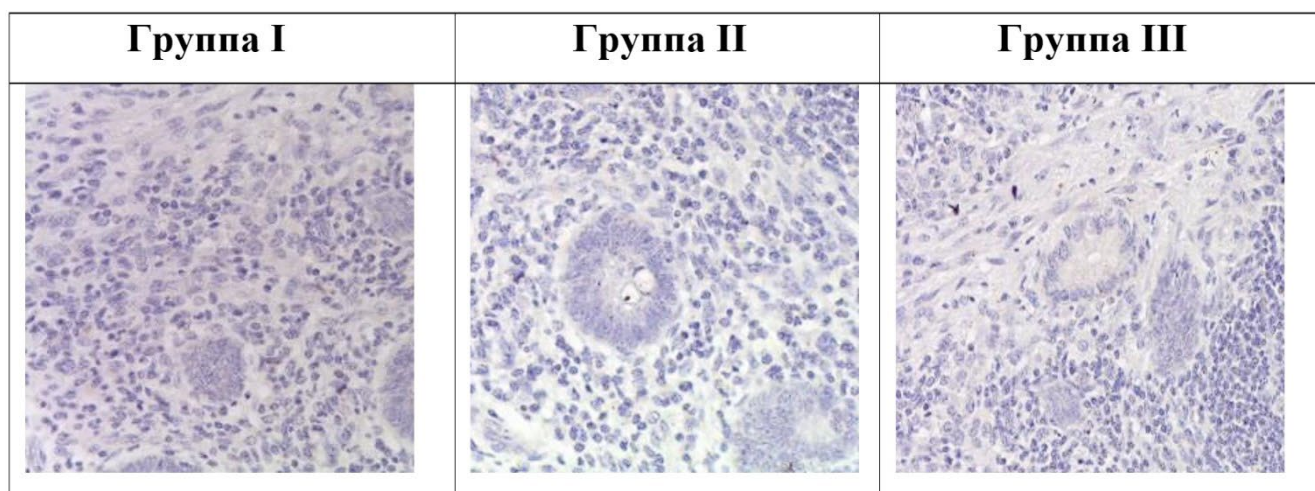


Рисунок 3.16 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к IL-4, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

### Интерлейкин-10

При иммуногистохимическом исследовании для анализа степени воспалительной реакции также оценивали экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10. Во всех группах отмечали экспрессию IL-10 в иммунных клетках (мононуклеарных и полиморфноядерных клетках) червеобразного отростка, а также в герменативных центрах лимфоидных фолликулов слизистой и подслизистой оболочки, а также в цитоплазме единичных энтероцитов кишечных крипт. В то же время при новой коронавирусной инфекции иммунные клетки этой субпопуляции были выше по сравнению с другими группами, особенно с интактными червеобразными отростками. Количество IL-10 позитивных клеток резко возросло у детей-пациентов с COVID-19 независимо от возраста, превышая в 3,5 раза контрольные значения аналогичного возраста. При сравнении экспрессии IL-10 между II и III группами обнаружили увеличение в 2,3 раза в зависимости от

морфологической формы острого аппендицита: при гангренозном и перфоративном – она была значительно выше (Таблица 3.8, Рисунок 3.17).

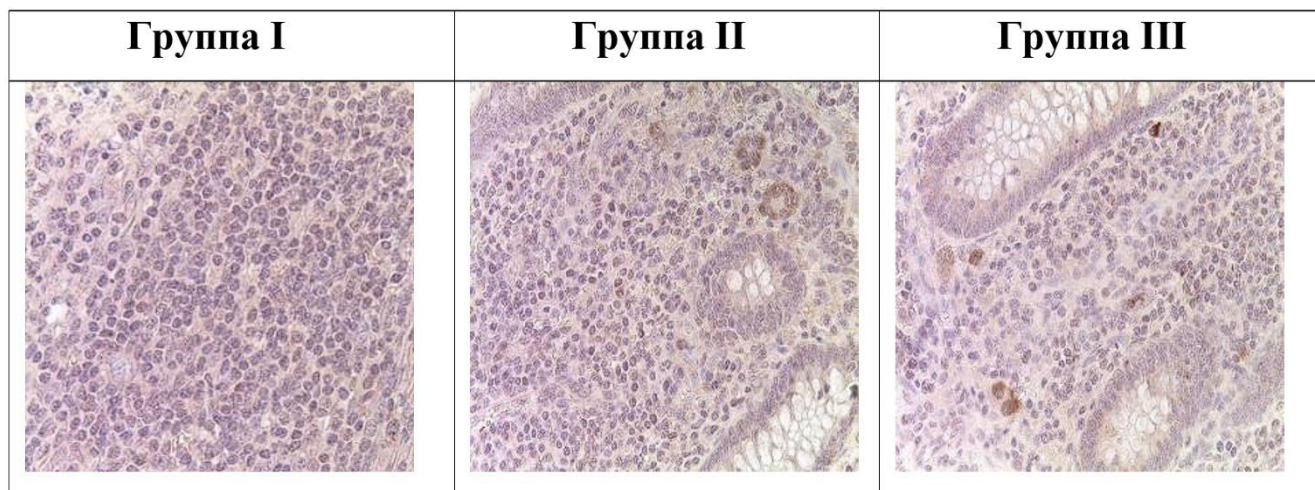


Рисунок 3.17 – Червеобразные отростки у детей исследуемых групп. Иммуногистохимические реакции с антителами к IL-10, докрасивание – гематоксилином, увелич.  $\times 400$

На основании проведенного иммуногистохимического исследования роли провоспалительных – IL-1 и IL-6, и противовоспалительных – IL-4, IL-10, у детей-пациентов с COVID-19 в червеобразном отростке выявлено превалирование воспалительных реакций, что связано с их активацией на фоне SARS-CoV-2 инвазии.

### 3.4. Полимеразная цепная реакция

Во всех изучаемых образцах I группы (n=42) в тканях червеобразного отростка при ПЦР-РВ обнаружен *SARS CoV-2*.

При ПЦР-РВ анализе экспрессии *АПФ-2* и *Фурин* в тканях червеобразного отростка детей показали приблизительно схожие паттерны экспрессии, нормализованные по *GAPDH* (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Результаты ПЦР-РВ на *АПФ-2* 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

В ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19 отмечали увеличение экспрессии *АПФ-2* по сравнению с контрольной группой почти в 1,5 раза – 8,62±0,85 против 5,6±0,42,  $p<0.01$ , соответственно. Корреляционной связи с возрастом не было обнаружено (Таблица 3.12).

Экспрессия *Фурина* в червеобразном отростке у детей с COVID-19 была незначительно выше по сравнению с контрольной группой – 38,28±1,42 против 36,1±1,18,  $p<0.01$ , соответственно, степень ее не демонстрировала зависимость от возраста (Таблица 3.13).

Таблица 3.12 – Распределение экспрессии *АПФ-2* при ПЦР-РВ по возрастам (усл. ед.,  $p<0.01$ )

возраст	подгруппа	АПФ-2
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 3.13 – 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

## ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании описаны морфологические особенности и характеристики локального иммунного ответа при остром аппендиците у детей разных возрастных групп с наличием инфекции SARS-CoV-2 и без нее с применением рутинного гистологического, иммуногистохимического исследования, полимеразной цепной реакции и гибридизации *in situ*.

С помощью ПЦР-РВ SARS-CoV-2 был обнаружен во всех изученных образцах тканей червеобразных отростков I группы, что свидетельствует о тропизме вируса и возможной уязвимости иммунной системы ребенка. Можно предположить, что SARS-CoV-2 оказывает прямое повреждающее воздействие на орган, проникая в эпителиальные клетки с помощью АПФ-2 и фурина, что подтверждается высокими значениями экспрессии данных ферментов [65, 172].

Анализируя характер экспрессии фурина в гомогенате червеобразного отростка, который расщепляет последовательность S-белка, мы отметили незначительное увеличение этой протеазы в образцах I группы, что является предрасполагающим фактором для проникновения SARS-CoV-2 в клетку [193]. Принимая во внимание данные РНК-секвенирования и иммуногистохимических реакций из публичных карт The Human Protein Atlas, согласно которым в норме АПФ-2 и фурин на 55–70% экспрессируются в лимфоцитах, эпителиальных клетках, фибробластах, гладких миоцитах и эндотелиоцитах червеобразного отростка, можно утверждать, что они являются клетками-мишенями для SARS-CoV-2, что также подтверждается выявленными деструктивными изменениями в стенке органа.

При микроскопическом анализе стенки червеобразных отростков I и II групп были выявлены различия характера воспалительной реакции, что частично совпадает с результатами аналогичных исследований. Общие проявления вирусного воспаления в образцах I группы, в отличие от образцов II группы, включают гиперплазию элементов лимфоидного аппарата, увеличение количества

плазматических клеток и уменьшение количества полиморфноядерных лейкоцитов. Также следует учитывать, что дистрофические изменения эпителиальных клеток и некроз под влиянием SARS-CoV-2 все еще может служить хемотаксическим стимулом для миграции сегментоядерных лейкоцитов и макрофагов. Кроме того, в I группе мы выявили специфические признаки, указывающие на SARS-CoV-2 как один из этиологических факторов развития аппендицита, среди которых формирование микротромбов, фибриноидный некроз сосудистой стенки и периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация. Весьма вероятно, что специфическое вирусное повреждение начинается с репликации вируса преимущественно в клетках эпителия. В результате, SARS-CoV-2 получает доступ к генетическому и синтетическому аппарату клетки.

ISH является одной из наиболее точных методик для определения вирусной РНК в тканях. На сегодняшний день этот способ был успешно использован для изучения SARS-CoV-2 в тканях легкого человека, что значительно расширило представление о субклеточной локализации и клеточном тропизме вируса [179, 187]. Однако, несмотря на активное внедрение этого метода в практику, в нашем исследовании флуоресцентная гибридизация *in situ* впервые применяется для определения РНК SARS-CoV-2 в ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19.

Во всех образцах, полученных от пациентов без COVID-19 (II и III группа), при конфокальной микроскопии мы не выявили флуоресцентного сигнала, что говорит об успешной адаптации ISH-метода в настоящем исследовании и исключает наличие ложноположительных результатов.

