

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Зарубин Егор Алексеевич

Межклеточные взаимодействия в развитии поражения легких при COVID-19

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Коган Евгения Алтаровна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Этиология и патогенез поражения легких при COVID-19	16
1.2. Роль внеклеточных везикул в поражении легких при COVID-19.....	20
1.3. Клиническая картина поражения легких.....	28
1.4. Морфологические характеристики поражения легких.....	30
1.5. Резюме литературного обзора	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Клинико-anamнестический анализ и макроскопическое исследование	35
2.2. Микроскопическое исследование.....	37
2.3. Иммуногистохимическое исследование	38
2.4. Морфометрический анализ.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	43
3.1. Клинико-морфологический анализ	43
3.2. Макроскопическое исследование	46
3.3. Гистологическое исследование	49
3.4. Иммуногистохимическое исследование Nucleocapsid и Spike-протеина вируса SARS-CoV-2	58
3.5. Иммуногистохимическое исследование внеклеточных везикул	64
3.6. Статистический анализ	69
3.6.1. Корреляционный анализ при группировке по отдельным видам клеток.....	70
3.6.2. Общий корреляционный анализ	73
3.6.3. Графический и статистический анализ данных	74
3.6.4. Основные статистические показатели.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	94

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЕ А	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Новая коронавирусная инфекция - быстро распространяющееся инфекционное заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2. Первый случай вспышки был зафиксирован в декабре 2019 года в китайском городе Ухане, а уже 11 марта 2020 года Всемирная организация здравоохранения официально объявила пандемию COVID-19, вызванную этим новым коронавирусом. Это третья крупная вспышка коронавирусной инфекции, которой предшествовали тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и ближневосточный респираторный синдром (MERS), однако оба этих вируса удалось сдержать до того, как они вызвали глобальную пандемию. С момента появления COVID-19 значительная часть населения была инфицирована вирусом SARS-CoV-2 [1]. Заболевание продолжает распространяться в настоящее время, после официального завершения пандемии всемирной организацией здравоохранения [2].

Коронавирусы представляют собой разнообразную группу вирусов с одноцепочечной РНК с положительной оболочкой (+РНК), которые широко распространены среди людей и животных. Их название происходит от характерного внешнего вида, напоминающей солнечную корону. Структурно коронавирус состоит из молекулы РНК и четырех основных белков: S – спайковый, E – оболочечный, M – мембранный и N – нуклеокапсидный.

Заражение происходит преимущественно воздушно-капельным путем, однако, описаны и другие механизмы распространения вируса [3–5]. Контактный механизм передачи реализуется за счет персистенции вируса на различных поверхностях. Отдельные исследования показывают наличие РНК вируса в плазме крови и кале, что подтверждает возможность передачи через гемоконтактный и фекально-оральный механизмы. Описаны отдельные случаи вертикальной передачи вируса [6]. Основные пути внедрения вируса - эпителий верхних дыхательных путей, а также эпителиальные клетки желудка и кишечника.

При попадании на эпителий верхних дыхательных путей основным путем внедрения вируса SARS-CoV-2 в клетку является взаимодействие с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ-2, ACE-2). Вирус связывается с этим рецептором через поверхностный S белок [7,8], что позволяет ему проникать внутрь клетки с помощью различных протеаз. ACE2 располагается на поверхности мембран клеток многих органов и тканей, таких как слизистая оболочка носа, бронхи, легкие, сосуды, органы желудочно-кишечного тракта, сердце, почки, мочевой пузырь и нервная система [9,10].

Описаны и другие механизмы проникновения вируса в клетку. Отдельные работы указывают на наличие альтернативного пути проникновения коронавирусов в клетку, который осуществляется при помощи взаимодействия S-протеина вируса с CD147 на поверхности клеток. CD147 широко распространен во всем человеческом организме [11]. Другие исследования показывают, что еще одним механизмом внедрения коронавирусов в клетку является взаимодействие S-протеина коронавирусов с дипептидил пептидазой 4 (ДПП4) на поверхности клеток-мишеней. AXL рецептор тирозин-протеинкиназы UFO может также служить входными воротами для внедрения вируса внутрь клетки, благодаря специфическому взаимодействию с N-концевым доменом SARS-CoV-2. Изучение других механизмов внедрения вируса может привести к пониманию потенциальных точек приложения терапевтического воздействия [49].

После проникновения вируса в клетку происходит транскрипция вирусной репликазы, геномная транскрипция и репликация, трансляция структурных белков, сборка с дальнейшим высвобождением вириона [12].

Основным органом-мишенью при COVID-19 являются легкие. Поражение легких включает в себя несколько вариантов, которые, по мнению некоторых авторов, могут являться своеобразными формами-фазами [10]. Наиболее важным вариантом поражения легких с клинической и прогностической точек зрения является диффузное альвеолярное повреждение (клинически – острый респираторный дистресс-синдром), сопровождающееся дыхательной

недостаточностью с потенциальной необходимостью госпитализации пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии с инициацией искусственной вентиляции легких. Подобное течение болезни негативно влияет на экономическое состояние системы здравоохранения.

Одним из важных патогенетических звеньев тяжелого течения COVID-19 является развитие цитокинового шторма, реализуемого путем множества межклеточных взаимодействий, приводящих к активации врожденного иммунитета и бесконтрольной продукции цитокинов макрофагами и нейтрофилами [13]. Одним из ключевых цитокинов является ИЛ-6, уровень которого в плазме крови повышается при инфекции SARS-CoV-2, и его определение имеет клиническую и прогностическую ценность. Избыточная секреция ИЛ-6 приводит к его связыванию с различными мембранными рецепторами и может приводить к плеiotропному воздействию на клетки приобретенного и врожденного иммунитета, с развитием цитокинового шторма [14] и полиорганной недостаточности. Истощение иммунной системы с развитием лимфопении имеет неблагоприятный прогноз и коррелирует с тяжестью состояния COVID-19 [15]. Проблема цитокинового шторма на сегодняшний день является нерешенной, а подробное изучение механизмов развития этого состояния позволит оказывать эффективное терапевтическое воздействие на патогенез не только коронавирусной инфекции, но и других заболеваний.

Было показано, что течение COVID-19 может осложняться развитием аутоиммунных заболеваний. Заражение вирусом SARS-CoV-2, как было сказано выше, нарушает регуляцию иммунного ответа, запускает как врожденный, так и приобретенный иммунитет, что приводит к гиперактивации иммунной системы, чрезмерной секреции цитокинов, известной как «цитокиновый шторм», и, наконец, к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС), сопровождающемуся высокой смертностью. Любой фактор в организме, вызывающий хроническое воспаление, может способствовать развитию аутоиммунного заболевания, что было зарегистрировано во время пандемии COVID-19. Было замечено, что у

некоторых пациентов вырабатываются аутоантитела и аутореактивные CD4 + и CD8 + Т-клетки, что приводит к потере аутоотолерантности.

Аутоиммунные реакции могут быть спровоцированы непосредственно вирусными белками, такими как Spike-протеин. На животных моделях было показано, что Spike-протеин может повреждать эндотелий, может разрушать *in vitro* модель гематоэнцефалического барьера. Spike-протеин, по-видимому, имеет общие антигенные эпитопы с шаперонами человека, что приводит к аутоиммунитету и может активировать Toll-подобные рецепторы (TLR), приводя к высвобождению воспалительных цитокинов и развитию аутоиммунизации [16]. Однако существует недостаточно доказательств, определяющих точное молекулярное взаимодействие между вирусом и иммунной системой, вызывающее аутореактивность, что требует дополнительных исследований [17].

Также было показано, что у пациентов, переболевших новой коронавирусной инфекцией, наблюдается развитие иммунопатологических реакций, ассоциированных с IgG к SARS-CoV-2, с поражением внутренних органов, в том числе эндокринных, даже при отсутствии вирусных частиц в исследуемых тканях [18].

Особую роль в патогенезе поражения легких могут играть внеклеточные везикулы (ВКВ), являющиеся пузырьками, которые окружены фосфолипидным бислоем и содержат различные активные биомолекулы, такие как белки (ферменты, поверхностные рецепторы и лиганды), липиды (холестерин, фосфатидилхолин и сфингомиелин) и нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микро-РНК и длинные не кодирующие РНК) [19]. ВКВ синтезируются всеми типами клеток [20]. ВКВ представлены несколькими подвидами, отличающимися по структуре, составу и механизму синтеза. Ключевыми представителями ВКВ являются экзосомы, эктосомы, микровезикулы, апоптозные тельца, онкосомы и тд, однако, критерии классификации везикул пересекаются друг с другом, что усложняет их дифференцировку, а в различных источниках приводятся различные подтипы [21,22,23]. ВКВ принимают участие не только в широком спектре

физиологических процессов, но и в развитии заболеваний, в том числе инфекционных, в том числе COVID-19, а также в регулировании иммунной системы [22]. Однако, исследований, подтверждающих роль ВКВ в развитии COVID-19, пока недостаточно. Изучение их поможет лучше понять молекулярные механизмы патогенеза не только COVID-19, но и других заболеваний.

Все вышеизложенное обуславливает сохраняющийся высокий интерес к межклеточным взаимодействиям в патогенезе поражения легких при новой коронавирусной инфекции.

Степень разработанности темы исследования

COVID-19 подробно изучен и описан в литературе. Большую роль в описание патоморфогенеза внесли отечественные авторы на основании самого большого в мире количества исследований летальных случаев COVID-19 [24,25]. Подробно описаны клиническое течение, макро- и микроскопическая картины при различных вариантах поражения легких, но лишь немногочисленные исследования включали в себя описание клеточной локализации вирусных частиц и белков в ткани легких с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимического (ИГХ) метода на парафиновых блоках [26,27]. Однако, подробная клеточная локализация вирусных белков при различных вариантах поражения легких не описана.

В мировой литературе существует большое количество исследований, посвященных изучению роли ВКВ в физиологических и патологических процессах, а также их использование в терапевтических целях. Существуют работы, описывающие потенциальную роль внеклеточных везикул в патогенезе вирусных инфекций, в том числе COVID-19 [22,28]. Невзирая на большое количество исследований, посвященных роли внеклеточных везикул в патогенезе COVID-19, все они имеют разрозненный характер, рассматривая либо отдельные клетки-продуценты ВКВ, либо отдельные виды их взаимоотношений, упуская значение комплексного взгляда с точки зрения рутинного патологоанатомического

исследования. Не исследована подробная клеточная локализация внеклеточных везикул при различных формах поражения легких, а также не описана взаимосвязь их локализации с локализацией вирусных белков SARS-CoV-2.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является изучение межклеточных взаимодействий, реализующихся внеклеточными везикулами, в патогенезе поражения легких и распространении в организме белков вируса в летальных исходах COVID-19 на основании аутопсийных данных с применением макроскопического, гистологического и иммуногистохимического методов исследования.

