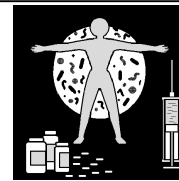


КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ. АЛЛЕРГОЛОГИЯ. ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ



УДК 616.346.2-002.1

DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1\(122\).62-66](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1(122).62-66)

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*

MOLECULAR GENETIC CHANGES IN APPENDIX OF THE CHILDREN WITH COVID-19

G.A.Demyashkin***, A.Yu.Tsibulevskiy, K.R.Gorokhov**, P.V.Nikitin***, I.A.Zorin*

Московский медицинский университет «РЕАВИЗ»

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет)

**Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, Обнинск

***Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва

Стремительная диссеминация SARS-CoV-2 привела к более 54 миллионам случаев инфицирования и около 1,3 миллионов смертей. SARS-CoV-2 может поражать почки, сердце, кишечник, легкие и другие органы. Вопрос о влиянии SARS-CoV-2 на слизистую червеобразного отростка у детей остается открытым. Цель исследования — оценка молекулярно-генетического профиля цитологических процессов в ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19. Фрагменты червеобразных отростков детей с подтвержденным COVID-19 ($n = 24$) были изучены методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения экспрессии вирусной РНК SARS-CoV-2 и генов, кодирующих белковые комплексы: АПФ-2 и Фурина. У пациентов, пораженных COVID-19, было зафиксировано наличие генетического материала коронавируса в червеобразном отростке. Кроме того, в ткани выявлена повышенная экспрессия АПФ-2 и Фурина, что определяет благоприятные условия для поражения SARS-CoV-2. По результатам ПЦР-ПВ на SARS-CoV-2, оценки экспрессии АПФ-2 и Фурина, можно с большой вероятностью утверждать о вирусной нагрузке в червеобразном отростке у детей.

Ключевые слова: червеобразный отросток, дети, SARS-CoV-2, АПФ-2, Фурин

Для цитирования: Демяшкин Г.А., Цибулевский А.Ю., Горохов К.Р., Никитин П.В., Зорин И.А. Молекулярно-генетические изменения ткани червеобразного отростка детей с COVID-19 // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2021. №1(122). С. 62-66. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1\(122\).62-66](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1(122).62-66).

The rapid dissemination of SARS-CoV-2 has resulted in over 54 million infections and about 1,3 million deaths. SARS-CoV-2 can damage the kidneys, heart, intestines, lungs and other organs. The question of the effect of SARS-CoV-2 on the mucous membrane of the appendix in children remains open. The aim of the study was to assess the molecular genetic profile of cytological processes in the tissue of the appendix in the children with COVID-19. Fragments of the appendix of the children with confirmed COVID-19 ($n = 24$) were studied by real-time polymerase chain reaction to determine the expression of SARS-CoV-2 RNA and genes encoding protein complexes: ACE-2 and Furin. In patients affected by COVID-19, the presence of coronavirus genetic material in the appendix was recorded. Increased expression of ACE-2 and Furin was found in the tissue, what determines favorable conditions for coronavirus defeat. Based on the results of RT-PCR for SARS-CoV-2 and the expression of ACE-2 and Furin, we can talk about the viral load in the appendix in children.

Keywords: appendix, children, SARS-CoV-2, ACE-2, Furin

For citation: Demyashkin G.A., Tsibulevskiy A.Yu., Gorokhov K.R., Nikitin P.V., Zorin I.A. Molecular genetic changes in appendix of the children with COVID-19 // Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences. 2021. №1(122). P.62-66. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1\(122\).62-66](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1(122).62-66).

Введение

В декабре 2019 г. в г. Ухань произошла вспышка новой коронавирусной инфекции (COVID-19), которая быстро распространилась по всему миру. Стремительная диссеминация SARS-CoV-2 привела к более 54 миллионам случаев инфицирования и около 1,3 миллионов смертей [1].

Проникновение вируса в клетку происходит путем связывания с некоторыми специфическими белками-рецепторами: ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ-2) и сериновой протеазой — фурином [2]. Широкая распространенность данных белков в организме приводит к мультинаправленному действию вируса. Так, SARS-CoV-2 может поражать почки, сердце, кишечник, легкие и другие органы, что

позволяет рассматривать COVID-19 в качестве системного заболевания [1].