По данным специализированной литературы известно об уязвимости органов желудочно-кишечного тракта у взрослых пациентов, перенесших COVID-19 [19, 23]. В этих исследованиях авторы отмечали, что SARS-CoV-2 обладает выраженным тропизмом прежде всего к слизистой оболочке кишечника. Данные выводы были сделаны на основании обнаружения вирусной РНК в энтероцитах толстой и тонкой кишки [94, 163, 170], что совпадает с полученными нами результатами. Так, по нашим данным, эпителиоциты червеобразного отростка, где

обнаружили наибольшее количество клеток с позитивным сигналом вирусной РНК, являются клетками-мишенями SARS-CoV-2.

Возможно, развитие острого аппендицита начинается с локального воспаления в месте вирусной инвазии, что сопровождается повышением уровней провоспалительных цитокинов в тканях кишки после инфицирования SARS-CoV-2 [182]. Такие данные в очередной раз свидетельствуют о возможном влиянии вирусной инвазии на развитие острого аппендицита.

При этом различий в количестве инфицированных клеток в червеобразном отростке при сравнении возрастных групп не было выявлено. В ранних работах предполагалось, что с возрастом происходит усиление экспрессии *АПФ-2* и *TMPRSS2*, что делает взрослое население более уязвимым для влияния SARS-CoV-2, однако на сегодняшний день известно, что в кишечнике экспрессия *АПФ-2* выше у детей, а экспрессия *TMPRSS2* не имеет значительных различий при сравнении детей и взрослых [33].

Также следует учитывать, что у нашего исследования есть некоторые ограничения для изучения уровня вирусной нагрузки. Во-первых, в представленной нами работе исследование проведено на небольшой выборке пациентов. Во-вторых, на сегодняшний день в литературе до сих пор четко не описаны уровни экспрессии генов *АПФ-2* в органах желудочно-кишечного тракта, хотя существуют данные о значительной гетерогенности в экспрессии *АПФ-2* в легочной ткани [108, 155].

Иммуногистохимическое исследование червеобразных отростков у детей с подтвержденным COVID-19 выявило преобладание клеток CD3+, CD4+, CD20+, CD138+ и CD68+ по сравнению с острым аппендицитом без инфекции COVID-19 и контрольной группой.

Увеличенное количество CD3-положительных клеток в слизистой оболочке и брыжейке червеобразного отростка в I и II группах свидетельствует об активации иммунного ответа. Наличие периваскулярного лимфоцитарного воспаления подтверждается увеличением количества Т-клеток памяти (CD4+), специфичных к вирусным антигенам SARS-CoV-2. Кроме того, подтверждением является

хемокин- и цитокин-индуцированная миграция Т-лимфоцитов из крови в ткани [173]. В литературе описан клинический случай, в котором исследователи обратили внимание на высокую корреляцию между соотношением уровней CD3+ и CD4+ иммунных клеток в ответ на инфекцию COVID-19. Таким образом, значительное увеличение CD3+ и CD4+ Т-клеток не исключает наличия мультисистемного воспалительного синдрома или какой-либо его формы у детей с COVID-19 в разных возрастных группах.

Активация макрофагов в тканях приводит к избыточному воспалительному ответу, вызванному чрезмерной пролиферацией Т-лимфоцитов [68]. Увеличение количества CD68-положительных клеток (макрофагов) в обеих группах с острым аппендицитом вероятно указывает на попытку иммунной системы элиминировать инфекционный агент, либо же оно является отражением патологической дисрегуляции иммунного ответа.

При контакте с антигеном, CD4+ Т-клетки вырабатывают цитокины, которые впоследствии активируют В-лимфоциты (CD20+). В образцах I группы можно наблюдать увеличение CD20-положительных клеток, что свидетельствует о развитии гуморального иммунитета в месте репликации вирусного генетического материала.

В литературе CD138 описывается как маркер плазматических клеток [159], и его увеличение в слизистой оболочке червеобразного отростка у детей с COVID-19 указывает на повышенную выработку антител против новой коронавирусной инфекции. Увеличение количества CD138- и CD20-позитивных клеток позволяет предположить, что у детей с диагнозом COVID-19 в червеобразном отростке и периаппендикулярной ткани развивается противовирусный иммунный ответ. Кроме того, косвенным подтверждением нашей теории является тот факт, что во II группе количество CD20- и CD138-положительных клеток остается ниже, чем в I группе.

При остром аппендиците одним из ведущих факторов развития воспаления является бактериальная кишечная микрофлора, которая активируется в ответ на

обструкцию просвета червеобразного отростка гиперплазированной лимфоидной тканью, инициируя клеточный иммунный ответ.

Одной из задач проведенного исследования была молекулярно-биологическая оценка уровней провоспалительных (IL-1, IL-6) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) в червеобразных отростках детей с COVID-19, учитывая немногочисленные данные об этом в мировой литературе. Известно, что IL-1 и IL-6 являются ключевыми цитокинами врожденного иммунитета, и они индуцируют развитие «цитокинового шторма», тем самым усиливая миграцию иммунных клеток в очаг воспаления. В метаанализе Suján K. Dhar et al. не удалось достоверно подтвердить значимость повышенного уровня IL-1 в крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией [112]. Однако в нашем исследовании мы наблюдали увеличение уровня IL-1 в 1,3 раза в червеобразных отростках детей с подтвержденным COVID-19 по сравнению с острым аппендицитом и в 3,5 раза выше по сравнению со здоровыми червеобразными отростками в непандемические периоды. Grifoni E. и другие показали, что IL-6 обнаруживается в высоких концентрациях в крови пациентов с COVID-19 [120]. Мы также наблюдали увеличение уровня IL-6 в червеобразных отростках детей с COVID-19, высокий уровень которого может подавлять вирусную литическую активность [117].

В нашем исследовании особое внимание уделялось концентрации противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) в червеобразных отростках детей с COVID-19. В предыдущих исследованиях было описано, что увеличение уровня в крови IL-10, ограничивающего воспалительный процесс, указывает на пик «цитокинового шторма» [111]. Аналогично, мы наблюдали увеличение количества IL-10-позитивных клеток в червеобразных отростках детей с подтвержденным COVID-19 по сравнению с острым аппендицитом и здоровыми червеобразными отростками в непандемические периоды.

Известно, что IL-4 ингибирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 и IL-6. В одном исследовании, было показано, что у взрослых пациентов с COVID-19 значительно увеличивается уровень IL-4 в крови и легких

[111]. Аналогичная картина была обнаружена нами и в червеобразных отростках детей с COVID-19 по сравнению с острым аппендицитом и здоровым органом в непандемические периоды. Согласно литературным данным, соотношение IL-6/IL-10 является прогностическим показателем тяжести течения коронавирусной инфекции [112, 161].

Таким образом, при остром аппендиците у детей с COVID-19 наблюдается увеличение провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6, а также противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10. При этом наблюдается повышение соотношения IL-6/IL-10, что, вероятно, указывает на тяжелое течение инфекции.

### **Резюме**

Подытоживая вышесказанное, патоморфологические нарушения в червеобразных отростках у детей-пациентов с новой коронавирусной инфекцией указывают на потенциальное влияние SARS-CoV-2 на структуры червеобразного отростка, с развитием морфологических особенностей острого аппендицита (COVID-19-ассоциированный аппендицит) и изменениями ключевых морфометрических показателей.

Иммуногистохимическая характеристика червеобразных отростков у детей-пациентов с COVID-19, согласно ИИH-анализу и ПЦР в режиме реального времени (в том числе повышение АПФ2 и фурина), свидетельствует об инвазии SARS-CoV-2 в структуры органа.

У детей-пациентов с новой коронавирусной инфекцией выявлено увеличение CD-субпопуляций иммунных клеток (CD138+, CD20+, CD68+, CD3+, CD4+) и дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-4, IL-10).

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

SARS-CoV-2 обладает тропизмом практически ко всем тканям и органам экспрессирующим рецептор АПФ-2. 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 [42].

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-1бета, 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.

Таким образом, замыкается порочный круг, при котором инфицированные клетки секретировать провоспалительные цитокины, привлекающие иммунные клетки, которые дополнительно секретировать 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.

И в данном патогенетическом механизме желудочно-кишечный тракт не является исключением. Более того, согласно данным литературы, именно в подвздошной, толстой и прямой кишках находится наибольшее количество АПФ2-экспрессирующих клеток [78]. Такая активная экспрессия АПФ-2 в органах желудочно-кишечного тракта связана с тем, что ангиотензин-превращающий фермент, в первую очередь, является протеазой и необходим для адекватного пищеварения. Например, он обеспечивает протеолиз белков, а также является шапероном для натрий-зависимого транспортера аминокислот B0AT1, участвующего в трансмембранном транспорте нейтральных аминокислот – в особенности триптофана. Кроме того, в том числе за счет регуляции всасывания триптофана АПФ-2 участвует в гомеостазе микробиоты кишечника. Проявляется это и в том, что при инфекции SARS-CoV-2 нарушается баланс микробиоты кишечника, так, например, увеличивается популяция грибков *Candida*. Кроме того, возрастает уровень токсичных бактериальных метаболитов, таких как салсолинол и фенилацетилглутамин, что негативно сказывается на всем организме. То, что SARS-CoV-2 активно реплицируется в органах желудочно-кишечного тракта подтверждается и тем, что более чем у половины пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, РНК SARS-CoV-2 в кале сохраняется вплоть до 5 недель после исчезновения РНК из биоматериала дыхательных путей.

Единственным не решенным окончательно вопросом остается путь, по которому вирионы SARS-CoV-2 достигают желудочно-кишечного тракта. Предполагается, что существует прямой путь – вместе с инфицированным секретом дыхательных путей, и кровеносный – при поражении легких нарушается целостность аэрогематического барьера, за счет чего вирус активно проникает в кровотоки, по которому и достигает желудочно-кишечного тракта.

В подобной патогенетической модели червеобразный отросток представляется крайне чувствительным органом-мишенью, так как большая часть энтероцитов червеобразного отростка уязвима к инвазии SARS-CoV-2, а будучи органом периферической иммунной системы, он способен формировать крайне выраженный локальный иммунный ответ. Более того, анатомические особенности его строения также потенциально способствуют развитию острого аппендицита.

Червеобразный отросток является слепо оканчивающимся отростком, в норме являющимся в том числе резервуаром для нормальной микробиоты, а потому негативное воздействие SARS-CoV-2 и пролиферация условно-патогенной микрофлоры могут выступать в роли потенциального патогенетического механизма [134, 169].