Задачи исследования:

1. Клинико-морфологический анализ поражения легких при COVID-19.
2. Описание морфологических особенностей различных вариантов поражения легких.
3. Анализ частоты встречаемости различных форм поражения легких за периоды 2 и 3 волн в г. Москва, а также сравнение с результатами исследования 1ой волны.
4. Количественный и качественный анализ клеточной локализации белков SARS-CoV-2 (Nucleocapsid, Spike-протеин) при различных вариантах поражения легких.
5. Количественный и качественный анализ клеточной локализации внеклеточных везикул при различных вариантах поражения легких.
6. Определение взаимосвязи клеточной локализации вирусных белков и внеклеточных везикул при различных вариантах поражения легких.

Научная новизна

Новизна данного научного исследования заключается в изучении и описании клеточной локализации белков SARS-CoV-2 и внеклеточных везикул, изучение роли ВКВ в межклеточных взаимодействиях в патогенезе различных

патологических процессов в легких при COVID-19, включающих в себя диффузное альвеолярное повреждение, альвеолит, васкулит, ДВС-синдром. Проведен клинико-морфологический анализ различных вариантов поражения легких вирусом SARS-CoV-2 в различные волны пандемии в г. Москва. Впервые проведен количественный анализ клеток, содержащих вирусные белки и внеклеточные везикулы. Впервые была подробно описана иммуногистохимическая картина клеточной локализации вирусных белков и внеклеточных везикул при COVID-19 в ткани легких, что может быть использовано в патологоанатомической практике.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование имеет большое теоретическое и практическое значения. Полученные результаты дополняют знания о патологической анатомии ткани легких при COVID-19, о механизмах межклеточных взаимодействий, реализуемых внеклеточными везикулами. Показано, что персистенция белков вируса в эндотелиоцитах может обеспечивать распространение вирусных частиц в макроорганизме, обнаружение белков вируса в макрофагах свидетельствует о потенциальном развитии иммунопатологических процессов. Вирусные частицы могут диссеминировать в макроорганизме путем внеклеточных везикул. В настоящее время внеклеточные везикулы являются объектом научного интереса. Нами показано, что ВКВ содержатся в макрофагах, пневмоцитах 2 типа, эндотелиоцитах и лимфоцитах при всех вариантах поражения легких, что свидетельствует об их важной роли в патогенезе COVID-19. Подробное изучение ВКВ приведет к глубокому пониманию широкого спектра физиологических и патологических процессов. Внеклеточные везикулы являются крайне перспективным объектом не только для изучения, но и для использования в качестве терапевтического воздействия на ключевые патогенетические звенья большого количества заболеваний. В настоящем исследовании показано, что определение внеклеточных везикул и вирусных белков возможно в рутинной патологоанатомической практике. Определение вирусных белков и ВКВ в

повседневной работе позволит определять возможность развития постковидного синдрома, более точно прогнозировать течение COVID-19 у конкретного пациента.

Понимание межклеточных взаимодействий при различных вариантах поражения легких при COVID-19 является ключевым звеном для эффективного терапевтического и профилактического процессов.

Методология и методы исследования

В рамках проведенного исследования были применены следующие методы исследования: клинико-морфологический, макроскопический, гистологический, иммуногистохимический, статистический.

Положения, выносимые на защиту

1. Основными вариантами поражения легких при COVID-19 во 2 и 3 волны являются диффузное альвеолярное повреждение, лимфоцитарный альвеолит, тромбоваскулит, ДВС-синдром, являющиеся самостоятельными формами. Вирусно-бактериальная пневмония и интерстициальный фиброз являются вторичными вариантами. Наиболее частой формой поражения легких является COVID-ассоциированная коагулопатия, а наиболее важной с точки зрения потенциального летального исхода – диффузное альвеолярное повреждение. Разница частоты встречаемости форм не зависит от исследуемой волны за исключением лимфоцитарного альвеолита, который чаще встречался во вторую волну.
2. Основными клетками, в которых содержатся белки вируса SARS-CoV-2 (Spike-протеин и Nucleocapsid) при всех вариантах поражения легких, являются альвеолярные и интерстициальные макрофаги, пневмоциты 1 и 2 типов, эндотелиоциты, лейкоциты. В зависимости от различных вариантов поражения легких количественные показатели окрашенных клеток различаются. Наибольшее количество окрашенных клеток (макрофагов, пневмоцитов и эндотелиоцитов) наблюдалось в случаях диффузного альвеолярного повреждения, особенно в

пролиферативную фазу, а также в участках аденоматоза.

3. Ключевыми клетками-продуцентами ВКВ являются альвеолярные и интерстициальные макрофаги, пневмоциты 2 типа, эндотелиоциты, лейкоциты, лимфоциты, иммуногистохимическое окрашивание которых определяется при всех вариантах поражения легких вирусом SARS-CoV-2. Наибольшее иммуногистохимическое окрашивание макрофагов определяется при диффузном альвеолярном повреждении, особенно в фазу пролиферации, а также в участках аденоматоза. Окрашивание эндотелиоцитов было схожим при различных формах поражения легких.

4. Имеется корреляция клеточной локализации внеклеточных везикул и белков вируса SARS-CoV-2 (Spike-протеин и нуклеокапсид). Заметная и сильная связь выявлена при сравнении окрашенных антителами против Spike-протеина, Nucleocapsid и CD63 макрофагов, пневмоцитов 2 типа и эндотелиоцитов при ДАП в фазу экссудации, пролиферации, аденоматоза. Внеклеточные везикулы играют ключевую роль в межклеточных взаимодействиях при поражении легких вирусом SARS-CoV-2, а также участвуют в диссеминации белков в макроорганизме.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, областям исследований по п. 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», п. 2 «Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов», п. 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», п. 4 «Исследование морфо- и танатогенеза заболеваний, роли различных органных, тканевых систем в становлении основного заболевания (полиорганность патологии) и его исходах».

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом данных, использованием современных методов исследования, а также соответствием целям и задачам работы. Научные положения и выводы, выдвинутые в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в рисунках и таблицах. Полученные выводы, изложенные в диссертации, являются достаточно обоснованными и достоверными. Основные результаты и положения диссертации были доложены и обсуждены на Научно-практической конференции «Абрикосовские чтения» 20 мая 2023 года, в рамках которого доклад был награжден первым местом, а также на заседаниях института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Апробация работы проведена на расширенном заседании института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 30.10.2024 года.

Личный вклад автора

Автором сформированы цели и задачи исследования, выбраны репрезентативные случаи для проведения исследования. Самостоятельно проведено полное посмертное патологоанатомическое исследование трупов пациентов, умерших от COVID-19 на базе ГБУЗ «ММКЦ «Коммунарка» ДЗМ», которое включало в себя изучение медицинской документации умерших, вскрытие,

вырезку секционного влажного архива, забор материала, исследование микропрепаратов, написание протокола вскрытия и гистологического исследования, формулировку предварительного и заключительного патологоанатомических диагнозов, определение непосредственной причины смерти и дефектов оказания медицинской помощи, сопоставление заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов. Автором самостоятельно закуплены реактивы и проведена иммуногистохимическая реакция. Все микропрепараты отсканированы гистосканером с созданием цифровой базы материалов диссертации. Автором проанализированы все микропрепараты, проведен количественный и качественный анализ исследуемых клеток, сформирована база данных с результатами в формате таблицы Excel. Автором были сформированы выводы исследования.

Во всех публикациях автор принимал непосредственное участие в планировании исследования, написании текста, оформлении рисунков и таблиц, формированием выводов и связью с редакционной коллегией.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном 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; 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 1 иная публикация, 1 публикация в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждений результатов, заключения,

выводов, практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 46 рисунками, 15 таблицами, 1 таблицей в приложении. Список литературы содержит 109 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология и патогенез поражения легких при COVID-19

Актуальность проблемы поражения легких при COVID-19 обусловлена тем, что вирус продолжает циркулировать в популяции, оказывая серьезное воздействие на экономику и здравоохранение всего мира, несмотря на официальное окончание пандемии. На момент 14.04.2024 количество зарегистрированных случаев инфицирования вирусом SARS-CoV-2 по всему миру составило более 775 миллионов, из которых более 7 миллионов случаев закончились летальным исходом (процент летальности - 0,9%).

Коронавирусы (CoV) — это оболочечные РНК-вирусы, принадлежащие к семейству Coronaviridae порядка Nidovirales. Они представляют собой разнообразную группу вирусов с одноцепочечной РНК с положительной оболочкой (+РНК), имеющих широкое распространение среди людей и животных. Название вируса следует из его внешнего вида, напоминающего солнечную корону. В состав коронавируса входит молекула РНК, а также 4 основных белка: S – спайковый, E – оболочечный, M – мембранный и N – нуклеокапсидный [11]. Вирусы поражают респираторный тракт, нервную систему, желудочно-кишечный тракт, включая печень [29]. Для человека являются эндемичными четыре коронавируса (CoV-229E, CoV-OC43, CoV-NL63 и CoV-HKU1), обычно вызывающие легкие респираторные заболевания у здоровых людей [30]. До 2002 года считалось, что коронавирусы специфичны только для животных, однако позже было показано, что они могут вызывать острые респираторные заболевания у людей [31]. За последние два десятилетия появились три зоонозных коронавируса, происходящих от летучих мышей, которые вызвали тяжелые респираторные заболевания в человеческой популяции: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) [32,33], коронавирус

ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [34], и, совсем недавно, пандемический коронавирус, названный коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) [35,36]. Каждый из коронавирусов может привести к тяжелому поражению респираторного тракта, однако, их вирулентность и летальность различаются. Например, во время эпидемии SARS-CoV было выявлено 8096 случаев заражения, из которых 774 случая закончились летально (процент летальности – 9,6%). Клиническая картина у пациентов проявлялась одышкой, кашлем, болями в грудной клетке, являющимися проявлениями острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Во время эпидемии MERS-CoV было выявлено 2502 случая заражения, из которых 861 закончились летально (процент летальности – 34,4%). Ведущие симптомы были схожими: лихорадка, кашель и одышка. У заболевших также развивалась интерстициальная пневмония.