В настоящее время установлена тропность вируса SARS-CoV-2 к органам желудочно-кишечного тракта, в частности к толстой кишке [3]. Согласно проведенному анализу научной литературы АПФ-2 широко экспрессируется в эпителии толстой кишки. Также получены данные о положительном ПЦР-исследовании на SARS-CoV-2 в фекалиях пациентов, у которых ранее была выявлена коронавирусная инфекция по результатам назофарингеального мазка [4]. Такие данные соотносятся с множеством сообщений о колите, возникшем на фоне SARS-CoV-2-инфекции [5,6].

Важным элементом периферической части иммунной системы, как известно, является червеобразный отросток, где развитие лимфоидных фолликулов в период детства необходимо для созревания не только местного иммунитета, но и становления и функционирования иммунной системы в целом [6].

По мнению некоторых авторов, в условиях пандемии не исключено развитие острого аппендицита на фоне COVID-19 [7] или псевдоаппендицита [8].

Учитывая отсутствие информации о возможной инвазии SARS-CoV-2 в эпителий червеобразного отростка у взрослых и детей, а также очевидный интерес к особенностям течения острого аппендицита в этих условиях, проведение исследований в данном направлении представляется актуальным.

Цель настоящего исследования — оценка молекулярно-генетического профиля цитологических процессов в ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19.

Материалы и методы

Дизайн исследования. На основании анамнестических, клинических и морфологических данных были сформированы группы, каждая из которых включала подгруппы согласно возрастной периодизации ВОЗ (табл.1):

— I ($n = 24$; возрастом от 2 до 18 лет, средний — 10,8 лет): операционный материал червеобразного отростка после аппендэктомии у детей с установленным клиническим диагнозом: коронавирусная инфекция (COVID-19, ПЦР+).

— II ($n = 20$; возрастом от 2 до 18 лет, средний — 9,7 лет): контрольная группа, аутопсийный материал червеобразного отростка, полученный не позд-

нее 6 часов после констатации биологической смерти, без макроскопических признаков наличия воспалительного и/или опухолевого процесса.

Таблица 1

Распределение по группам, согласно возрастной периодизации детей (ВОЗ, 2014 г.)

Возраст	n	
	I – COVID-19	II – контроль
2-6 лет (младшее детство)	5	5
6-12 лет (детство)	7	7
12-18 лет (подростки)	12	8

Морфологическое исследование. Для гистологического исследования биопсийного материала червеобразного отростка использовали стандартный метод (фиксация в забуференном формалине, аппаратная проводка, заливка в парафин, окраска гематоксилином и эозином). Для ПЦР-РВ готовили серийные срезы толщиной 8 мкм.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Тотальная РНК выделялась из парафиновых блоков фрагментов червеобразного отростка с применением RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). ПЦР в реальном времени для выявления SARS-CoV-2 выполнялась с использованием набора для одноэтапной ПЦР QuantiTect (Qiagen).

Анализ экспрессии генов АПФ-2 и Фурина проведен с использованием метода определения порогового цикла (ΔCt) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу. Нормирование и внутренний контроль выполнены относительно гена домашнего хозяйства GAPDH. Статистический контроль проводился относительно контрольной группы.

Подбор праймеров был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST (табл.2).

Статистические методы и обработка данных. Количественные данные, полученные в ходе ПЦР-РВ, были проанализированы с использованием рангового дисперсионного анализа ANOVA.

Таблица 2

Используемые праймеры для SARS-CoV-2, АПФ-2 и Фурина

Ген	5'-праймер	3'-праймер
SARS-CoV-2	WuhanCoV-spk2-f 5'-TTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGT-3'	
	WuhanCoV -spk2-r 5'-TGTGGTTCATAAAAAATTCCTTTGTG-3'	
	WuhanCoV-spk2-hex-p5'-HEX-TCAAATGGCACACACTGGTTTGT-BHQ1	
АПФ-2	ACCTCACTATTTGAAAGCACTTGGT	GCTTGCTTGAGCAGGAAGTTTATTT
Фурин	CCACATGACTACTCTGCTGATGG	CGAGAGTGAACCTGGTCAGCGT

Результаты

При морфологическом исследовании червеобразных отростков детей I группы во всех образцах ($n = 24$) обнаружили признаки острого гнойного деструктивного аппендицита. Частично сохранившаяся стенка органа с воспалительной лимфоцитарно-плазматической инфильтрацией с примесью нейтрофилов, обилием тучных клеток; гиперплазия лимфоидных фолликулов. На значительном протяжении обнаружили десквамацию эпителия. Кроме того, отмечали отек и резкое полнокровие кровеносных сосудов с явлением стаза и наличием микротромбов.