Следует учитывать и то, что кровоснабжение червеобразного отростка осуществляется аппендикулярной артерией и аппендикулярной веной, что обуславливает крайнюю уязвимость данного органа к тромботическим и тромбофлебитическим явлениям, крайне характерным для инфекции SARS-CoV-2.

Повышение экспрессии мембранного рецептора АПФ-2 на энтероцитах слизистой оболочки червеобразного отростка обеспечивает инвазию SARS-CoV-2 с дальнейшей репликацией вируса и гибелью части клеток. Запускается каскад воспаления с повышением клеток, экспрессирующих провоспалительные и противовоспалительные цитокины, высвобождаются хемоаттрактанты и активные формы кислорода, что усугубляет ишемию органа, его отек и инфильтрацию плазматическими клетками, макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами. Происходит гиперплазия лимфоидных фолликулов, нарушение кровообращения – тромбоз кровеносных сосудов стенки червеобразного отростка. Что 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.

Описанный выше патогенез представлен в виде схемы на Рисунке 4.1.

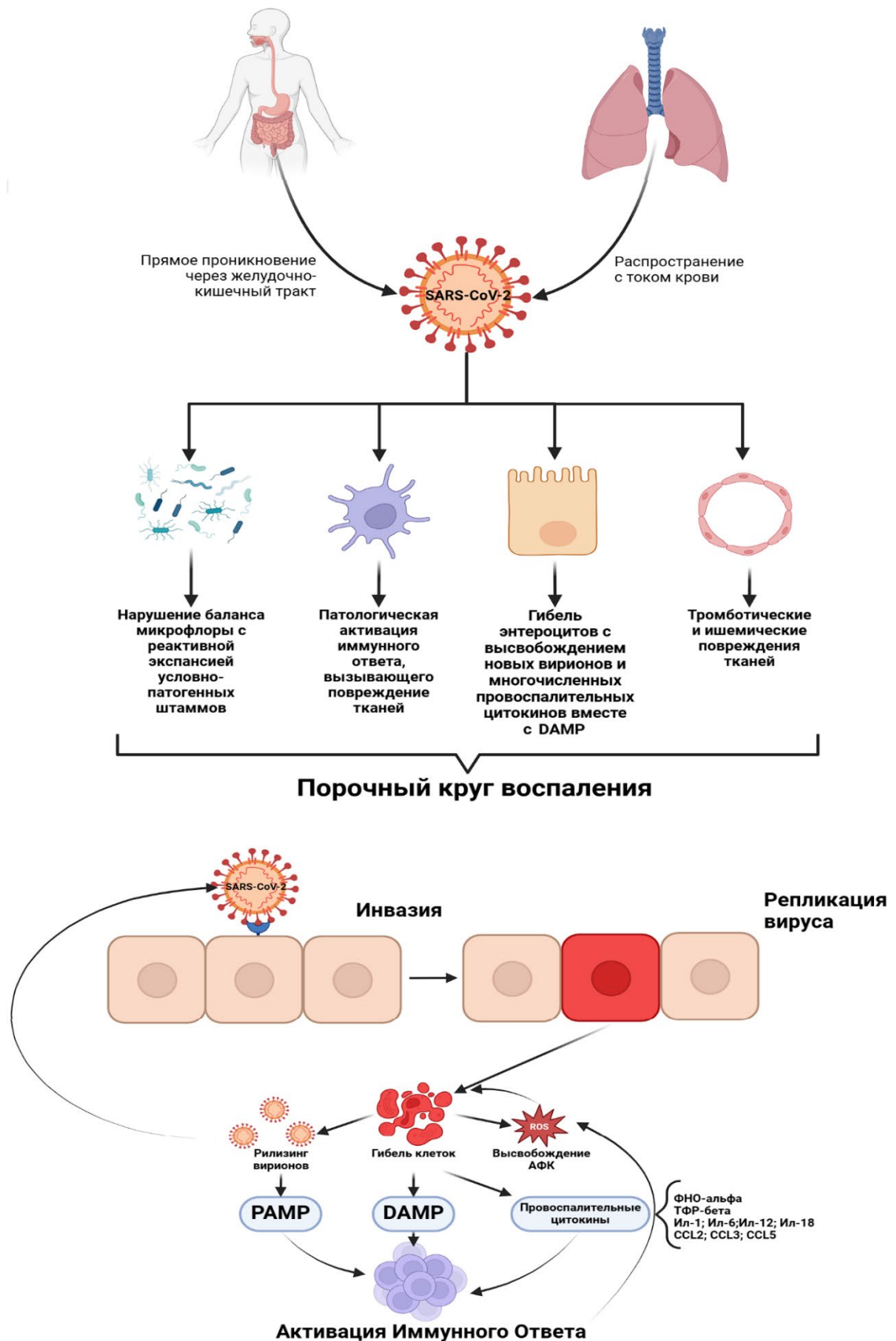


Рисунок 4.1 – Схема патогенеза поражения червеобразного отростка после инвазии SARS-CoV-2 (у детей)

## 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 внутрипросветного 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 патерн 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./мм<sup>2</sup>), особенно – CD68 (макрофаги;

36,7±2,1 кл./мм<sup>2</sup>), CD20 (В-лимфоциты; 36,7±2,1 кл./мм<sup>2</sup>), CD138 (плазмоциты; 19,6±0,4 кл./мм<sup>2</sup>), а доля CD4 (Т-хелперы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки; 11,2±0,2 кл./мм<sup>2</sup>) была меньше. Это указывает на активацию как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета. Также количество CD68-положительных 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-положительных клеток наблюдаются преимущественно при гангренозной форме аппендицита. При этом, доля IL-4- и IL-10- положительных 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВК – вирус кори

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГФС – гемофагоцитарный синдром

ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ДК – дендритные клетки

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ – иммуногистохимия

ИРФ – интерферон-регулирующий фактор

ИФН – интерферон

ИЭЛ – интраэпителиальные лимфоциты

КТ – компьютерная томография

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ОА – острый аппендицит

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ПРР – паттерн-распознающие рецепторы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

РСВЧ – респираторно-синцитиальный вирус человека

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ФНО-  $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )

CCL – хемокиновый лиганд

CD – кластер дифференцировки

DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

FISH – флюоресцентная гибридизация *in situ*

ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии-1

ICTV – международный комитет по таксономии вирусов

Ig – иммуноглобулин

IL (ИЛ) – интерлейкин

MCP-1 – моноцитарного хемоаттрактантный протеин-1

MERS – ближневосточный респираторный синдром

MIP-1A – макрофагальный воспалительный протеин-1A

MIS-C – синдром мультисистемного воспаления у детей и подростков

NF-κB – ядерный фактор каппа-B

NLR (NLRP) – Nod-подобный рецептор

NRF2 – Ядерный эритроид-2-ассоциированный фактор

ORF – открытая рамка считывания

PRR – паттерн-распознающие рецепторы

RBD – рецептор-связывающий домен (RBD)

RIG-I – ретиноевая кислота-индуцируемый ген 1

SARS – Тяжелый острый респираторный синдром

SHP-1 (PTPN6) – фосфатаза-1 содержащая домен гомологичный саркомному-2

Sp – сатурация

TCR – T-клеточный рецептор

Th (Tx) – T-хелпер

TLR - Toll-подобный рецептор

TMPRSS2 - трансмембранная сериновая протеаза 2

Treg (Трег) – T-регуляторные клетки

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Болдырев, Д. В. Патогенетические особенности структурно функционального статуса и локального иммунного механизма яичек при COVID-19): специальность 14.03.02 "Патологическая анатомия": диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Болдырев Дмитрий Владимирович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2024. – 120 с.
2. Ваганов, П. Д. Периоды детского возраста / П. Д. Ваганов, Э. Ю. Яновская, Э. Т. Манджиева // Российский медицинский журнал. – 2018. – Т. 24. – № 4. – С. 185-190.
3. Влияние SARS-CoV-2-инфекции на мужскую и женскую репродуктивную систему (метаанализ) / Г. А. Демяшкин, Е. А. Коган, А. Б. Ходжаян, Т. А. Демура, М. Г. Гевандова, В. И. Щекин, И. А. Зорин, Д. В. Болдырев // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 582-586. – DOI: 10.14300/mnnc.2020.15140.
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. – DOI: 10.17116/patol20238503123.
5. Горелов, А. В. Клиническая характеристика коронавирусной инфекции COVID-19 у детей / А. Горелов, С. Николаева, В. Акимкин ; Москва : ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2020. – 7 с. – DOI: 10.21055/preprints-3111807.
6. Демяшкин, Г. А. 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. – DOI: 10.29039/2224-6444-2023-13-1-18-22
7. Демяшкин, Г. А. Морфологический анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический

аспект) : специальность 14.03.02 «Патологическая анатомия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Демяшкин Григорий Александрович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2017. – 142 с.

8. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального  $\beta$ -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Демяшкин Григорий Александрович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2023. – 266 с.

9. Детский мультисистемный воспалительный синдром, ассоциированный с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19): клиничко-морфологические сопоставления / Д. Ю. Овсянников, Ю. Ю. Новикова, Д. С. Абрамов, А. Е. Анджель, А. А. Глазырина, М. Г. Кантемирова, А. Н. Кисляков, Е. С. Крышова, С. Х. Курбанова, Е. Е. Петряйкина, А. Ю. Ртищев, Ж. Г. Тигай, А. В. Харькин, М. П. Шалатонин // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2020. – Т. 99. – № 6. – С. 119-126. – DOI:10.24110/0031-403X-2020-99-6-119-126.

10. Ермоленко, К. Д. Поражение органов желудочно-кишечного тракта при новой коронавирусной инфекции у детей / К. Д. Ермоленко, Н. В. Гончар, Н. В. Скрипченко // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2020. – Т. 99. – № 6. – С. 135-140. – DOI:10.24110/0031-403X-2020-99-6-135-140.

11. Иммуногистохимическая характеристика интратестикулярной инвазии SARS-CoV-2 / Г. А. Демяшкин, Е. А. Коган, Т. А. Демура, Д. В. Болдырев, М. А. Вадюхин, Н. В. Жарков // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2023. – Т. 12. – №3. – С. 20–25. DOI: 10.18499/2225-7357-2023-12-3-20-25.