3-им коронавирусом является SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 - бета-коронавирус, представляет собой плеоморфный, оболочечный РНК вирус с одной положительной цепочкой, размер вириона которого составляет примерно 80–120 нм в наибольшем измерении [12,37,38]. Вирус был впервые обнаружен в бронхоальвеолярном лаваже, взятом у групп пациентов с пневмонией неизвестной этиологии в городе Ухань в декабре 2019 года [12,39,40].

Течение пандемии COVID-19 сопровождалось характерными для респираторных вирусных инфекций волнами, с периодичными, резкими всплесками заболеваемости. Даты начала и конца волн субъективны, официально не зарегистрированы и отличаются в зависимости от исследуемой территории. В Российской Федерации 1 волна заболеваемости началась в марте и закончилась в августе 2020 г., 2 волна - в период с октября 2020 г. по май 2021 г., 3 волна - с сентября по январь 2022 г. С каждой новой волной течение заболевания отличалось от предыдущей по нескольким параметрам: скорость распространения, вирулентность вируса и тяжесть поражения восприимчивого организма [41]. Изменчивость течения болезни можно объяснить как появлением новых вариантов

микроорганизма, так и совершенствованием медицинской помощи, которое приводило к изменению удельного веса морфологических вариантов поражения органов. В течение пандемии COVID-19 в популяции человека циркулировали различные варианты SARS-CoV-2, самые важные из которых именовались греческими буквами. Самыми известными вариантами являются Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон, последний встречается в популяции до сих пор.

Распространение вируса SARS-CoV-2 происходит преимущественно воздушно-капельным путем при тесном контакте с больным человеком, в том числе и от бессимптомных носителей [3–5]. Наиболее высокая вирусная нагрузка наблюдается непосредственно перед появлением симптомов в течение первых 5–7 суток заболевания [42]. Средний инкубационный период SARS-CoV-2 составляет 5,1 день, а у большинства пациентов симптомы развиваются в течение 11,5 дней после заражения [43]. Вирус может персистировать на различных поверхностях, что способствует контактному механизму передачи. Существуют работы, показывающие наличие РНК вируса в плазме крови и кале, что отражает возможность передачи инфекции с молоком матери, а также гемоконтактного и фекально-орального механизмов, были описаны единичные случаи вертикальной передачи вируса [6]. Основными входными воротами для вируса являются эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника. По мере появления научных исследований становится все более очевидным, что COVID-19 включает в себя не только быстрые респираторные и желудочно-кишечные заболевания, но также может иметь долгосрочные последствия, такие как воспаление миокарда [44].

Жизненный цикл SARS-CoV-2 состоит из нескольких основных этапов: прикрепление и внедрение в клетку, транскрипция вирусной репликазы, геномная транскрипция и репликация, трансляция структурных белков, сборка с высвобождением вириона [45]. Попадая на эпителий верхних дыхательных путей, вирус SARS-CoV-2 связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ-2, ACE-2) с помощью поверхностного S-белка [7,8], что позволяет вирусу

проникать внутрь клетки с помощью различных протеаз. ACE2 расположен на поверхности мембран клеток многих органов и тканей, таких как слизистая оболочка носа, бронхов, легкие, сосуды, органы желудочно-кишечного тракта, сердце, почки, мочевой пузырь и нервная система [9,10]. Более ранние исследования показали, что SARS-CoV имеет те же рецепторы (АПФ2) проникновения в клетку, что и SARS-CoV-2, однако аффинитет последнего оказался выше [38,46].

Отдельные работы указывают на наличие альтернативного пути проникновения коронавирусов в клетку, который осуществляется при помощи взаимодействия S-протеина вируса с CD147 на поверхности клеток. CD147 широко распространен во всем человеческом организме, а при некоторых заболеваниях (например при сахарном диабете и бронхиальной астме) его экспрессия увеличена, что объясняет патогенез обострений данных заболеваний при COVID-19 [11].

В других работах было показано, что еще одним механизмом внутриклеточного внедрения коронавирусов (в частности MERS-CoV) является взаимодействие S-протеина коронавирусов с дипептидил пептидазой 4 (ДПП4) клетки-мишени, однако, полиморфизм ДПП4 негативно влияет на возможность внедрения вируса [47,48].

Другие исследования утверждают, что рецептор тирозин-протеинкиназы UFO (AXL) может является входными воротами для внедрения вируса внутрь клетки ввиду специфического взаимодействия с N-концевым доменом SARS-CoV-2. Ученые показали, что избыточная экспрессия AXL в клетках HEK293T способствует проникновению SARS-CoV-2 так же эффективно, как и избыточная экспрессия ACE2, в то время как отключение AXL значительно снижает инфекцию SARS-CoV-2 в легочных клетках H1299 и в эпителиальных клетках легких человека. Уровень экспрессии AXL коррелирует с уровнем SARS-CoV-2 в клетках жидкости бронхоальвеолярного лаважа от пациентов с COVID-19. AXL является еще одним потенциальных механизмом интрацеллюлярного внедрения SARS-CoV-2 и может играть важную роль в распространении вируса по дыхательной

системе человека. АХЛ является потенциальной целью для будущих стратегий клинического вмешательства [49].

После проникновения в клетку происходит транскрипция вирусной репликазы и генома вируса. Исследования показали, что процесс транскрипции сложен и включает многочисленные прерывистые события, после чего происходит трансляция вирусных белков, сборка вириона и их выведение из клетки [46,50]. Сборка вируса осуществляется в промежуточном компартменте между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи (ERGIC), где вирус собирается в пузырьки и выводится из клетки. Данные пузырьки входят в более широкое понятие - внеклеточные везикулы – один из малоизученных механизмов клеточной коммуникации, что позволяет рассматривать их как важное звено в патогенезе COVID-19.

1.2. Роль внеклеточных везикул в поражении легких при COVID-19

Внеклеточные везикулы – окруженные бислойной липидной мембраной структуры, диаметр которых составляет 20-1000 нм. ВКВ синтезируются всеми типами клеток эукариот, бактерий и архей [20,21]. ВКВ включают несколько отличающихся по структуре, составу и механизму синтеза подвиды: экзосомы, эктосомы, микровезикулы, апоптозные тельца, онкосомы и тд. Классификация ВКВ на сегодняшний день затруднительна ввиду схожих критериев дифференцировки и отличается в зависимости от используемого источника литературы [21,22,23].

Ранее внеклеточные везикулы рассматривались как "мусорные" частицы клеток организма, однако последующие исследования раскрыли широкий спектр процессов, которые они осуществляют, основной - межклеточные коммуникации. ВКВ оказывают влияние на судьбу клеток, их морфологию и функцию [22].

Содержимое внеклеточных везикул может быть представлено белками,

углеводами, липидами, ДНК, микроРНК, мРНК, не кодирующими РНК и другими молекулами. Кроме того, в везикулах могут содержаться различные цитокины, такие как ИЛ-1, TNF α и другие, которые регулируют различные процессы в организме. Было показано, что эти вещества, находясь в везикулах, обладают более высокой активностью [21].

На сегодняшний день исследовано несколько путей синтеза и секреции ВКВ. Одним из таковых является пузырьковидное выпячивание мембраны, которое отщепляется с помощью белкового комплекса, необходимого для эндосомальной сортировки и транспорта (Endosomal Sorting Complex Required for Transport – ESCRT). Этот механизм не является специфичным, он встречается во многих типах клеток эукариот. Может происходить выпячивание как мембраны клеток, так и интрацитоплазматических мультивезикулярных телец, которые являются своего рода внутриклеточной «фабрикой» по сборке внеклеточных везикул. Этот механизм регулирует размер везикулы, а значит их состав и функциональную роль [21]. Важную функцию в выпячивании мембраны и формировании везикул выполняют белки тетраспанины (CD81, CD63, CD9), встречающиеся преимущественно в составе экзосом и других внеклеточных везикул, и которые можно определять с помощью иммуногистохимического исследования [19].

Проникновение ВКВ в клетку-мишень зависит от типа клеток и их фагоцитирующей способности. Описаны 3 основных механизма взаимодействия везикул с клеткой-мишенью: рецептор-лиганд ассоциированное взаимодействие, прямое внедрение и интернализация. В случае рецептор-лиганд ассоциированного взаимодействия происходит связывание на поверхности клетками с лектинами, интегринами, тетраспанинами и другими лигандами с дальнейшим запуском различных сигнальных путей. При прямом слиянии ВКВ непосредственно сливаются с плазматической мембраной клеток-мишеней, таким образом, содержимое везикул попадает напрямую в цитоплазму. Третий механизм осуществляется благодаря интернализации везикулы в клетку, реализующейся через клатрин-зависимый кавеолин-зависимый фагоцитоз. Учитывая, что ВКВ

отличаются по размерам и функциям, а способность к фагоцитозу у клеток различная, до сих пор не совсем понятно, какой из механизмов внедрения является доминирующим [21].

ВКВ являются важными структурами, с помощью которых осуществляются межклеточные взаимодействия практически во всех органах и системах организма, тем самым происходит регуляция широкого спектра физиологических процессов, таких как гемостаз, поддержание артериального давления и др [21]. В настоящее время появляется все больше исследований, предполагающих непосредственное участие внеклеточных везикул в развитии многих патологических процессов, включая COVID-19 [22,28].

ВКВ принимают непосредственное участие в развитии вирусных заболеваний. Было показано, что при вирусных инфекциях ВКВ могут содержать частицы вирусов, например вирус гепатита С или ВИЧ [22], а в оболочке определяются рецепторы мембран клеток-хозяев (например МНС, ACE2, CD9, CD63 и многие другие) [51], которые могут способствовать распространению вирусных частиц [22]. Предполагаемая роль везикул в патогенезе различных инфекций подтверждается исследованием, в котором на некоторых типах клеток (HEK293, SH-SY6Y, HeLa, B cells and T lymphocytes) была увеличена экспрессия тетраспанина CD9, участвующего в продукции ВКВ, что привело к ускорению и усилению эффективности трансдукции лентивирусов в клетках-мишеней [52]. После размножения вируса в клетке, синтезированные фрагменты вируса и ACE2 рецепторы с поверхности мембраны клетки-хозяина упаковываются в мультивезикулярные тельца с дальнейшим распространением в окружающие клетки и в кровь [53]. Считается, что этот механизм является ключевым в распространении вирусных частиц, а некоторые авторы дали этому феномену название – «гипотеза троянской экзосомы» [54]. Также было показано, что вирусы могут «перехватывать» пути сборки везикул и использовать их для завершения своего цикла и диссеминации в макроорганизме [55,56]. Помимо распространения в организме ВКВ делают клетки более восприимчивыми к инфекциям путем

модуляции экспрессии рецепторов [57,58], способствуют стабильности и репликации вируса через белки хозяина [59] и активируют латентные вирусы с помощью неинфицированных клеток [60].