Во всех изучаемых образцах ($n = 24$) в ткани аппендикса при ПЦР-РВ обнаружен SARS CoV-2 (см. рис.).

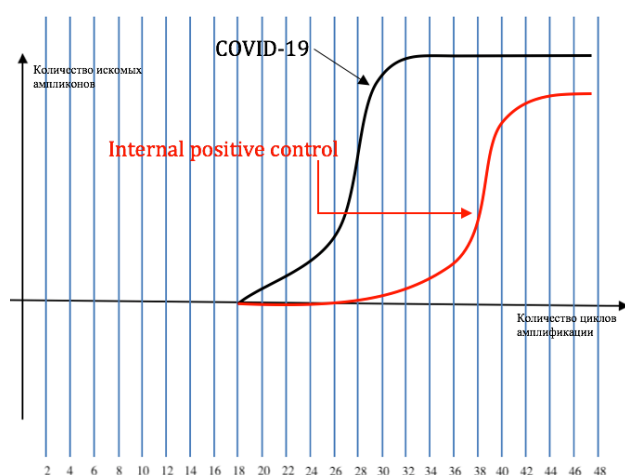


График ПЦР-РВ на основе профиля экспрессии генетического материала SARS-CoV-2 в ткани червеобразного отростка

При ПЦР-РВ анализе экспрессии АПФ-2 и Фурина в ткани червеобразного отростка ($n = 24$) показали приблизительно схожие паттерны экспрессии нормализованные по GAPDH (табл.3).

Таблица 3
Результаты ПЦР-РВ на АПФ-2 и Фурин (усл. ед.)

Гены	Червеобразный отросток	
	I – COVID-19	II – контроль
АПФ-2	8,62±0,85	5,6±0,42
Фурин	38,28±1,42	36,1±1,18

В ткани червеобразного отростка у детей с COVID-19 отмечали увеличение экспрессии АПФ-2 по сравнению с контролем почти в 1,5 раза — 8,62±0,85 vs 5,6±0,42, $p < 0,01$ соответственно. Корреляционной связи с возрастом не было обнаружено (табл.4).

Таблица 4
Распределение экспрессии АПФ-2 при ПЦР-РВ по возрастам (усл. ед., $p < 0,01$)

Возраст	АПФ-2	
	I – COVID-19	II – контроль
2-6 лет (младшее детство)	8,72±0,83	5,62±0,15
6-12 лет (детство)	8,76±0,43	5,62±0,15
12-18 лет (подростки)	8,65±0,39	5,62±0,15

Экспрессия Фурина в червеобразном отростке у детей с COVID-19 была незначительно выше по сравнению с контрольной группой — 38,28±1,42 vs 36,1±1,18, $p < 0,01$, соответственно, степень ее не демонстрировала зависимость от возраста (табл.5).

Таблица 5
Распределение экспрессии Фурина при ПЦР-РВ по возрастам (усл. ед., $p < 0,01$)

Возраст	Фурин	
	I – COVID-19	II – контроль
2-6 лет (младшее детство)	39,28±1,83	36,03±1,07
6-12 лет (детство)	35,77±1,43	35,97±1,17
12-18 лет (подростки)	38,41±1,39	36,01±1,23

Обсуждение

В настоящем исследовании впервые приведены данные о вирусной нагрузке SARS-CoV-2 в червеобразном отростке у детей с подтвержденным диагнозом COVID-19 в разных возрастных группах с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

При ПЦР-РВ SARS-CoV-2 был обнаружен во всех изучаемых образцах I группы ($n = 24$) тканей аппендикса, что говорит о тропности вируса, а также о возможной уязвимости иммунной системы ребенка в современных пандемических условиях.

При микроскопической оценке стенки аппендикса I группы в ходе исследования были выявлены особенности течения воспалительной реакции, что частично совпадает с результатами аналогичных работ [9,10]. К общим проявлениям вирусного воспаления в микропрепаратах червеобразных отростков детей I группы следует отнести обнаруженную гиперплазию элементов лимфоидного аппарата, увеличение количества плазмочитов, а также снижение доли полиморфноядерных лейкоцитов. Однако наличие дегенеративных изменений и некроз эпителиальных клеток под влиянием SARS-CoV-2 могут все же служить хемотаксическими стимулами для миграции сегментарных лейкоцитов и макрофагов.