12. Иммунокомпетентные клетки червеобразного отростка при остром аппендиците у детей с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, К. Р. Горохов, А. А. Пилипенко, А. В. Маслов, С. Е. Кочеткова // Казанский медицинский журнал. – 2023. – Т. 104. – №4. – С. 623-629. – DOI: 10.17816/KMJ321356.

13. Кадыркулов, А. Ж. Мультисистемный воспалительный синдром, ассоциированный с COVID-19 и осложненный деструктивным аппендицитом у ребенка / А. Ж. Кадыркулов, Р. Н. Накипов, М. Н. Насыбуллин // Medicus. –2021. – № 1. – С. 32-36.

14. Клиническая характеристика новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у детей по данным детской больницы г. Караганды / Д. Г. Болатова, М. К. Кайргельдинова, М. Е. Кажыбай, А. С. Мырзакулова, С. А. Турлыбекова, М. А. Син, Д. Е. Жупенова, П. А. Омирзакова // Детские инфекции. – 2022. – Т. 21. – № 1. – С. 45-48. – DOI:10.22627/2072-8107-2022-21-1-45-48.

15. Молекулярно-генетические изменения тканей яичек пациентов с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, Д. В. Болдырев, В. И. Щекин, М. С. Жиганова // Морфологические ведомости. – 2021. – Т. 30. – № 2. – С. 573. – DOI: 10.20340/mv-mn.2022.30(2).573.

16. Молекулярно-генетические изменения ткани червеобразного отростка детей с Covid-19 / Г. А. Демяшкин, А. Ю. Цибулевский, К. Р. Горохов, П. В. Никитин, И. А. Зорин // Вестник Новгородского государственного университета. –2021. – № 1. – С. 62-66. – DOI:10.34680/2076-8052.2021.1(122).62-66.

17. Морфологическая характеристика сперматогенеза у пациентов с COVID-19 / Г. А. Демяшкин, Д. В. Болдырев, М. С. Ночной, М. А. Вадюхин, В. И. Щекин // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. –Т. 12. – № 3. – С. 20-27. – DOI: 10.29039/2224-6444-2022-12-3-20-27.

18. Нарушения функции желудочно-кишечного тракта при COVID-19 у детей / Р. В. Попова, Т. А. Руженцова, Д. А. Хавкина, П. В. Чухляев, А. А. Гарбузов, Н. А. Мешкова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 3. – С. 154-157. – DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-154-157.

19. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) и система органов пищеварения / В.Т. Ивашкин, А. А. Шептулин, О. Ю. Зольникова, А. В. Охлобыстин, Е. А. Полуэктова, А. С. Трухманов, Е. Н. Широкова, М. И. Гоник, Н. И. Трофимовская // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2020. – Т. 30. – № 3. – С. 7-13. – DOI: 10.22416/1382-4376-2020-30-3-7.

20. Патологическая анатомия инфекции, вызванной SARS-COV-2 / Е. А. Коган, Ю. С. Березовский, Д. Д. Проценко [и др.] // Судебная медицина. – 2020. – Т. 6. – № 2. – С. 8-30. – DOI: 10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30.
21. Патологическая анатомия : национальное руководство / М. А. Пальцев [и др.]; ред. М. А. Пальцев, Л. В. Кактурский, О. В. Зайратьянц ; Ассоц. мед. о-в по качеству, Рос. о-во патологоанатомов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 1259 с. – ISBN 978-5-9704-3154-2.
22. Цитокиновый шторм при COVID-19: аутопсийное наблюдение / М. В. Самсонова, М. М. Белоцерковская, А. Л. Черняев, А. Г. Талалаев, Ж. Р. Омарова, Ю.С. Лебедин // Практическая пульмонология. – 2021. – № 3. – С. 33-39. – DOI: 10.24412/2409-6636-2021-12422.
23. Чамсутдинов, Н. У. Поражение органов пищеварения у пациентов с COVID-19 / Н. У. Чамсутдинов, Д. Н. Абдулманапова // Вестник Дагестанской государственной медицинской академии. – 2020. – № 4. – С. 63-73.
24. A comprehensive review on clinical and mechanistic pathophysiological aspects of COVID-19 Malady: How far have we come? / B. Shakaib, T. Zohra, A. Ikram, M. B. Shakaib [et al.] // Virology Journal. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 120. – DOI: 10.1186/s12985-021-01578-0.
25. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang, B. Hu, L. Zhang [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 579(7798). – P. 270-273. – DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
26. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis / L. Lu, H. Zhang, D. J. Dauphars, Y. W. He // Trends in immunology. – 2021. – Vol. 42. – № 1. – P. 3–5. – DOI: 10.1016/j.it.2020.10.012.
27. Acute appendicitis: Modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management / A. Bhangu, K. Søreide, S. Di Saverio, J. H. Assarsson, F. T. Drake // The Lancet. – 2015. – Vol. 386(10000). – P. 1278–1287. – DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00275-5.

28. Adenovirus and intranuclear inclusions in appendices in intussusception / H. J. Porter, C. J. Padfield, L. C. Peres [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 1993. – Vol. 46. – № 2. – P. 154–158. – DOI: 10.1136/jcp.46.2.154.
29. AGA Institute Rapid Review of the Gastrointestinal and Liver Manifestations of COVID-19, Meta-Analysis of International Data, and Recommendations for the Consultative Management of Patients with COVID-19 / S. Sultan, O. Altayar, S. M. Siddique, P. Davitkov [et al.] // *Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 159. – № 1. – P. 320-334.e27. – DOI: 10.1053/j.gastro.2020.05.001.
30. Age-associated differences in immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 subclass antibodies to pneumococcal polysaccharides following vaccination / K. R. Lottenbach, C. M. Mink, S. J. Barenkamp, E. L. Anderson [et al.] // *Infection and immunity*. – 1999. – Vol. 67. – № 9. – P. 4935–4938. – DOI: 10.1128/IAI.67.9.4935-4938.1999.
31. Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium / B. A. Schuler, A. C. Habermann, E. J. Plosa, C. J. Taylor, C. Jetter [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2021. – Vol. 131. – № 1. – P. e140766. – DOI: 10.1172/JCI140766.
32. Age-related differences in nasopharyngeal severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) levels in patients with mild to moderate Coronavirus disease 2019 (COVID-19) / T. Heald-Sargent, W. J. Muller, X. Zheng, J. Rippe [et al.] // *JAMA Pediatrics*. – 2020. – Vol. 174. – № 9. – P. 902-903. – DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.3651.
33. Age-related differences in the expression of most relevant mediators of SARS-CoV-2 infection in human respiratory and gastrointestinal tract / R. Berni Canani, M. Comegna, L. Paparo, G. Cerneria, C. Bruno, C. Strisciuglio [et al.] // *Frontiers in pediatrics*. – 2021. – Vol. 9. – P. 697390. – DOI:10.3389/fped.2021.697390.
34. Aggravating mechanisms from COVID-19 / J. H. Lee, C. Sergi, R. E. Kast, B. A. Kanwar, J. Bourbeau [et al.] // *Virology Journal*. – 2024. – Vol. 21. – № 1. – P. 228. – DOI: 10.1186/s12985-024-02506-8.
35. Alder, A. C. Association of Viral Infection and Appendicitis / A. C. Alder // *Archives of Surgery*. – 2010. – Vol. 145. – № 1. – C. 63. – DOI:10.1001/archsurg.2009.250.

36. Amanat, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report / F. Amanat, F. Krammer // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – № 4. – P. 583-589. – DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
37. An observational study of innate immune responses in patients with acute appendicitis / T. Peeters, S. Martens, V. D’Onofrio, M. H. T. Stappers [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. № 1. – P. 17352. – DOI: 10.1038/s41598-020-73798-3.
38. Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Furin Expression in the Appendix of Children with COVID-19 / G. Demyashkin, K. Gorokhov, I. Zorin, V. Shchekin, P. Shegay, A. Kaprin // *Surgical Infections*. – 2022. – Vol. 23. – № 5. – P. 470-474. – DOI: 10.1089/sur.2021.311.
39. Appendicitis in Children in a Large Italian COVID-19 Pandemic Area / E. La Pergola, A. Sgrò, F. Rebosio, D. Vavassori, G. Fava, D. Codrich [et al.] // *Front Pediatr*. – 2020. – Vol. 8. – P. 600320. – DOI: 10.3389/fped.2020.600320.
40. Association of age with SARS-CoV-2 antibody response / H. S. Yang, V. Costa, S. E. Racine-Brzostek, K. P. Acker, J. Yee [et al.] // *JAMA Network Open*. – 2021. – Vol. 4. – № 3. – P. e214302. – DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.4302.
41. Asymptomatic or mild symptomatic SARS-CoV-2 infection elicits durable neutralizing antibody responses in children and adolescents / C. Garrido, J. H. Hurst, C. G. Lorang, J. N. Aquino, J. Rodriguez, T. S. Pfeiffer [et al.] // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6. – № 17. – P. e150909. – DOI: 10.1172/jci.insight.150909
42. Berdowska, I. Cathepsin L, transmembrane peptidase/serine subfamily member 2/4, and other host proteases in COVID-19 pathogenesis – with impact on gastrointestinal tract / I. Berdowska, M. Matusiewicz // *World Journal of Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 27. – № 39. – P. 6590–6600. – DOI: 10.3748/wjg.v27.i39.6590.
43. Beyerstedt, S. COVID-19: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection / S. Beyerstedt, E. B. Casaro, É. B. Rangel // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 40. – № 5. – P. 905-919. – DOI: 10.1007/s10096-020-04138-6.
44. Borczuk, A. C. The pathogenesis of coronavirus-19 disease / A. C. Borczuk, R. K. Yantiss // *Journal of Biomedical Science*. – 2022. – Vol. 29. – № 1. – P. 87. – DOI: 10.1186/s12929-022-00872-5.