Предполагается, что еще одной важной ролью ВКВ может являться регуляция механизмов иммунной системы как в сторону стимуляции, так и в сторону угнетения [22], что может способствовать развитию «цитокинового шторма» и приводить к утяжелению течения болезни. Одно исследование показывает, что у пациентов с тяжелыми формами COVID-19 количество выявленных ВКВ в плазме крови выше, чем у пациентов с более легким течением [61]. Однако, до сих пор нет комплексных морфологических исследований, посвященных роли ВКВ в патогенезе COVID-19, так как визуализация везикул затруднительна в связи с их маленьким размером. Учитывая наличие связи между тяжестью состояния пациентов и количеством внеклеточных везикул, необходимо более глубокое изучение патогенетической роли ВКВ при COVID-19, особенно в развитии определенных морфологических форм поражения легких.

На данный момент зарубежными и отечественными авторами опубликовано большое количество работ, в которых приводятся данные о механизмах поражения легких COVID-19. Показано, что при COVID-19 в легких развиваются различные патологические процессы, такие как диффузное альвеолярное повреждение (ДАП), альвеолит, сопровождающийся васкулитами веточек легочной артерии мелкого и среднего калибра, вирусно-бактериальная пневмония, распространенная коагулопатия и интерстициальный фиброз [10]. Ключевым вариантом поражения легких является диффузное альвеолярное повреждение, которое сопровождается развитием дыхательной недостаточности различной степени тяжести с возможным летальным исходом.

Развитие ДАП связано с рядом патофизиологических механизмов, происходящих одновременно. Антигены микроорганизмов (в частности Spike-протеин SARS-CoV-2) или эндогенные молекулы, связанные с повреждением клеток (danger- or pathogen-associated molecular patterns), секретирующиеся с

помощью экзосом, связываются с Toll-подобными рецепторами на мембранах пневмоцитов и альвеолярных макрофагов, активируют врожденную иммунную систему и приводят к повышению проницаемости сосудов и активации нейтрофилов [62,63,64,65]. Пока геном вируса реплицируется, иммунная система хозяина активируется, вызывая привлечение воспалительных клеток с последующей выработкой провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также созревание дендритных клеток с миграцией в ткань легких макрофагов [63,66]. Однако из-за непрерывной и быстрой репликации вирусного генома иммунная система постоянно активируется, что приводит к неконтролируемой и обостренной реакции, смертельной для клеток-хозяев [67]. Повреждение альвеолоцитов в свою очередь приводит к повышению продукции ими экзосом и микровезикул с дальнейшей активацией макрофагов, синтезирующих провоспалительные вещества, такие как воспалительный протеин макрофагов 2 (MIP-2), привлекающих и активирующих в ткани легких нейтрофилы. Нейтрофилы являются авангардом врожденного иммунитета, активация которых на ранних этапах ДАП приводит к повреждению эпителиоцитов, повышению проницаемости и отеку. На начальных этапах ДАП лейкоциты и макрофаги действуют содружественно, запуская каскад провоспалительных механизмов, однако, было показано, что в дальнейшем нейтрофилы с помощью секреции везикул могут осуществлять обратный, противовоспалительный эффект, и усиливать регенерацию тканей [68].

Чрезмерная дегрануляция нейтрофилов вызывает необратимое повреждение пневмоцитов и эндотелиальных клеток, разрушая альвеолярно-капиллярный барьер [63]. Помимо этих естественных механизмов, некоторые авторы связывают патогенез ДАП с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), то есть с высвобождением внутриклеточного содержимого нейтрофилов, такого как ДНК и белки, во внеклеточное пространство для захвата патогенов. В одной из работ было показано, что в образцах сыворотки COVID-19 были выявлены более высокие уровни маркеров NET: комплексов миелопероксидазы-ДНК и

цитруллинированного гистона H3 [69,70]. Избыточная продукция NET приводит к повреждению эндотелиоцитов, способствующему трансмиграции белков крови, интерстициальному и альвеолярному отеку, проникновению в просветы альвеол макрофагов и нейтрофилов, усиливая воспалительный ответ.

Привлеченные в альвеолярное пространство моноциты секретируют провоспалительные цитокины и индуцируют апоптоз пневмоцитов посредством высвобождения интерферона (ИФН), зависящего от альфа-факторов некроза опухоли (TNF- α), активируя рецепторы гибели клеток [63]. Кроме того, привлеченные макрофаги высвобождают хемокины и другие цитокины, ответственные за увеличение проницаемости капилляров и, как следствие, миграцию в очаг повреждения нейтрофилов [70]. Более высокое количество провоспалительных макрофагов и нейтрофилов наблюдалось в жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов с COVID-19 с тяжелым течением по сравнению с пациентами с легким течением. Также были показаны более высокие уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-6, IL-8, CCL) в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у пациентов с тяжелым течением COVID-19 по сравнению с пациентами с легким течением [71]. Таким образом, становится очевидным наличие порочного круга, включающего в себя взаимодействие пневмоцитов, макрофагов и нейтрофилов в патогенезе ДАП, реализуемое внеклеточными везикулами.

Еще одним из важнейших механизмов поражения легких является расстройство системы коагуляции, которое является особым вариантом ДВС-синдрома и носит название COVID-ассоциированная коагулопатия. Для понимания механизмов, лежащих в основе коагулопатии и сосудистой дисфункции, необходимо отметить обильную экспрессию рецептора ACE2 на поверхности эндотелиальных клеток, что опосредует тропизм вируса к кровеносным сосудам [72]. Среди своих физиологических функций эндотелий сосудов является первым ответчиком защиты хозяина [73], и, как только гомеостаз нарушается инфекцией SARS-CoV-2, эндотелиальные клетки подвергаются процессу перехода из

состояния покоя в активированное состояние [72]. Этот процесс в основном управляется циркулирующими воспалительными молекулами, такими как интерлейкин-1 (IL-1), IL-6, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), PAMP и молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP), которые усиливают локальное воспаление [72,74]. Следовательно, привлечение медиаторов врожденной иммунной системы способствует тромбозу за счет образования вышеописанных нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) [72].

Помимо положительной регуляции экспрессии провоспалительных генов, активированные эндотелиальные клетки увеличивают экспрессию ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и тканевого фактора (TF, также известного как CD142), которые являются двумя компонентами, способствующими тромбообразованию [72,75]. Клиническое исследование групп пациентов с COVID-19 показало, что циркулирующие внеклеточные везикулы экспрессируют активные молекулы CD142, которые тесно связаны с повышенной прокоагулянтной активностью, наблюдаемой при течении COVID-19 [75]. Эти данные подтверждают выводы Holnthoner и др., которые в 2017 году продемонстрировали взаимосвязь между ВКВ эндотелиального происхождения, несущими CD142, и их протромботическими эффектами [75]. TNF- α является ключевым элементом молекулярного механизма, участвующего в этой сосудистой дисфункции [72,74]. TNF- α обычно обнаруживается в высоких концентрациях в периферической крови пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами [76]. Помимо своей провоспалительной активности, TNF- α отвечает за запуск высвобождения ВКВ эндотелиальными клетками и коррелирует с экспрессией CD142 в везикулах [75].

Помимо эндотелиальных клеток, еще одними важными клетками-продуцентами ВКВ при COVID-19 являются тромбоциты. Выделяемые ими ВКВ так же влияют на функциональность сосудистой системы [77]. Сообщалось, что во время пандемии COVID-19 повышенная реактивность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами способствуют образованию агрегатов [78,79]. Кроме того, сообщалось о значительном росте количества циркулирующих

тромбоцитарных ВКВ [80], которые составляли основной источник CD142 в плазме крови. Учитывая прямую связь между циркулирующими тромбоцитарными ВКВ и тяжестью заболевания, везикулы можно рассматривать в качестве полезных биомаркеров для прогнозирования результатов лечения пациентов.

Другим важным вариантом поражения легких является развитие лимфоцитарного альвеолита. В одном исследовании было показано, что у большинства пациентов с инфекцией SARS-CoV-2 в начале проведения искусственной вентиляции легких альвеолярное пространство обогащено альвеолярными макрофагами и Т-клетками без нейтрофильной инфильтрации. Массовая и одноклеточная транскриптомная пролиферация позволяет предположить, что SARS-CoV-2 инфицирует альвеолярные макрофаги, которые реагируют путем рекрутирования Т-клеток. Эти Т-клетки высвобождают гамма-интерферон, чтобы вызвать секрецию воспалительных цитокинов из альвеолярных макрофагов и дополнительно способствовать рекрутированию Т-клеток. Исследователи показывают, что SARS-CoV-2 вызывает медленно разворачивающийся, ограниченный в пространстве альвеолит, при котором альвеолярные макрофаги, несущие транскрипты SARS-CoV-2 и Т-клетки, образуют цикл положительной обратной связи, которая стимулирует прогрессирующее альвеолярное воспаление [81]. Данная форма поражения легких находит свое отражение и в нашем исследовании.

Развитие вирусно-бактериальной пневмонии широко описано в литературе. Данная форма поражения легких является вторичной по отношению к ДАП и альвеолиту. Патогенез данного осложнения связан со вторичным присоединением бактериальной флоры как внутри, так и вне условий стационара, на фоне возможного снижения иммунокомпетентности.

С учетом результатов вышеописанных исследований, которые посвящены изучению патогенеза коронавирусной инфекции, становится понятна многогранность поражения ткани легких и всего макроорганизма в целом с развитием большого количества порочных кругов, связующим звеном которых

являются внеклеточные везикулы.