Весьма вероятно, что с проникновением вируса в клетку начинается повреждение тканей специфической вирусной природы. Вследствие этого нуклеиновые кислоты SARS-CoV-2 получают доступ к механизмам синтеза в цитоплазме и ядре эпителиоцитов. Согласно полученным данным, не исключается развитие у детей SARS-CoV-2-ассоциированного аппендицита.

Таким образом, оценивая морфологическую картину фрагментов червеобразных отростков I группы, можно предположить, что SARS-CoV-2 оказывает прямое повреждающее действие на орган, осуществляя вирусную инвазию в клетки с помощью белков АПФ-2 и Фурина, что подтверждается полученными нами высокими значениями экспрессии АПФ-2 и Фурина [11,12].

У детей I группы мы наблюдали увеличение экспрессии гена, кодирующего составляющие комплекса АПФ-2, что говорит о потенциальной готовности тканей аппендикса к проникновению и дальнейшему воздействию SARS-CoV-2. Помимо рецепторной функции АПФ-2 играет важную роль в регуляции кровяного давления и гемодинамики [13,14].

Анализируя паттерн экспрессии Фурина в ткани червеобразного отростка, расщепляющего последовательность S-белка, мы отмечали незначительное увеличение данной протеазы в образцах I группы, что является предрасполагающим фактором для проникновения SARS-CoV-2 в клетку [15].

Принимая во внимание данные scRNA-seq и иммуногистохимических реакций из публичных карт The Human Protein Atlas, согласно которым в норме АПФ-2 и Фурин на 55-70% экспрессируется в лимфоцитах, эпителиоцитах, фибробластах, гладких миоцитах и эндотелиоцитах червеобразного отростка, с высокой долей вероятности можно утверждать, что они являются клетками-мишенями для SARS-CoV-2, что также объясняет обнаруженные деструктивные изменения стенки органа.

Подводя итог проведенному исследованию, можно говорить об уязвимости червеобразного отростка к инфекции SARS-CoV-2, о чем свидетельствуют результаты ПЦР-ПВ, что позволило предположить возможные этиопатогенетические механизмы развития морфологических изменений острого аппендицита на фоне COVID-19 у детей.

Заключение

По результатам ПЦР-ПВ на SARS-CoV-2 и оценки экспрессии АПФ-2 и Фурина можно с высокой долей вероятностью заявлять о вирусной нагрузке в червеобразном отростке у детей.

1. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Проценко Д.Д., и др. Патологическая анатомия инфекции, вызванной SARS-CoV-2 // Судебная медицина. 2020. Т.6. №2. С.8-30. doi: 10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30.
2. Clarke N.E., Turner A.J. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade // Int J Hypertens. 2012. V. 2012. Article ID 739274, 6 p. doi:10.1155/2012/307315.
3. Zhou J., Li C., Liu X. et al. Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2 // Nat Med. 2020. V.26. P.1077–1083. doi:10.1038/s41591-020-0912-6.

4. Wang W., Xu Y., Gao R. et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens // JAMA. 2020. V.323(18). P.1843-1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
5. Jaijakul S. Colitis as a Sole Presentation of SARS-CoV-2 Infection: Case Report [published online ahead of print, 2020 Jun 11] // SN Compr Clin Med. 2020. 1-3. doi:10.1007/s42399-020-00346-5.
6. Carvalho A., Alqusairi R., Adams A. et al. SARS-CoV-2 Gastrointestinal Infection Causing Hemorrhagic Colitis: Implications for Detection and Transmission of COVID-19 Disease // Am J Gastroenterol. 2020. V.115(6). P.942-946. doi:10.14309/ajg.0000000000000667.
7. Alsawailem A.B., Turkistani R., Alomari M. Complicated appendicitis in a pediatric patient with COVID-19: A Case Report // Cureus. 2020. Vol.12(6). P.e8677. doi:10.7759/cureus.8677.
8. Suwanwongse K., Shabarek N. Pseudo-Appendicitis in an Adolescent With COVID-19 // Cureus 2020. Vol.12(7). P.e9394. doi:10.7759/cureus.9394.
9. Lamps L.W. Infectious causes of appendicitis // Infect Dis Clin North Am. 2010. Vol.24(4). P.995-1018. doi: 10.1016/j.idc.2010.07.012.
10. Emre A., Akbulut S., Bozdogan Z. et al. Routine histopathologic examination of appendectomy specimens: retrospective analysis of 1255 patients // Int Surg. 2013. V.98(4). P.354-362. doi:10.9738/INTSURG-D-13-00098.1
11. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // Cell. 2020. V.181. P.271-280.
12. Mokhtari T., Hassani F., Ghaffari N., et al. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms // J Mol Histol. 2020. V.51(6). P.613-628. doi:10.1007/s10735-020-09915-3.
13. Kuba K., Imai Y., Rao S. et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury // Nat. Med. 2005. Vol.11(8). P.875-879. doi: http://doi.org/10.1038/nm1267.
14. Xiao L., Sakagami H., Miwa N. ACE2: The key molecule for understanding the pathophysiology of severe and critical conditions of COVID-19: demon or angel? // Viruses. 2020. Vol.12(5). Pp.491. doi: http://doi.org/10.3390/v12050491.
15. Xia S., Lan Q., Su S. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin // Sig Transduct Target Ther. 2020. V.5. Article number: 92. doi: https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0.