45. Brennan, G. D. Pediatric appendicitis: pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging / G. D. Brennan // *CJEM*. – 2006. – Vol. 8. – № 6. – P. 425-432. – DOI: 10.1017/s1481803500014238.
46. Cardiac injury in children with COVID-19 / J. M. Herber, S. S. Bhumbra, M. W. Johansen, J. E. Slaven [et al.] // *Cardiology in the young*. – 2024. – Vol. 34. – № 1. – P. 62-66. – DOI: 10.1017/S1047951123000768.
47. Case report: Histological findings of peri-appendicitis in three children with SARS-CoV-2 - related multisystem inflammatory syndrome: A mark for systemic inflammation? / M. Fabi, F. Vasuri, F. Guida, A. Rocca, M. Lima, A. D'Errico, M. Lanari // *Front Pediatr*. – 2022. – Vol. 10. – P. 975940. – DOI: 10.3389/fped.2022.975940.
48. Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects / J. Zheng, Y. Deng, Z. Zhao, B. Mao [et al.] // *Cellular & molecular immunology*. – 2022. – Vol. 19. – № 2. – P. 150-157. – DOI: 10.1038/s41423-021-00774-w.
49. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV / X. Ou, Y. Liu, X. Lei, P. Li, D. Mi, L. Ren [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1620. – DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9
50. Chou, J. Immunology of SARS-CoV-2 infection in children / J. Chou, P. G. Thomas, A. G. Randolph // *Nature immunology*. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 177-185. – DOI: 10.1038/s41590-021-01123-9.
51. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: Retrospective study / T. Chen, D. Wu, H. Chen, W. Yan, D. Yang, G. Chen [et al.] // *BMJ*. – 2020. – Vol. 368. – m1091. – DOI: 10.1136/bmj.m1091.
52. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-Infected pneumonia in Wuhan, China / D. Wang, B. Hu, C. Hu, F. Zhu [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 11. – P. 1061. – DOI: 10.1001/jama.2020.1585.
53. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in patients out of Wuhan from China: A case control study / H. Zhang, F. Du, X. Cao, X. Feng, H. Zhang

[et al.] // BMC Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 207. – DOI: 10.1186/s12879-021-05897-z.

54. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China / W. Guan, Z. Ni, Y. Hu, W. Liang, C. Ou [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 382. – № 18. – P. 1708-1720. – DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.

55. Clinical characteristics of pediatric cases of COVID-19 in Hunan, China: A retrospective, Multi-Center Case series / L. Wu, X.-F. Zhang, Y. Yang, X.-Y. Yi, X.-P. Jiang [et al.] // Frontiers in Pediatrics. – 2021. – Vol. 9. – P. 665377. – DOI: 10.3389/fped.2021.665377.

56. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du, G. Fan, Y. Liu [et al.] // The Lancet. – 2020. – Vol. 395(10229). – P. 1054-1062. – DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

57. Clinical features and outcomes of COVID-19 in older adults: A systematic review and meta-analysis / S. Singhal, P. Kumar, S. Singh, S. Saha [et al.] // BMC Geriatrics. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 321. – DOI: 10.1186/s12877-021-02261-3.

58. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao [et al.] // The Lancet. – 2020. – Vol. 395 (10223). – P. 497–506. – DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

59. Clinical outcomes among patients with 1-year survival following intensive care unit treatment for COVID-19 / H. Heesakkers, J. G. van der Hoeven, S. Corsten, I. Janssen, E. Ewalds, K. S. Simons [et al.] // JAMA. – 2022. – Vol. 327. – № 6. – C. 559-565. – DOI: 10.1001/jama.2022.0040.

60. Comparison of the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in K18-hACE2 mouse and Syrian golden hamster models / H. Jeong, Y. Woo Lee, I. H. Park, H. Noh, S.-H. Kim [et al.] // Disease Models & Mechanisms. – 2022. – Vol. 15. – № 11. – dmm049632. – DOI: 10.1242/dmm.049632.

61. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: An international study / I. Meyts, G. Buccioli, I. Quinti, B. Neven [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2021. – Vol. 147. – №2. – P. 520-531. – DOI: 10.1016/j.jaci.2020.09.010.

62. COVID-19 and diarrhea: Putative mechanisms and management / R. T. Juthi, S. A. Sazed, M. Sarmin, R. Haque [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 126. – P. 125-131. – DOI: 10.1016/j.ijid.2022.11.018.
63. COVID-19 and gut immunomodulation / K. Roy, S. Agarwal, R. Banerjee [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 27. – № 46. – P. 7925-7942. – DOI: 10.3748/wjg.v27.i46.7925.
64. COVID-19 and gut injury / S. Shen, M. Gong, G. Wang, K. Dua [et al.] // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – № 20. – P. 4409. – DOI: 10.3390/nu14204409.
65. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms / T. Mokhtari, F. Hassani, N. Ghaffari, B. Ebrahimi [et al.] // *J Mol Histol*. – 2020. – Vol. 51. – P. 613-628. – DOI: 10.1007/s10735-020-09915-3.
66. COVID-19-associated acute appendicitis in adults. A report of five cases and a review of the literature / V. Georgakopoulou, A. Gkoufa, C. Damaskos, P. Papalexis, A. Pierrakou, S. Makrodimitri [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2022. – Vol. 24. – № 1. – P. 482. – DOI: 10.3892/etm.2022.11409.
67. COVID-19-associated diarrhea / K. Megyeri, Á. Dernovics, Z. I. I. Al-Luhaibi, A. Rosztóczy // *World Journal of Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 27. – № 23. – P. 3208-3222. – DOI: 10.3748/wjg.v27.i23.3208.
68. COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) presenting as appendicitis with shock / J. E. Anderson, J. A. Campbell, L. Durowoju, S. L. M. Greenberg, S. E. Rice-Townsend, K. W. Gow, J. Avansino // *Journal of pediatric surgery case reports*. – 2021. – Vol. 71. – P. 101913. – DOI: 10.1016/j.epsc.2021.101913.
69. COVID-19 in Patients with Primary Immunodeficiency / S. Esenboga, M. Ocak, A. Akarsu, H. N. Bildik, D. Cagdas, A. T. Iskit, I. Tezcan // *Journal of Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 41. – № 7. – P. 1515-1522. – DOI: 10.1007/s10875-021-01065-9.
70. COVID-19 influenced gut dysbiosis, post-acute sequelae, immune regulation, and therapeutic regimens / S. T. Raj, A. W. Bruce, M. Anbalagan, H. Srinivasan [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2024. – Vol. 14. – P. 1384939. – DOI: 10.3389/fcimb.2024.1384939.

71. COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract / M. Galanopoulos, F. Gkeros, A. Doukatas, G. Karianakis, C. Pontas [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 26. – № 31. – P. 4579-4588. – DOI: 10.3748/wjg.v26.i31.4579.
72. COVID-19: specific and non-specific clinical manifestations and symptoms: the current state of knowledge / J. Baj, H. Karakuła-Juchnowicz, G. Teresiński, G. Buszewicz, M. Ciesielka, R. Sitarz, A. Forma, K. Karakuła, W. Flieger, P. Portincasa, R. Maciejewski // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 1753. – DOI: 10.3390/jcm9061753.
73. COVID-19 symptom surveillance in immunocompromised children and young people in the UK: A prospective observational cohort study / M. Shaunak, R. Patel, C. Driessens, L. Mills [et al.] // *BMJ Open*. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. e044899. – DOI: 10.1136/bmjopen-2020-044899.
74. Critical appraisal of the mechanisms of gastrointestinal and hepatobiliary infection by COVID-19 / E. Levy, A. Stintzi, A. Cohen, Y. Desjardins [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2021. – Vol. 321. – № 2. – P. G99-G112. – DOI: 10.1152/ajpgi.00106.2021.
75. Current understanding of the impact of COVID-19 on gastrointestinal disease: Challenges and openings / T. Sahu, A. Mehta, Y. K. Ratre, A. Jaiswal, N. K. Vishvakarma [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 27. – № 6. – P. 449-469. – DOI: 10.3748/wjg.v27.i6.449.
76. Decker, M. L. Influence of age and other factors on cytokine expression profiles in Healthy Children-A systematic review / M. L. Decker, M. P. Grobusch, N. Ritz // *Frontiers in pediatrics*. – 2017. – Vol. 5. – P. 255. – DOI: 10.3389/fped.2017.00255.
77. Defining the correlates of lymphopenia and independent predictors of poor clinical outcome in adults hospitalized with COVID-19 in Australia / P. Hastak, D. Cromer, J. Malycha [et al.] // *Sci Rep*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 11102. – DOI: 10.1038/s41598-024-61729-5.

78. Dickson, I. Organoids demonstrate gut infection by SARS-CoV-2 / I. Dickson // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2020. – Vol. 17. – № 7. – P. 383-383. – DOI: 10.1038/s41575-020-0317-5.
79. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis / M. Rubér, A. Berg, C. Ekerfelt, G. Olaison, R. E. Andersson // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2005. – Vol. 143. – № 1. – P. 117-124. – DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02957.x.
80. Digestive symptoms in COVID-19 patients with mild disease severity: clinical presentation, Stool Viral RNA Testing, and outcomes / C. Han, C. Duan, S. Zhang, B. Spiegel, H. Shi [et al.] // *American Journal of Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 115. – № 6. – P. 916–923. – DOI: 10.14309/ajg.0000000000000664.
81. Digestive system is a potential route of COVID-19: An analysis of single-cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process / H. Zhang, Z. Kang, H. Gong, D. Xu, J. Wang [et al.] // *Gut*. – 2020. – Vol. 69. – № 6. – P. 1010-1018. – DOI: 10.1136/gutjnl-2020-320953.
82. Direct mechanisms of SARS-CoV-2-induced cardiomyocyte damage: An update / Y. Yang, Z. Wei, C. Xiong, H. Qian // *Virology Journal*. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 108. – DOI:10.1186/s12985-022-01833-y.
83. Distinguishing immune activation and inflammatory signatures of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) versus hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) / D. Kumar, C. A. Rostad, P. Jaggi, D. S. Villacis Nunez, C. Prince [et al.] // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2022. – Vol. 149. – № 5. – P. 1592-1606. e16. – DOI:10.1016/j.jaci.2022.02.028.
84. Downregulation of inhibitory SRC Homology 2 Domain-containing Phosphatase-1 (SHP-1) leads to recovery of T cell responses in elderly / A. Le Page, C. Fortin, H. Garneau [et al.] // *Cell Commun Signal*. – 2014. – Vol. 12. – № 2. – DOI: 10.1186/1478-811X-12-2.
85. Dysregulation of intracellular redox homeostasis by the SARS-CoV-2 ORF6 protein / M. De Angelis, G. Anichini, A. T. Palamara, L. Nencioni, G. Gori Savellini // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 239. – DOI: 10.1186/s12985-023-02208-7.