1.3. Клиническая картина поражения легких

Люди всех возрастов восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2, а средний возраст заражения составляет около 50 лет, однако, клинические проявления различаются в зависимости от возраста. В целом, у пожилых мужчин (>60 лет) с сопутствующими заболеваниями чаще развиваются тяжелые респираторные заболевания, требующие госпитализации, тогда как у большинства молодых людей и детей наблюдаются только легкие заболевания [82].

Клинический спектр поражения легких при COVID-19 варьируется от бессимптомных или малосимптомных до тяжелых форм, характеризующихся острой дыхательной недостаточностью, требующей искусственной вентиляции легких (ИВЛ), септическим шоком и полиорганной недостаточностью. По оценкам, от 17,9% до 33,3% инфицированных пациентов останутся бессимптомными [83,84].

При COVID-19 происходит поражение большого количества органов и систем: респираторный тракт, включая дыхательные пути и паренхимы легких, желудочно-кишечный тракт, мочеполовую систему, сердце, эндокринную систему, включая надпочечники, поджелудочную железу, центральную нервную систему (ЦНС), приводя к развитию соответствующей симптоматики поражения вышеуказанных органов [85,86]. Кроме того, отдельные работы показывают тропизм вируса к тестикулярной ткани, что может способствовать фертильной дисфункции [87]. Возможность поражения вирусом также была выявлена в диафрагме, что может привести к фиброзу диафрагмы и миопатии, что будет способствовать утяжелению дыхательной недостаточности [88]. Однако, описания морфологических особенностей на данный момент отсутствуют [89].

Частыми симптомами инфекции являются лихорадка, сухой кашель, одышка. Менее часто встречаются слабость, аносмия, утомляемость, тяжесть в грудной

клетке, боль в горле, диарея, конъюнктивит, головная боль [90].

Несмотря на широкое разнообразие органов-мишеней, вирус SARS-CoV-2 поражает преимущественно респираторную систему, а основным диагностическим методом поражения легких является компьютерная томография (КТ). Ранняя диагностика имеет решающее значение для контроля распространения COVID-19 и инициации терапии. У пациентов с COVID-19 на начальной КТ наблюдались типичные особенности, включая двусторонние полисегментарные затемнения по типу «матового стекла» с периферическим или базальным распределением [82], а также консолидированные помутнения легких. По данным Zhao et al., помимо этих особенностей, другими характеристиками компьютерной томографии SARS-CoV-2 являются расширение сосудов в очаге поражения и тракционные бронхоэктазы [91]. Степень выраженности «матового стекла» в клинической практике было распределено на условные значения, которые градируются от КТ-1 до КТ-4 в зависимости от распространенности поражения паренхимы легких.

У некоторых пациентов клинические симптомы сохраняются спустя длительное время после инфицирования. Данное состояние не имеет четкого определения, и, в связи с этим, его диагностика затруднительна. У самого синдрома есть довольно большое количество синонимов: постковидный синдром, long-term COVID, chronic-COVID, post COVID, long-haul COVID и тд. Диагностическим критерием на данный момент считается сохранение симптомов свыше 3 недель (long-COVID) и свыше 12 недель (chronic COVID). Распространенность данного явления еще не известна, но предварительные исследования Британского отделения Национального Центра Статистики показали, что примерно у каждого 5-ого пациента с положительным тестом на COVID-19 симптомы сохранялись дольше 5 недель, а у каждого 10-ого в течение 12 недель. Sudre с соав. показал, что более 12 недель клиническая картина сохранялась лишь у 2,3% больных, причем самыми распространенными симптомами являлись усталость и преходящие головные боли, потеря запахов и одышка [92]. Патогенез этого синдрома еще не изучен, однако, существует несколько теорий. Одной из таковых является прямое

цитопатическое действие вируса на органы и ткани, такие как центральная нервная система. Нейротропность вируса способствует повреждению различных структур нервной системы, в частности блуждающего нерва, приводя к разбалансировке парасимпатической и симпатической нервных систем с активацией последней. В результате этого развиваются классические симптомы гиперактивности симпатической нервной системы в виде тахикардии, диареи, тревожных расстройств и проблем со сном [93]. Другой теорией является длительная персистенция вируса, например в ткани тонкой кишки и в нервной системе. Еще одна теория говорит об участии в развитии post COVID аутоиммунных расстройств в связи с повреждением эндотелия и формирования антифосфолипидного синдрома. Клиническими симптомами long-COVID и chronic-COVID являются усталость, одышка, потеря запахов, субфебрилитет, когнитивная дисфункция, различные проявления поражения автономной нервной системы и множество других симптомов. У некоторых пациентов типичные симптомы продолжаются более 100 дней, что резко снижает качество жизни пациентов и может привести к пожизненной инвалидизации. В настоящее время не существует проверенных эффективных методов лечения [94].

Несмотря на широкое разнообразие органов-мишеней, вирус SARS-CoV-2 поражает преимущественно респираторную систему, поэтому особое внимание нужно заострить на морфологии и механизмах повреждения легких при COVID-19.

1.4. Морфологические характеристики поражения легких

На данный момент зарубежными и отечественными авторами опубликовано большое количество работ, в которых приводятся данные о морфологических особенностях поражения легких COVID-19. Показано, что при COVID-19 в легких развиваются различные патологические процессы, такие как диффузное альвеолярное повреждение (ДАП), сопровождающееся васкулитами веточек

легочной артерии мелкого и среднего калибра, вирусно-бактериальная пневмония, распространенная коагулопатия с тромбозами и тромбоэмболией легочной артерии, интерстициальный фиброз, аденоматоз и дисрегенераторные изменения легочного эпителия, которые могут быть взаимосвязаны и являться формами-фазами патологии легких при COVID-19 [10].

При диффузном альвеолярном повреждении легкие имеют характерные макроскопические признаки: они плотные, мало- или безвоздушные, с лаковым видом, их поверхность тёмно-красного (вишневого) цвета, и при надавливании с поверхностей разрезов выделяется темно-красная жидкость. Легкие, как правило, полностью заполняют грудную клетку. В пролиферативную фазу ДАП характеризуются серовато-белым цветом, очень плотной консистенцией и на разрезе напоминают войлок. При проведении водной пробы фрагменты легкого тонут в воде.

При микроскопическом исследовании в ранней экссудативной фазе ДАП обнаруживаются внутриальвеолярный отёк, гиалиновые мембраны, выстилающие просветы спадающихся альвеол, отмечаются участки десквамации пневмоцитов 1 типа. В окружающем интерстиции лейкоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок. Помимо этого, в экссудативную фазу наблюдается полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок и ветвей легочных артерий и вен, часто с наличием сладжей эритроцитов, фибриновых или организующихся тромбов и очагов периваскулярных кровоизлияний.

В пролиферативную фазу гиалиновые мембраны элиминируются, либо прорастают фибробластами и коллагеновыми волокнами. Отмечаются участки пролиферации пневмоцитов 2 типа, называемыми очагами аденоматоза, ввиду внешнего сходства с железистоподобными структурами. Просветы альвеол выполнены макрофагами, слущенными пневмоцитами, на отдельных участках могут отмечаться крупные фокусы плоскоклеточной метаплазии пневмоцитов 2 типа с признаками реактивной атипии в виде анизонуклеоза и гиперхромии укрупненных ядер. В окружающей строме интерстициальная и

внутриальвеолярная пролиферация миофибробластов, зоны слабовыраженной лимфоцитарной инфильтрации.

В дальнейшем наступает фаза организации со снижением интенсивности воспалительного инфильтрата, организацией экссудата и миофибробластическими изменениями, которые могут завершиться даже формированием «сотового» легкого [63,95].

Помимо ДАП практически у всех пациентов с COVID-19 развивается коагулопатия, сопровождающаяся системным тромбозом, в частности тромбозом ветвей легочной артерий, что приводит к развитию геморрагических инфарктов легких, имеющих соответствующую морфологическую картину. Макроскопически в висцеральных листках плевры отмечаются мелкие петехиальные кровоизлияния, развивающиеся в рамках ДВС-синдрома.

Очень часто наблюдаются внутриальвеолярные скопления эритроцитов, однако выраженность их в разных случаях и в различных участках легкого неодинакова — от небольших скоплений до практически полного заполнения просвета альвеол эритроцитами в зонах геморрагических инфарктов. Эти изменения можно расценивать как результат эндотелиопатии с резким повышением сосудистой проницаемости. На отдельных участках в легких, как следствие коагулопатии, отмечались множественные кровоизлияния с деструкцией ткани легкого. В капиллярах межальвеолярных перегородок нередко встречаются мегакарициты. В просветах альвеол наблюдаются скопления лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов, единичных нейтрофилов, однако, выраженность клеточной реакции различается от случая к случаю. Довольна значима мононуклеарная инфильтрация, представленная различными популяциями лимфоцитов. Наибольшее количество CD3+ Т-лимфоцитов, среди которых наиболее часто встречались супрессоры CD2+, CD5+, CD8+. В-лимфоциты CD20+ образовывали небольшие перибронхиальные скопления, вне которых практически не определялись. CD80+ были сравнительно немногочисленными, натуральные киллеры (CD57+) практически полностью

отсутствовали, наблюдались лишь единичные клетки в препарате. В эту же фазу заболевания в просветах альвеол у части умерших обнаружены макрофаги, содержащие в цитоплазме фрагменты клеток.

В стенках и просветах альвеол обнаруживали альвеолоциты с измененной формой клеток (крупные, местами отростчатые клетки), с укрупненными ядрами с грубозернистым хроматином и отчетливыми ядрышками, иногда вокруг ядра присутствовало гало, а в цитоплазме клеток были округлые включения. На отдельных участках могут встречаться многоядерные клетки. Такие изменения следует трактовать как цитопатический эффект, что является косвенным подтверждением вирусного повреждения.

Значимых поражений трахеи при инфекции SARS-CoV-2 не наблюдается, на аутопсиях можно обнаружить лишь серозно-геморрагический трахеит, который может быть расценен как следствие ДВС-синдрома, либо как результат длительного механического воздействия при интубации пациентов. В случаях, когда COVID-19 присоединялся к другой тяжелой патологии, закономерно отмечается сочетание изменений, характерных для разных заболеваний. При присоединении бактериального компонента к вирусу SARS-CoV-2, макроскопически определяются признаки очаговой пневмонии в виде мелких округлых зернистых очажков, в центре которых расположены мелкие бронхи, заполненные гнойным экссудатом. Микроскопическая картина в данном случае соответствует классическим морфологическим проявлениям бактериальной пневмонии.