References

1. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Протсенко Д.Д. et al. [Patologicheskaya anatomiya infektsii, vyzvannoy SARS-CoV-2]. Pathological Anatomy of Infection Caused by SARS-CoV-2. Russian Journal of Forensic Medicine, 2020, no. 6(2), pp.8–30. doi: 10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30/
2. Clarke N.E., Turner A.J. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. Int J. Hypertens., 2012, vol. 2012, 307315, doi:10.1155/2012/307315.
3. Zhou J., Li C., Liu X. et al. Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2. Nat. Med 26, 2020, pp. 1077–1083. doi:10.1038/s41591-020-0912-6/
4. Wang W., Xu Y., Gao R., Lu R., Han K., Wu G., Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA, 2020, vol. 323(18), pp.1843-1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
5. Jaijakul S. Colitis as a Sole Presentation of SARS-CoV-2 Infection: Case Report. SN Compr. Clin. Med, 2020, vol. 2, pp. 879–881. doi: 10.1007/s42399-020-00346-5.
6. Carvalho A., Alqusairi R., Adams A. et al. SARS-CoV-2 Gastrointestinal Infection Causing Hemorrhagic Colitis: Implications for Detection and Transmission of COVID-19 Disease. Am. J. Gastroenterol., 2020, vol. 115(6), pp. 942-946. doi:10.14309/ajg.0000000000000667.
7. Alsawailem A.B., Turkistani R., Alomari M. (June 17, 2020) Complicated Appendicitis in a Pediatric Patient With COVID-19: A Case Report. Cureus 12(6), pp. e8677. doi:10.7759/cureus.8677.

8. Suwanwongse K., Shabarek N. (July 25, 2020) Pseudo-Appendicitis in an Adolescent With COVID-19. *Cureus* 12(7), pp.e9394. doi:10.7759/cureus.9394.
9. Lamps L.W. Infectious causes of appendicitis. *Infect Dis Clin North Am.* 2010 Dec, vol. 24(4), pp.995-1018, ix-x. doi: 10.1016/j.idc.2010.07.012.
10. Emre A., Akbulut S., Bozdog Z. et al. Routine histopathologic examination of appendectomy specimens: retrospective analysis of 1255 patients. *Int Surg.*, 2013, vol. 98(4), pp.354-362. doi:10.9738/INTSURG-D-13-00098.1.
11. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, vol.181, pp.271–280.
12. Mokhtari T., Hassani F., Ghaffari N. et al. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *J. Mol. Histol.*, 2020, vol. 51(6), pp. 613-628. doi:10.1007/s10735-020-09915-3.
13. Kuba K., Imai Y., Rao S. et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.*, 2005, vol. 11(8), pp. 875-9. doi: http://doi.org/10.1038/nm1267.
14. Xiao L., Sakagami H., Miwa N. ACE2: The key molecule for understanding the pathophysiology of severe and critical conditions of COVID-19: demon or angel? *Viruses*, 2020, vol. 12(5), pp. 491. doi: http://doi.org/10.3390/v12050491.
15. Xia S., Lan Q., Su S. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Sig Transduct Target Ther.*, 2020, vol. 5, p. 92. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0.