86. Early immune profiling reveals distinct inflammatory responses between children and adults few days after primary SARS-CoV-2 infection / M. D. B. Van de Garde, A. Miranda-Bedate, N. M. Nanlohy, R. H. J. Jacobi [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1359993. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1359993.
87. Epidemiological and clinical features of pediatric COVID-19 / C.-X. Guo, L. He, J.-Y. Yin, X.-G. Meng, W. Tan [et al.] // *BMC Medicine*. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 250. – DOI: 10.1186/s12916-020-01719-2.
88. Epidemiology of COVID-19 among children in China / Y. Dong, X. Mo, Y. Hu, X. Qi, F. Jiang, Z. Jiang, S. Tong // *Pediatrics*. – 2020. – Vol. 145. – № 6. – P. e20200702. – DOI: 10.1542/peds.2020-0702.
89. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. / T. C. Jones, G. Biele, B. Mühlemann, T. Veith, J. Schneider [et al.] // *Science*. – 2021. – Vol. 373(6551). – eabi5273. – DOI: 10.1126/science.abi5273.
90. Etiology of Appendicitis in Children: The Role of Bacterial and Viral Pathogens / I. Richardsen, D. S. Schöb, T. F. Ulmer, G. Steinau [et al.] // *Journal of Investigative Surgery*. – 2015. – Vol. 29. – № 2. – P. 74-79. – DOI: 10.3109/08941939.2015.1065300.
91. Evaluation of the levels of peripheral CD3+, CD4+, and CD8+ T cells and IgG and IgM antibodies in COVID-19 patients at different stages of infection / W. Aljabr, A. Al-Amari, B. Abbas, A. Karkashan, S. Alamri, M. Alnamnakani, A. Al-Qahtani // *Microbiology spectrum*. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. e0084521. – DOI: 10.1128/spectrum.00845-21.
92. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2 / F. Xiao, M. Tang, X. Zheng, Y. Liu [et al.] // *Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 158. – № 6. – P. 1831-1833.e3. – DOI: 10.1053/j.gastro.2020.02.055.
93. Factors associated with elevated SARS-CoV-2 immune response in children and adolescents / S. E. Messiah, R. Abbas, E. Bergqvist, H. W. Kohl [et al.] // *Frontiers in pediatrics*. – 2024. – Vol. 12. – P. 1393321. – DOI: 10.3389/fped.2024.1393321.
94. Factors associated with severe gastrointestinal diagnoses in children with SARS-CoV-2 infection or multisystem inflammatory syndrome / A. Lo Vecchio, S. Garazzino,

A. Smarrazzo, E. Venturini [et al.] // *JAMA Netw Open*. – 2021. – Vol. 4. – № 12. – P. e2139974. – DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.39974.

95. Features of appendix and the characteristics of appendicitis development in children with COVID-19 / G. Demyashkin, K. Gorokhov, V. Shchekin, M. Vadyukhin, A. Matevosyan, A. Rudavina, A. Pilipchuk, A. Pilipchuk, S. Kochetkova, D. Atiakshin, P. Shegay, A. Kaprin // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – № 2. – P. 312. – DOI: 10.3390/biomedicines12020312.

96. Fine needle aspiration in COVID-19 vaccine-associated lymphadenopathy / C. Hagen, M. Nowack, M. Messerli, F. Saro, F. Mangold, P. K. Bode // *Swiss medical weekly*. – 2021. – Vol. 151. – P. w20557. – DOI: 10.4414/smw.2021.20557.

97. Gastrointestinal coronavirus disease 2019: Epidemiology, clinical features, pathogenesis, prevention, and management / S. Deidda, L. Tora, D. Firinu, S. Del Giacco, M. Campagna, F. Meloni [et al.] // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. – 2021. – Vol. 15. – № 1. – P. 41-50. – DOI: 10.1080/17474124.2020.1821653.

98. Gastrointestinal disease and COVID-19: A review of current evidence / F. Chen, Z. Dai, C. Huang, H. Chen, X. Wang, X. Li // *Digestive Diseases*. – 2022. – Vol. 40. – № 4. – P. 506-514. – DOI: 10.1159/000519412.

99. Gastrointestinal implications in COVID-19 / D. S. Dahiya, A. Kichloo, M. Albosta, S. Pagad, F. Wani // *Journal of Investigative Medicine*. – 2020. – Vol. 68. – № 8. – P. 1397–1401. – DOI: 10.1136/jim-2020-001559.

100. Gastrointestinal involvement in paediatric COVID-19 — from pathogenesis to clinical management: A comprehensive review / C. Calitri, I. Fumi, M. G. Ignaccolo, E. Banino, S. Benetti, M. M. Lupica, F. Fantone, M. Pace, F. Garofalo // *World Journal of Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 27. – № 2. – P. 3303-3316. – DOI: 10.3748/wjg.v27.i23.3303

101. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2: transmission, pathogenesis, immunomodulation, microflora dysbiosis, and clinical implications / S. S. K. Durairajan, A. K. Singh, U. B. Saravanan, M. Namachivayam [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 6. – P. 1231. – DOI: 10.3390/v15061231.

102. Gastrointestinal sequelae of COVID-19: investigating post-infection complications – A systematic review / I. Mohammed, S. Podhala, F. Zamir, S. Shiyam [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 10. – P. 1516. – DOI: 10.3390/v16101516.
103. Gut microbiome and anti-viral immunity in COVID-19 / V. Rossini, V. Tolosa-Enguis, C. Frances-Cuesta, Y. Sanz // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2024. – Vol. 64. – № 14. – P. 4587-4602. – DOI: 10.1080/10408398.2022.2143476.
104. Gut microbiota in COVID-19: Key microbial changes, potential mechanisms and clinical applications / F. Zhang, R. I. Lau, Q. Liu, Q. Su, F. K. L. Chan [et al.] // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, – 2023. – Vol. 20. – № 5. – P. 323-337. – DOI: 10.1038/s41575-022-00698-4.
105. Haithem, H. A. Abdominal pain in children with COVID-19 / H. A. Haithem, H. K. Sadik, A. J. Hayder // *Khirurgiia (Mosk)*. – 2022. – Vol. 10. – P. 58-62. – DOI: 10.17116/hirurgia202210158.
106. Harnessing the immune system to overcome cytokine storm and reduce viral load in COVID-19: A review of the phases of illness and therapeutic agents / S. Khadke, N. Ahmed, N. Ahmed, R. Ratts [et al.] // *Virology Journal*. – 2020. – Vol. 17. – № 1. – P. 154. – DOI: 10.1186/s12985-020-01415-w.
107. Health security capacities in the context of COVID-19 outbreak: An analysis of International Health Regulations annual report data from 182 countries / N. Kandel, S. Chungong, A. Omaar, J. Xing // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395(10229). – P. 1047-1053. – DOI:10.1016/S0140-6736(20)30553-5.
108. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract / M. E. Ortiz, A. Thurman, A. A. Pezzulo, M. R. Leidinger [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 60. – P. 102976. – DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102976.
109. Hoste, L. Multisystem inflammatory syndrome in children related to COVID-19: a systematic review / L. Hoste, R. Van Paemel, F. Haerynck // *Eur J Pediatr*. – 2021. – Vol. 180. – № 7. – P. 2019-2034. – DOI: 10.1007/s00431-021-03993-5.

110. Humoral signatures of protective and pathological SARS-CoV-2 infection in children / Y. C. Bartsch, C. Wang, T. Zohar, S. Fischinger, C. Atyeo [et al.] // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 3. – P. 454-462. – DOI: 10.1038/s41591-021-01263-3.
111. IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury / C. B. Vaz de Paula, M. L. V. de Azevedo, S. Nagashima, A. P. C. Martins [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 18689. – DOI: 10.1038/s41598-020-75659-5.
112. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression / S. K. Dhar, K. Vishnupriyan, S. Damodar, S. Gujar, M. Das // *Heliyon*. – 2021. – Vol. 7. – № 2. – P. e06155. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06155.
113. Immune escape of SARS-CoV-2 variants to therapeutic monoclonal antibodies: A system review and meta-analysis / H. Shi, J. Sun, Y. Zeng, X. Wang [et al.] // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 266. – DOI: 10.1186/s12985-023-01977-5.
114. Immunohistochemical analysis of spermatogenesis in patients with SARS-CoV-2 invasion in different age groups / G. A. Demyashkin, E. Kogan, T. Demura, D. Boldyrev, M. Vadyukhin, V. Schekin, P. Shegay, A. Kaprin // *Current issues in molecular biology*. – 2023. – Vol. 45. – № 3. – P. 2444–2451. – DOI: 10.3390/cimb45030159.
115. Impact of SARS-CoV-2 Pandemic on Patients with Primary Immunodeficiency / S. Delavari, H. Abolhassani, F. Abolnezhadian, F. Babaha, S. Iranparast [et al.] // *Journal of Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 41. – № 2. – P. 345-355. – DOI: 10.1007/s10875-020-00928-x.
116. Incidence of Complicated Appendicitis during the COVID-19 Pandemic versus the Pre-Pandemic Period: A Systematic Review and Meta-Analysis of 2782 Pediatric Appendectomies / Z. Pogorelić, S. Anand, T. Žuvela, A. Singh, Z. Križanac, N. Krishnan // *Diagnostics (Basel)*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 127. – DOI: 10.3390/diagnostics12010127.
117. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome / L. Cifaldi, G. Prencipe, I. Caiello, C. Bracaglia // *Arthritis & rheumatology*. – 2015. – Vol. 67. – № 11. – P. 3037-3046. – DOI: 10.1002/art.39295.