На поздних стадиях заболевания у пациентов нередко развивается интерстициальный фиброз вплоть до образования «сотого легкого» [10].

1.5. Резюме литературного обзора

Таким образом, опубликованные на сегодняшний день научные

исследования, посвященные изучению поражения легких при COVID-19 имеют разрозненный характер и не акцентируют внимание на клеточной локализации вируса и его белков, на значении активности внеклеточных везикул и их клеточной локализации, на межклеточных взаимодействиях при развитии различных вариантов поражения легких. В мировой литературе отсутствуют исследования, показывающие содружественную клеточную локализацию белков вируса и ВКВ. Остаются дискуссионными возможности и целесообразность определения локализации и персистенции белков вируса и ВКВ в рутинной патологоанатомической практике. Помимо этого, в мировой литературе отсутствуют исследования, показывающие роль ВКВ при всех возможных вариантах поражения легких.

В настоящем исследовании изучены все вышеописанные проблемы, показаны иммуногистохимические методики, позволяющие определять везикулы на парафиновых блоках. Определение ВКВ в повседневной рабочей практике позволит более точно прогнозировать течение COVID-19 и других заболеваний. Внеклеточные везикулы являются крайне перспективным методом не только для изучения, но и для использования в качестве воздействия на ключевые патогенетические звенья огромного количества заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клинико-anamнестический анализ и макроскопическое исследование

Исследование является проспективным, наблюдательным, нерандомизированным (Рисунок 1).

Вскрытия, забор материала, изготовление парафиновых блоков и микропрепаратов, а также оформление медицинской документации проводились на базе патологоанатомического отделения ГБУЗ «ММКЦ «Коммунарка» ДЗМ» (заведующий отделением – Авдалян А.М.), иммуногистохимическая реакция, анализ полученных результатов и написание научных публикаций проводились на базе института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет)» (директор института – Демура Т.А.).

Проведено 118 вскрытий умерших от COVID-19 с полным изучением историй болезни, включая подробный анализ анамнезов жизни и болезни. Вскрытия проводились в специально оборудованных инфекционных секционных залах с применением всех средств специальной (в том числе индивидуальной) защиты. Во время вскрытия в каждом случае проводилась верификация наличия вируса SARS-CoV-2 путем взятия мазка со слизистой оболочки полости носа с дальнейшим проведением ПЦР-реакции.

Вскрытия проводились по методу Шора. На вскрытиях забирались фрагменты из наиболее пораженных участков ткани легких в количестве не менее 5 фрагментов: по 1 фрагменту из каждой доли обоих легких. После вскрытий были сформулированы предварительные патологоанатомические диагнозы, определено наличие/отсутствие дефектов оказания медицинской помощи, а также установлены первоначальные и непосредственные причины смерти. В протоколе патологоанатомического вскрытия и в патологоанатомических диагнозах были

детально описаны макроскопические характеристики ткани легких, включающие в себя вариант поражения легких, объем поражения паренхимы легких, были сформулированы сочетанные, сопутствующие и фоновые заболевания, а также осложнения.

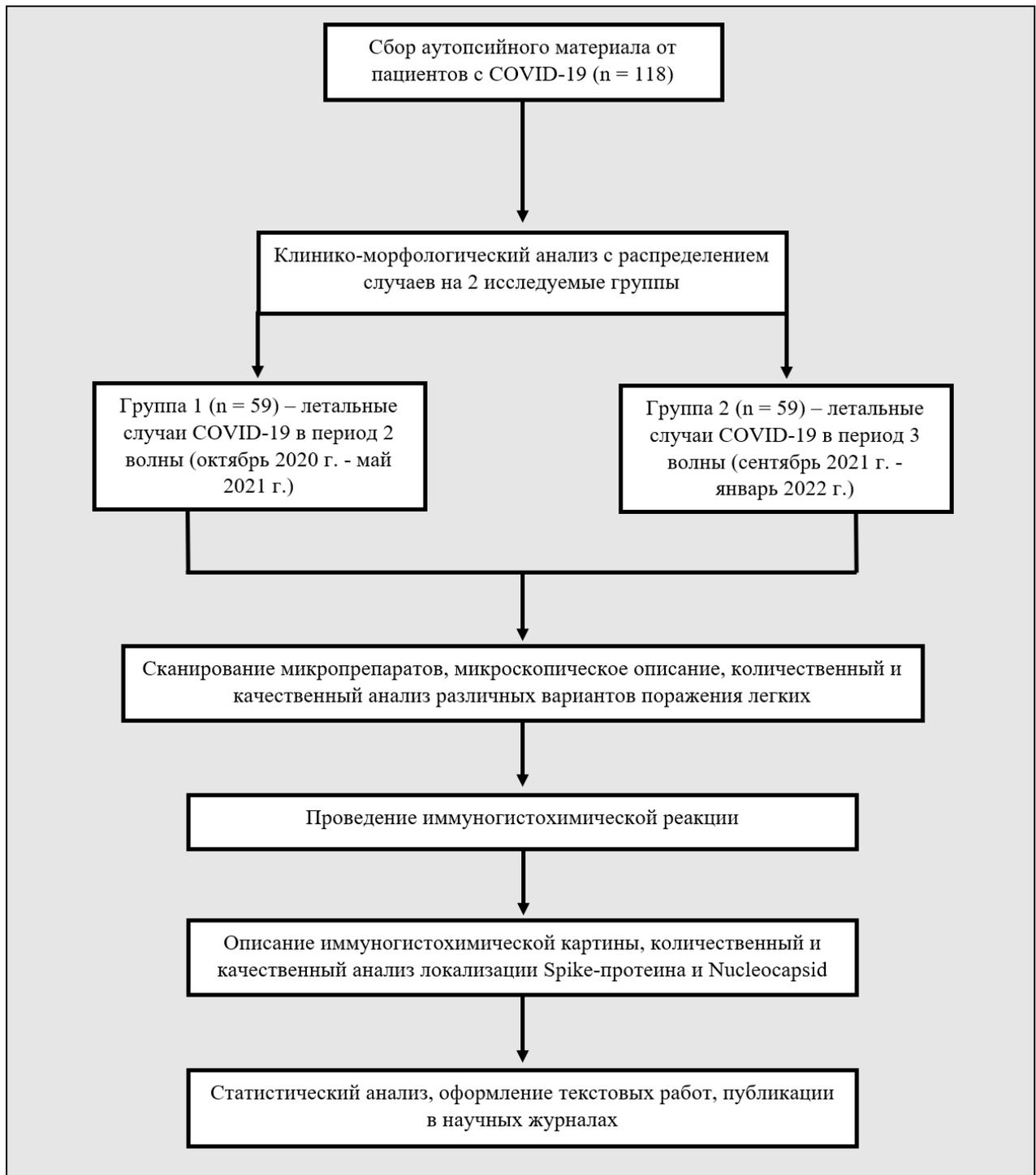


Рисунок 1 - Дизайн исследования

Взятые фрагменты фиксированы в буферном 10% растворе формалина в соотношении 1:10 (одна часть материала к 10 частям формалина) в течение 1 суток с дальнейшей гистологической проводкой по стандартизированным методикам и парафинизацией.

2.2. Микроскопическое исследование

Изготавливались серийные парафиновые срезы с окраской гематоксилином и эозином по стандартизированным методикам. Проанализированы гистологические препараты с использованием микроскопа Nikon Eclipse E200 с описанием микроскопической картины и внесением ее в протокол патологоанатомического вскрытия в программе ЕМИАС. При микроскопическом исследовании определялись и регистрировались различные патологические процессы, встречающиеся в ткани легких, среди которых основными были выделены ДАП в стадии экссудации, ДАП в стадии пролиферации, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), альвеолит, васкулит, интерстициальный фиброз. Сформулированы заключительные патологоанатомические диагнозы, клинико-анатомические эпикризы.

Были составлены 2 исследуемые группы в зависимости от периода смерти: 1 группа включает 59 случаев (50%), умерших во 2 волну; 2 группа - 59 случаев (50%), умерших в период 3 волны (Таблица 1). Критериями включения в каждую группу явились следующие параметры: коронавирусная инфекция – первоначальная причина смерти; наличие вируса SARS-CoV-2, подтвержденное прижизненным и/или посмертным ПЦР-исследованием мазка слизистой оболочки полости рта и/или носа; упоминание о поражении легких в заключительном патологоанатомическом диагнозе; полная стационарная медицинская документация.

Таблица 1 - Материалы и методы исследования

<p style="text-align: center;">Методы исследования</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Макроскопическое исследование • Микроскопическое исследование • Иммуногистохимическое исследование 	
<p style="text-align: center;">Критерии включения</p>	<ul style="list-style-type: none"> • коронавирусная инфекция – первоначальная причина смерти • наличие вируса SARS-CoV-2, подтвержденное прижизненным и/или посмертным ПЦР-исследованием мазка слизистой оболочки полости рта и/или носа • упоминание о поражении легких в заключительном патологоанатомическом диагнозе • полная стационарная медицинская документация 	
<p style="text-align: center;">Методы исследования</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Макроскопическое исследование • Микроскопическое исследование • Иммуногистохимическое исследование 	
<p style="text-align: center;">ИГХ (всего 32 случая, 27%, n=118)</p>	<p style="text-align: center;">13 случаев (22%)</p>	<p style="text-align: center;">19 случаев (32,2%)</p>

2.3. Иммуногистохимическое исследование

В 32 случаях (27%): была проведена иммуногистохимическая реакция с

использованием моноклональных антител к нуклеокапсиду, S-белку, белкам-тетраспанинам участвующим во внутриклеточной сборке экзосом (CD63). Основанием для отбора случая для ИГХ исследования являлось наличие определенного варианта поражения легких, выявленного при гистологическом исследовании. ИГХ реакция проводилась на депарафинированном материале в 13 случаях 2 волны и в 19 случаях 3 волны по стандартизированным методикам (Таблица 2).

В качестве первичных антител использовались следующие антитела: Anti-CD63 Rabbit pAb Antibody, производитель Servicebio (GB11620), разведение 1:500 по стандартным методикам, SARS-Cov-2 (COVID-19) Spike Polyclonal Rabbit Antibody, производитель GeneTex (cat. #GTX135356), разведение 1:500, а также SARS-Cov-2 (COVID-19) Nucleocapsid Polyclonal Rabbit Antibody, производитель GeneTex (cat. #GTX135357), разведение 1:500 по стандартным методикам. При проведении иммуногистохимической реакции в обязательном порядке были поставлены положительные и негативные внешние контроли.

Таблица 2 - Этапы иммуногистохимического исследования

<i>Этап</i>	<i>Характеристика этапа</i>	<i>Время (мин)</i>
Депарафинирование срезов	Выдержка в термостате (60°C).	30
	Проводка через батарею ксилолов (3 смены).	3x5
	Дегидратация в спиртах: 100% спирт (2 смены), 95% спирт (2 смены).	4x5
	Промывка в дистиллированной воде (2 смены)	2x5

Продолжение Таблицы 2

Демаскировка антигенов	Изготовление цитратного буфера (Trilogy Cell Marque, x100, pH = 6,0).	
	Нагревание цитратного буфера на водяной бане при температуре 98°C	10
	Помещение полилизиновых стёкол с депарафинированными срезами в цитратный буфер	
	Демаскировка антигенов на водяной бане при температуре 98°C	20
	Остывание стёкол при комнатной температуре	20
	Промывка стёкол в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer x20 (3 смены, разведение 1:19)	3x5
	Обвести срезы гидрофобным маркером	
Ингибирование эндогенной пероксидазы	Инкубирование срезов во влажной камере с ингибитором эндогенной пероксидазы (3% H ₂ O ₂ либо Peroxide Block)	2x3
	Промывка стёкол промывочным буфером PBC IHC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:19)	2x3
Экспозиция первичных антител	Изготовление сыворотки, разведенной согласно стандартному титру (растворитель - AntKMody Diluent: DXMmond, Tris 1000 мл до 10 %)	
	Инкубирование срезов с первичными антителами во влажной камере	30
	Промывка стёкол в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:19)	

Продолжение Таблицы 2

Экспозиция вторичных антител	Использование системы детекции Н-Гистофайн Симпл Стейн Макс ПО (Мульти)	
	Инкубирование срезов с системой детекции (вторичные антитела) во влажной камере	30
	Промывка стёкол в промывочном буфере PBC INC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:19)	
Реакция с диаминобензи- дином	Изготовление раствора диаминобензидина - 1 мл DAB Buffer : 1 капля диаминобензидина (из расчёта 100 мкл на 1 срез)	
	Инкубирование срезов во влажной камере	5
	Промывка срезов дистиллированной водой (2 смены)	2x5
	Помещение срезов в дистиллированную воду для предотвращения высыхания	
Окраска ядер и заключение	Окраска ядер 10% гематоксилином	
	Промывка в воде	
	Дегидратация в спиртах: 100% спирт (2 смены), 95% спирт (2 смены)	4x5
	Ксилол	5
	Накрытие срезов покровным стеклом со средой для заключения	

2.4. Морфометрический анализ

Все гистологические и ИГХ-микропрепараты были отсканированы с помощью гистосканера Leica Aperio AT2: препараты, окрашенные гематоксилином и эозином отсканированы на увеличении x20, препараты с проведенной

иммуногистохимической реакцией отсканированы на увеличении $\times 40$. Все отсканированные препараты проанализированы с применением количественной оценки окрашенных клеток в приложении QuPath, Aperio ImageScope $\times 64$.

При анализе микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, определены наиболее репрезентативные поля зрения с различными вариантами поражения легких: диффузным альвеолярным повреждением, лимфоцитарным альвеолитом, тромбоваскулитом, ДВС-синдромом, бактериальной пневмонией, интерстициальным фиброзом. В каждом микропрепарате при увеличении $\times 400$ был проведен количественный анализ встречающихся патологических изменений в расчете на 100 полей зрения. Результаты были зафиксированы в таблице Excel.

При анализе микропрепаратов с проведенной ИГХ реакцией в случайных полях зрения были выбраны не менее 150 макрофагов, 150 пневмоцитов II типа и 150 эндотелиоцитов. Определялись клетки, в цитоплазме которых определялось окрашивание антителами против белков ВКВ и белков вируса SARS-CoV-2 при различных патологических процессах. Производился подсчет клеток в % от их общего числа в выбранных полях зрения, определялась локализация вирусных белков, проводилось сравнение клеток-продуцентов ВКВ и клеточной локализации вирусных белков. Полученные результаты проанализированы статистически в виде расчёта коэффициента корреляции Пирсона, расчёта статистической значимости полученных результатов (*p-value*), интерпретации результатов с помощью шкалы Чеддока.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клинико-морфологический анализ

Было исследовано 118 летальных исходов COVID-19. В исследуемые группы были включены 65 женщин (55,1%), 53 мужчины (44,9%) (Рисунок 2). Средний возраст исследованных пациентов – 70,8 лет, медиана – 72 года (Рисунок 3).

В подавляющем большинстве случаев (49 случаев (83%) 2 волны и 47 случаев (79,6%) 3 волны) летальный исход наступил в период с 8 по 28 день (Рисунок 4). В единичных случаях (n=2, 1,7%) летальный исход наступал в первые дни заболевания, еще реже встречались затяжные формы заболевания, которые длились более 50 суток.

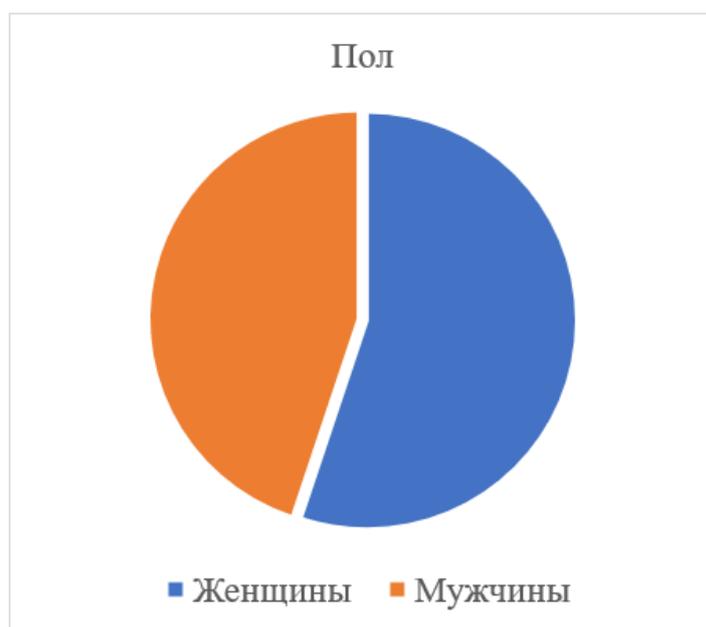


Рисунок 2 - Распределение исследуемых случаев по полу



Рисунок 3 – Распределение пациентов по возрасту

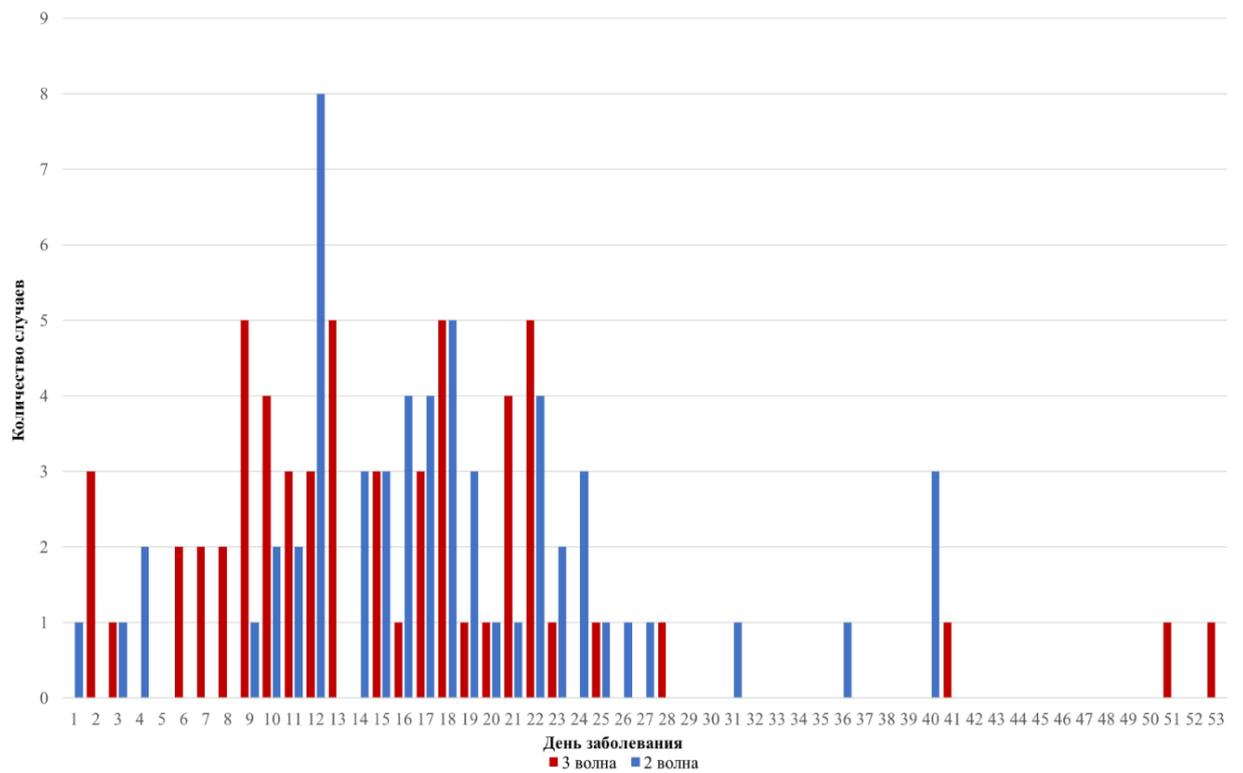


Рисунок 4 - На какой день заболевания наступил летальный исход во 2 и 3 волну

Самой распространенной (в 54,2% наблюдений) непосредственной причиной смерти во 2 волну явилось ДАП (клинически - острый респираторный дистресс-синдром, ОРДС) (Рисунок 5). 2 место по частоте занимает легочно-сердечная недостаточность (22%), 3 - септический шок (18,6%). В 3 волне самой частой непосредственной причиной смерти явился септический шок (45,7%), на 2 месте - ДАП (27,11%), на 3 месте - легочно-сердечная недостаточность (23,7%). Среди остальных смертельных осложнений также встречались, но существенно реже: отек головного мозга, гемотампонада сердца, тромбоэмболия легочных артерий и острая постгеморрагическая анемия.