118. Innate Immunity Genes Influence the Severity of Acute Appendicitis / F. A. Rivera-Chavez, D. L. Peters-Hybki, R. C. Barber, G. M. Lindberg [et al.] // *Annals of Surgery*. – 2004. – Vol. 240. – № 2. – P. 269–277. – DOI: 10.1097/01.sla.0000133184.10676.26.
119. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications / I. P. Trougakos, K. Stamatelopoulos, E. Terpos, O. E. Tsitsilonis, E. Aivalioti [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 9. – DOI: 10.1186/s12929-020-00703-5.
120. Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19 // E. Grifoni, A. Valoriani, F. Cei, R. Lamanna, A. M. G. Gelli [et al.] // *The Journal of infection*. – 2020. – Vol. 81. – № 3. – P. 452-482. – DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.008.
121. Jones, M. W. Appendicitis / M. W. Jones, R. A. Lopez, J. G. Deppen. – StatPearls Publishing, 2021. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493193/>.
122. Just 2% of SARS-CoV-2–positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities / Q. Yang, T. K. Saldi, P. K. Gonzales, E. Lasda, C. J. Decker, K. L. Tat [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 21. – P. e2104547118. – DOI: 10.1073/pnas.2104547118.
123. Kalyanaraman, M. COVID-19 in Children / M. Kalyanaraman, M. R. Anderson // *Pediatric Clinics of North America*. – 2022. – Vol. 69. – № 3. – P. 547-571. – DOI: 10.1016/j.pcl.2022.01.013.
124. Koloamatangi, M. COVID-19 and appendicitis in children / M. Koloamatangi, A. Le-Madison, B. Parsh // *Nursing*. – 2022. – Vol. 52. – № 6. – P. 11. – DOI: 10.1097/01.NURSE.0000829880.68035.16.
125. Lamers, M. M. SARS-CoV-2 pathogenesis / M. M. Lamers, B. L. Haagmans // *Nature Reviews Microbiology*. – 2022. – Vol. 20. – № 5. – P. 270-284. – DOI: 10.1038/s41579-022-00713-0.
126. Lemke, G. Blood clots and TAM receptor signalling in COVID-19 pathogenesis / G. Lemke, G. J. Silverman // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – № 7. – P. 395–396. – DOI: 10.1038/s41577-020-0354-x.

127. Long-Term Persistence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in a Pediatric Population / A. Méndez-Echevarría, T. Sainz, I. Falces-Romero, B. De Felipe [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 700. – DOI: 10.3390/pathogens10060700.
128. Longitudinal analysis reveals age-related changes in the T cell receptor repertoire of human T cell subsets / X. Sun, T. Nguyen, A. Achour, A. Ko [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2022. – Vol. 132. – № 17. – P. e158122. – DOI: 10.1172/JCI158122.
129. Longitudinal follow-up of antibody responses in pediatric patients with COVID-19 up to 9 months after infection / P. D. Oygur, Y. Ozsurekci, S. L. Gurlevik, K. Aykac [et al.] // *The Pediatric infectious disease journal*. – 2021. – Vol. 40. – № 8. – P. e294-e299. – DOI: 10.1097/INF.00000000000003199.
130. Lymphocyte–monocyte–neutrophil index: A predictor of severity of coronavirus disease 2019 patients produced by sparse principal component analysis / Y. Qi, J. Jia, H. Li, N. Wan, S. Zhang [et al.] // *Virology Journal*. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 115. – DOI: 10.1186/s12985-021-01561-9.
131. Ma, C. COVID-19 and the digestive system / C. Ma, Y. Cong, H. Zhang // *American Journal of Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 115. – № 7. – P. 1003-1006. – DOI: 10.14309/ajg.0000000000000691.
132. Main clinical features of COVID-19 and potential prognostic and therapeutic value of the microbiota in SARS-CoV-2 infections / Y. He, J. Wang, F. Li, Y. Shi // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1302. – DOI: 10.3389/fmicb.2020.01302.
133. Metabolite, protein, and tissue dysfunction associated with COVID-19 disease severity / A. Rahnavard, B. Mann, A. Giri, R. Chatterjee, K. A. Crandall // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 12204. – DOI: 10.1038/s41598-022-16396-9.
134. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19 / G. L. V. De Oliveira, C. N. S. Oliveira, C. F. PinzanDe Salis [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 635471. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.63547.
135. Mild Cytokine Elevation, Moderate CD4+ T Cell Response and Abundant Antibody Production in Children with COVID-19 / R. Jia, X. Wang, P. Liu, X. Liang

- [et al.] // *Virologica Sinica*. – 2020. – Vol. 35. – № 6. – P. 734-743. –DOI: 10.1007/s12250-020-00265-8.
136. Minato, N. Physiology and pathology of T-cell aging / N. Minato, M. Hattori, Y. Hamazaki // *International immunology*. – 2020. – Vol. 32. – № 4. – P. 223-231. – DOI: 10.1093/intimm/dxaa006.
137. Mitochondrial dysfunction in acute and post-acute phases of COVID-19 and risk of non-communicable diseases / H. B. Madsen, J. A. Durhuus, O. Andersen, P. T. Straten, A. Rahbech [et al.] // *Npj Metabolic Health and Disease*. – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 36. – DOI: 10.1038/s44324-024-00038-x.
138. Mucosal immune response in biology, disease prevention and treatment / X. Zhou, Y. Wu, Z. Zhu, C. Lu, C. Zhang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 7. – DOI: 10.1038/s41392-024-02043-4.
139. Multi-Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) in 2023: Is It Time to Forget about It? / F. La Torre, A. Taddio, C. Conti, M. Cattalin // *Children (Basel)*. – 2023. – Vol. 10. – № 6. – P. 980. – DOI: 10.3390/children10060980.
140. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in New York State / E. M. Dufort, E. H. Koumans, E. J. Chow, E. M. Rosenthal [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2020. – Vol. 383. – № 4. – P. 347-358. – DOI: 10.1056/NEJMoa2021756.
141. Multisystem Inflammatory Syndrome in U.S. Children and Adolescents / L. R. Feldstein, E. B. Rose, S. M. Horwitz [et al.] // *N Engl J Med*. – 2020. – Vol. 383. – № 4. – P. 334-346.
142. Munkemüller, K. Covid-19, Coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel / K. Munkemüller, L. Fry, S. Rickes // *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. – 2020. – Vol. 112. – № 5. – P. 303-388. – DOI: 10.17235/reed.2020.7137/2020.
143. Nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral loads in young children do not differ significantly from those in older children and adults / S. Madera, E. Crawford, C. Langelier, N. K. Tran, E. Thornborrow [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 3044. – DOI: 10.1038/s41598-021-81934-w.

144. Natural mucosal barriers and COVID-19 in children / C. A. Pierce, S. Sy, B. Galen, D. Y. Goldstein [et al.] // *JCI insight*. – 2021. – Vol. 6. – № 9. – P. e148694. – DOI: 10.1172/jci.insight.148694.
145. Neutrophils in COVID-19: Recent insights and advances / J. Li, K. Zhang, Y. Zhang, Z. Gu, C. Huang // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 169. – DOI: 10.1186/s12985-023-02116-w.
146. New insights into the pathogenesis of SARS-CoV-2 during and after the COVID-19 pandemi / J. J. Carvajal, V. García-Castillo, S. V. Cuellar, C. P. Campillay-Véliz, C. Salazar-Ardiles [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1363572. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1363572.
147. Nikolopoulou, G. B. COVID-19 in children: where do we stand? / G. B. Nikolopoulou, H. C. Maltezou // *Arch Med Res*. – 2022. – Vol. 53. – № 1. – P. 1-8. – DOI: 10.1016/j.arcmed.2021.07.002
148. NK Cell and Monocyte Dysfunction in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children / J. K. Dick, J. A. Sangala, V. D. Krishna, A. Khaimraj, L. Hamel, S. M. Erickson [et al.] // *Journal of immunology*. – 2024. – Vol. 213. – № 10. – P. 1452-1466. – DOI: 10.4049/jimmunol.2400395.
149. Overcoming COVID-19 Investigators. Characteristics and outcomes of US children and adolescents with multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) compared with severe acute COVID-19 / L. R. Feldstein, M. W. Tenforde, K. G. Friedman, M. Newhams [et al.] // *JAMA*. – 2021. – Vol. 325. – № 11. – P. 1074-1087. – DOI: 10.1001/jama.2021.2091.
150. Patel, J. M. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) / J. M. Patel // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2022. – Vol. 22. – № 5. – P. 53-60. – DOI: 10.1007/s11882-022-01031-4.
151. Pathogenesis and mechanism of gastrointestinal infection with COVID-19 / H. Zhang, B. Shao, Q. Dang, Z. Chen, Q. Zhou [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 674074. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.674074.
152. Pathologic analysis of twenty-one appendices from children with multisystem inflammatory syndrome compared to specimens of acute appendicitis a cross-sectional

- study / M. Okarska-Napierała, W. Woźniak, J. Mańdziuk [et al.] // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2024. – Vol. 43. – № 6. – P. 1-7. – DOI: 10.1097/INF.0000000000004264.
153. Pediatric appendicitis in times of COVID-19: Think MIS-C / M. A. Alotaibi, W. Alhumaidan, A. Alotaibi, A. M. Alotaibi // *Journal of Pediatric Surgery Case Reports*. – 2022. – Vol. 77. – P. 102151. – DOI: 10.1016/j.epsc.2021.102151.
154. Pediatric COVID-19 and appendicitis: A gut reaction to SARS-CoV-2? / A. Malhotra, M. Sturgill, P. Whitley-Williams, Y.-H. Lee, C. Esochaghi, H. Rajasekhar [et al.] // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2021. – Vol. 40. – № 2. – P. e49–e55. – DOI: 10.1097/INF.0000000000002998.
155. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor / Y. Li, W. Zhou, L. Yang, R. You // *Pharmacological research*. – 2020. – Vol. 157. – P. 104833. – DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104833.
156. Pieren, D. K. J. The adaptive immune system in early life: The shift makes it count / D. K. J. Pieren, M. C. Boer, J. de Wit // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1031924. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.1031924.
157. Pizzorno, A. Gastrointestinal manifestations and SARS-CoV-2 infection / A. Pizzorno, H. Brim, H. Ashktorab // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 61. – P. 114–119. – DOI: 10.1016/j.coph.2021.09.005.
158. Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2 / M. Guo, W. Tao, R. A. Flavell, S. Zhu // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2021. – Vol. 18. – № 4. – P. 269-283. – DOI: 10.1038/s41575-021-00416-6.
159. Prevalence of Syndecan-1 (CD138) expression in different kinds of human tumors and normal tissues / S. Kind, C. Merenkow, F. Büscheck, K. Möller, D. Dum [et al.] // *Disease markers*. – 2019. – 4928315. – DOI: 10.1155/2019/4928315.
160. Pringle, K. G. Impact of ACE2 on the susceptibility and vulnerability to COVID-19 / K. G. Pringle, L. K. Philp // *Journal of Endocrinology*. – 2023. – Vol. 258. – № 3. – P. e220262. – DOI: 10.1530/JOE-22-0262.
161. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors / H. Han, Q. Ma, C. Li, R. Liu, L. Zhao [et al.] // *Emerging microbes*

- & infections. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 1123–1130. – DOI: 10.1080/22221751.2020.1770129
162. Prolonged gastrointestinal manifestations after recovery from COVID-19 / B. J. Elmunzer, O. S. Palsson, N. Forbes, A. Zakaria, C. Davis [et al.] // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2024. – Vol. 22. – № 5. – P. 1098-1107.e3. – DOI: 10.1016/j.cgh.2023.11.009.
163. Ramos-Casals, M. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19 / M. Ramos-Casals, P. Brito-Zerón, X. Mariette // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2021. – Vol. 17. – № 6. – P. 315-332. – DOI: 10.1038/s41584-021-00608-z.
164. Relevance of SARS-CoV-2 related factors ACE2 and TMPRSS2 expressions in gastrointestinal tissue with pathogenesis of digestive symptoms, diabetes-associated mortality, and disease recurrence in COVID-19 patients / A. Kumar, M. A. Faiq, V. Pareek, K. Raza, R. K. Narayan [et al.] // *Medical Hypotheses*. – 2020. – Vol. 144. – P. 110271. – DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110271.
165. Reuben, R. C. COVID-19 alters human microbiomes: A meta-analysis / R. C. Reuben, R. Beugnon, S. D. Jurburg // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1211348. – DOI: 10.3389/fcimb.2023.1211348.
166. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan / X. Li, S. Xu, M. Yu, K. Wang, Y. Tao, Y. Zhou [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – Vol. 146. – № 1. – P. 110-118. – DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.006.
167. Rivera, C. A. Gut immune cells and intestinal niche imprinting / C. A. Rivera, A. M. Lennon-Duménil // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2023. – Vol. 150-151. – P. 50–57. – DOI: 10.1016/j.semcdb.2023.01.006.
168. Rode, J. Serotonin-immunoreactive cells in the lamina propria plexus of the appendix / J. Rode, A. P. Dhillon, L. Papadaki // *Human pathology*. – 1983. – Vol. 14. – № 5. – P. 464-469. – DOI: 10.1016/s0046-8177(83)80294-9.

169. Role of gut microbiome in COVID-19: An insight into pathogenesis and therapeutic potential / I. Hussain, G. L. Y. Cher, M. A. Abid, M. B. Abid // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 765965. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.765965.
170. SARSCoV-2 and the gastrointestinal tract in children / M. G. Puoti, A. Rybak, F. Kiparissi, E. Gaynor, O. Borrelli // *Front Pediatr*. – 2021. – Vol. 9. – P. 617980. – DOI: 10.3389/fped.2021.617980.
171. SARS-CoV-2-associated organs failure and inflammation: A focus on the role of cellular and viral microRNAs / R. Rasizadeh, P. S. Aghbash, J. S. Nahand, T. Entezari-Maleki, H. B. Baghi // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 179. – DOI: 10.1186/s12985-023-02152-6.
172. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271–280.e8. – DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
173. SARS–CoV-2 isolation from an appendix / S. Ahmad, R. N. Ahmed, P. Jani, M. Ullah, H. Aboulgheit // *Journal of Surgical Case Reports*. – 2020. – Vol. 2020. – № 8. – P. rjaa245. – DOI: 10.1093/jscr/rjaa245.
174. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes self-deacetylation by inducing HDAC6 to facilitate viral replication / A. Mukherjee, M. Lo, P. Chandra, R. Datta Chaudhuri [et al.] // *Virology Journal*. – 2024. – Vol. 21. – № 1. – P. 186. – DOI: 10.1186/s12985-024-02460-5.
175. SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5-MAVS, TLR3-TRIF, and cGAS-STING signaling pathways / L. Han, M. W. Zhuang, J. Deng, Y. Zheng, J. Zhang [et al.] // *Journal of medical virology*. – 2021. – Vol. 93. – № 9. – P. 5376-5389. – DOI: 10.1002/jmv.27050.
176. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes / M. M. Lamers, J. Beumer, J. van der Vaart, K. Knoops, J. Puschhof [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 369(6499). – P. 50-54. – DOI: 10.1126/science.abc1669.
177. SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection / C. A. Cohen, A. P. Y. Li, A. Hachim, D. S. C. Hui, M. Y. W.

- Kwan [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 4678. – DOI: 10.1038/s41467-021-24938-4.
178. Schoeman, D. Coronavirus envelope protein: Current knowledge / D. Schoeman, B. C. Fielding // Virology Journal. – 2019. – Vol. 16. – № 1. – P. 69. – DOI: 10.1186/s12985-019-1182-0.
179. Sensitive visualization of SARS-CoV-2 RNA with CoronaFISH / E. Rensen, S. Pietropaoli, F. Mueller [et al.] // Life science alliance. – 2022. – Vol. 5. – № 4. – P. e202101124. – DOI: 10.26508/lsa.202101124.
180. Shih, A. R. COVID-19: Gastrointestinal and hepatobiliary manifestations / A. R. Shih, J. Misdraji // Human Pathology. – 2023. – Vol. 132. – P. 39-55. – DOI: 10.1016/j.humpath.2022.07.006.
181. Significance of intraepithelial lymphocytes in appendix / K. Deniz, L. K. Sökmensüer, C. Sökmensüer, T. E. Patiroğlu // Pathology, research and practice. – 2007. – Vol. 203. – № 10. – P. 731-735. – DOI: 10.1016/j.prp.2007.07.003.
182. Single-cell analyses reveal SARS-CoV-2 interference with intrinsic immune response in the human gut / S. Triana, C. Metz-Zumaran, C. Ramirez, C. Kee [et al.] // Molecular systems biology. – 2021. – Vol. 17. – № 4. – P. e10232. – DOI: 10.15252/msb.202110232.
183. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics / C. Muus, M. D. Luecken, G. Eraslan, L. Sikkema, A. Waghray [et al.] // Nature Medicine. – 2021. – Vol. 27. – № 3. – P. 546-559. – DOI: 10.1038/s41591-020-01227-z.
184. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection / X. Zou, K. Chen, J. Zou, P. Han, J. Hao [et al.] // Frontiers of Medicine. – 2020. – Vol. 14. – № 2. – P. 185-192. – DOI: 10.1007/s11684-020-0754-0.
185. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 / J. Shang, G. Ye, K. Shi, Y. Wan [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 581(7807). – P. 221-224. – DOI: 10.1038/s41586-020-2179-y.

186. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 281-292.e6. – DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
187. Subcellular Detection of SARS-CoV-2 RNA in human tissue reveals distinct localization in alveolar type 2 Pneumocytes and alveolar macrophages / K. K. Acheampong, D. L. Schaff, B. L. Emert, J. Lake, S. Reffsin, E. K. Shea [et al.] // *mBio*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. e0375121. – DOI: 10.1128/mbio.03751-21.
188. The autoimmune signature of hyperinflammatory multisystem inflammatory syndrome in children / R. A. Porritt, A. Binek, L. Paschold, M. N. Rivas, A. McArdle, L. M. Yonker [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2021. – Vol. 131. – № 20. – P. e151520. – DOI: 10.1172/JCI151520.
189. The cytomegalovirus tegument protein UL35 antagonizes pattern recognition receptor-mediated Type I IFN transcription / M. Fabits, V. Gonçalves Magalhães, B. Chan, V. Girault, E. Elbasani [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 6. – P. 790. – DOI: 10.3390/microorganisms8060790.
190. The early phase of the COVID-19 epidemic in Lombardy, Italy / D. Cereda, M. Manica, M. Tirani, F. Rovida, V. Demicheli, M. Ajelli // *Epidemics*. – 2021. – Vol. 37. – P. 100528. – DOI: 10.1016/j.epidem.2021.100528.
191. The impact of COVID-19 critical illness on new disability, functional outcomes and return to work at 6 months: a prospective cohort study / C. L. Hodgson, A. M. Higgins, M. J. Bailey, A. M. Mather [et al.] // *Crit Care*. – 2021. – Vol. 25. – № 1. – P. 382. – DOI: 10.1186/s13054-021-03794-0.
192. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway / J. Y. Li, C. H. Liao, Q. Wang, Y. J. Tan, R. Luo [et al.] // *Virus research*. – 2020. – Vol. 286. – P. 198074. – DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198074.
193. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin / S. Xia, Q. Lan, S. Su, X. Wang, W. Xu [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 92. – DOI:10.1038/s41392-020-0184-0.

194. The role of viruses in human acute appendicitis: a systematic literature review / S. Soltani, M. M. Kesheh, G. Siri [et al.] // *Int J Colorectal Dis.* – 2023. – Vol. 38. – P. 102. – DOI: 10.1007/s00384-023-04391-z.
195. Tobe, T. Inapparent virus infection as a trigger of appendicitis / T. Tobe // *The Lancet.* – 1965. – Vol. 285(7400). – P. 1343–1346. – DOI: 10.1016/S0140-6736(65)92150-1.
196. Transcriptional differences between coronavirus disease 2019 and bacterial sepsis / H. Ito, M. Ishikawa, H. Matsumoto, F. Sugihara, D. Okuzaki [et al.] // *Virology Journal.* – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 198. – DOI: 10.1186/s12985-022-01930-y.
197. Vaňková, L. Pathophysiological and clinical point of view on Kawasaki disease and MIS-C / L. Vaňková, J. Bufka, V. Křížková // *Pediatrics and neonatology.* – 2023. – Vol. 64. – № 5. – P. 495-504. – DOI: 10.1016/j.pedneo.2023.05.002.
198. Vitetta, L. The vermiform appendix: an immunological organ sustaining a microbiome inoculum / L. Vitetta, J. Chen, S. Clarke // *Clinical science (London).* – 2019. – Vol. 133. – № 1. – P. 1-8. – DOI: 10.1042/CS20180956.
199. What has changed in children's appendicitis during the COVID-19 pandemic? / H. N. Ayyıldız, S. Mirapoglu, Z. Akış Yıldız, C. Şahin, F. T. Güvenç, M. Arpacık, Z. Ilce // *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* – 2022. – Vol. 28. – № 12. – P. 1674-1681. – DOI: 10.14744/tjtes.2021.51000.
200. World Health Organization: official website. – COVID-19 epidemiological update, edition 172, 19 October 2024. – WHO IRIS. – URL: <https://iris.who.int/handle/10665/379288>.