Таким образом, самым опасным с точки зрения потенциального летального исхода период с 8 по 28 день заболевания, а самыми частыми причинами смерти – ДАП и сепсис.

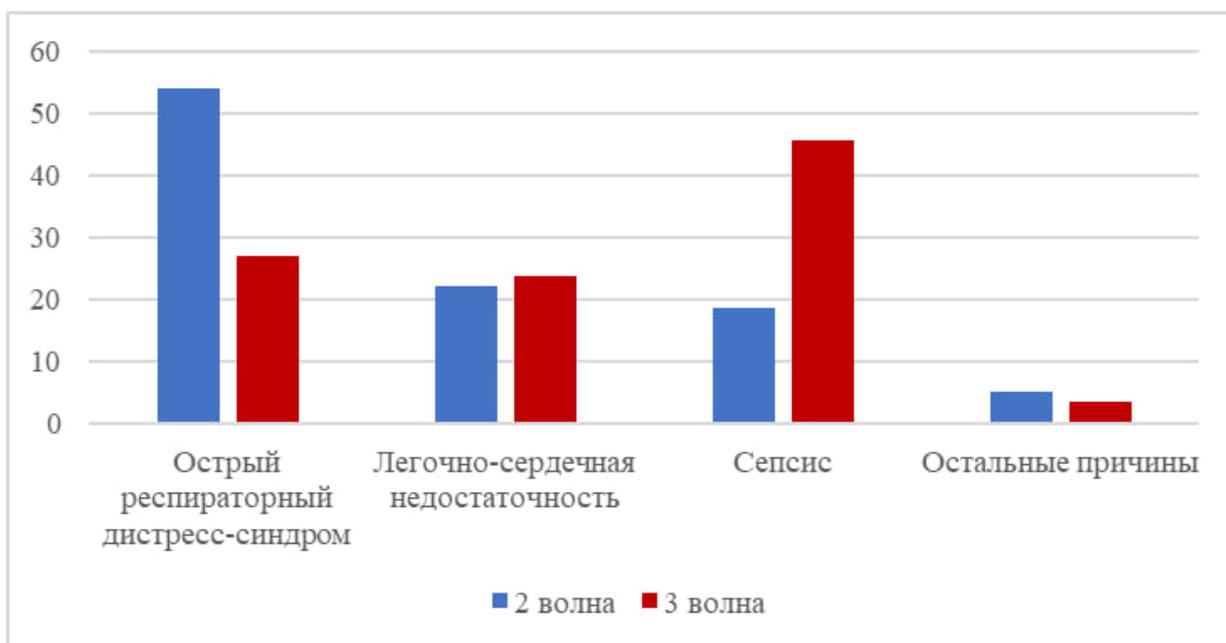


Рисунок 5 - Распределение непосредственных причин смерти по частоте, в % от общего числа наблюдений

3.2. Макроскопическое исследование

У пациентов, умерших от COVID-19, в экссудативную фазу ДАП макроскопически легкие увеличены в размере, полностью заполняют плевральные пространства. Консистенция легких плотная. Альвеолярный рисунок поверхности стерт, поверхность разреза красного цвета, «лакированного» вида (Рисунок 6). В ткани легких определяются кровоизлияния различных размеров: от мелких, до крупных сливающихся геморрагий. С поверхности обильно стекает розовая пенная жидкость. При проведении водной пробы фрагменты ткани легких тонут в воде. В пролиферативную фазу легкие приобретали более плотную консистенцию, серовато-бордово-серого цвета, «мясистого» или «войлочного» вида на разрезе (Рисунок 7). На поздних этапах заболевания при макроскопическом исследовании визуализировались тяжи белесовато-серой волокнистой фиброзной ткани с формированием в единичных случаях «сотового» легкого.

При присоединении вторичной флоры развивались очаговая или долевая пневмония с характерными для них морфологическими проявлениями в виде красного или серого «опеченения» легких или зернистости поверхности разреза (Рисунок 7, пунктирная стрелка, Рисунок 8). В отдельных случаях пневмония носила деструктивный характер с формированием абсцессов (Рисунки 8, 9).

У всех исследованных пациентов были выявлены макроскопические признаки COVID-ассоциированной коагулопатии либо в виде фокусов кровоизлияний в плевральных листках, слизистой дыхательных путей и в ткани легких, либо тромбов и тромбоэмболов в просветах ветвей легочных артерий, геморрагических инфарктов легких (Рисунок 6, стрелка).

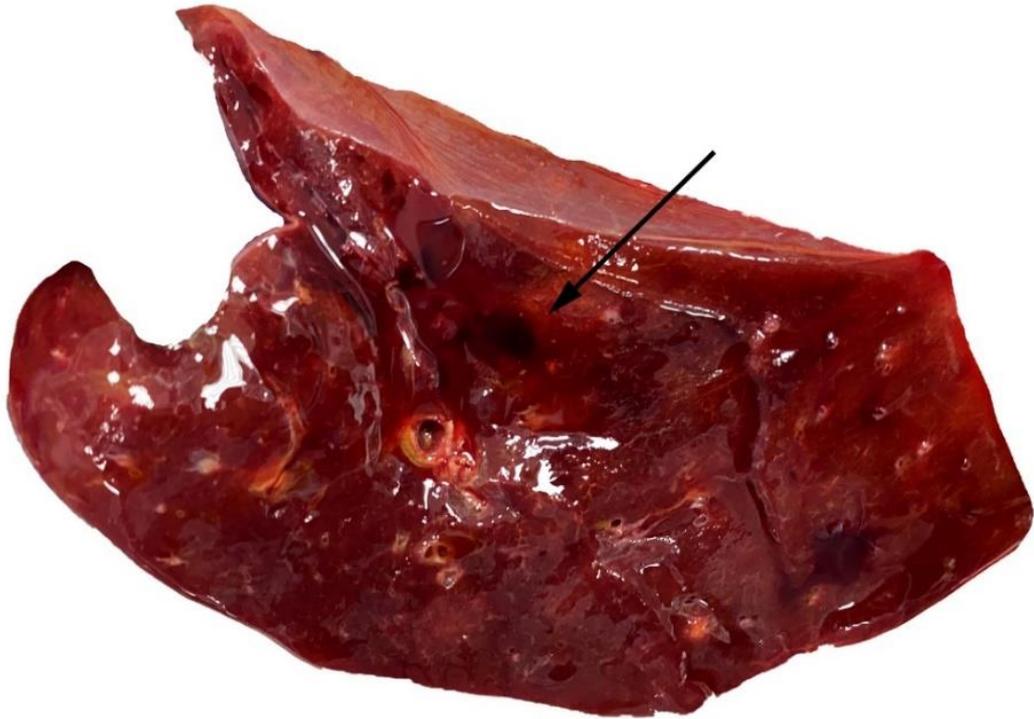


Рисунок 6 - Диффузное альвеолярное повреждение, фаза экссудации. Лакированная, красная поверхность разреза с кровоизлияниями (стрелка)

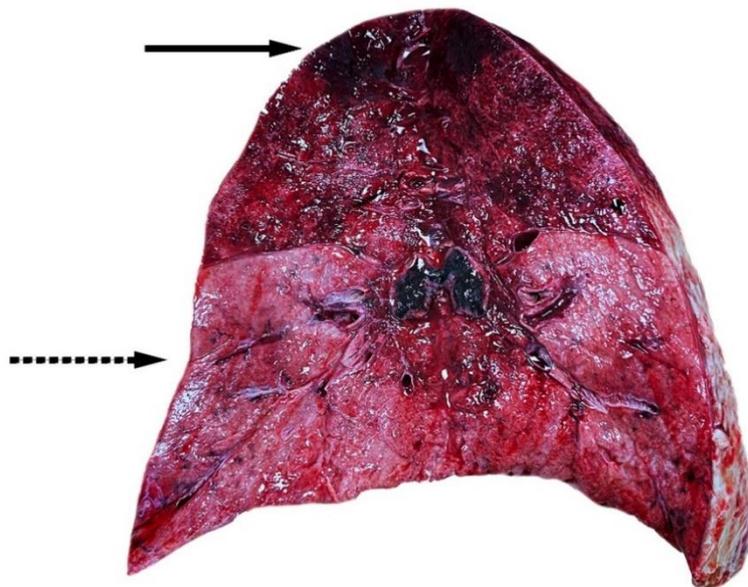


Рисунок 7 - Диффузное альвеолярное повреждение, фаза пролиферации. Красно-серая, плотная, «мясистая», «войлочная» ткань легких с геморрагическим инфарктом (стрелка), долевая пневмония в стадии серого опеченения (пунктирная стрелка)



Рисунок 8 - Субтотальная очагово-сливная пневмония с абсцедированием.
Поверхность разреза с желтоватыми зернистыми очажками различных
размеров



Рисунок 9 - Вирусно-бактериальная пневмония, цилиндрические и
мешковидные бронхоэктазы, хронический абсцесс легкого (стрелка)

3.3. Гистологическое исследование

При микроскопическом исследовании в ткани легких определены участки поражения, подсчитана площадь поражения следующими патологическими процессами: диффузное альвеолярное повреждение в стадии экссудации и пролиферации, ДВС-синдром, лимфоцитарный альвеолит, бактериальная пневмония при присоединении вторичной флоры, интерстициальный фиброз (Приложение А).

Диффузное альвеолярное повреждение

При микроскопическом исследовании легких были выявлены признаки *диффузного альвеолярного повреждения в стадии экссудации* в виде отложения гомогенных эозинофильных масс (гиалиновых мембран), выстилающих просветы альвеол. В просветах альвеол расположены спущенные пневмоциты, немногочисленные полиморфно-ядерные лейкоциты, интраальвеолярные кровоизлияния различной степени выраженности. В просветах сосудов различных калибров отмечалось паретическое расширение и полнокровие со сладж-феноменом. В интерстиции выявлены единичные нейтрофилы и лимфоциты (Рисунок 10). Признаки ДАП в стадии экссудации были выявлены в 53 случаях 2 волны (89,8%), причем у 10 (17%) они поражали практически всю площадь исследованных фрагментов (Приложение А). В 3 волну признаки ДАП в стадии экссудации наблюдались в 57 случаях (96,6%).

ДАП в стадии пролиферации проявлялся в виде плоскоклеточной метаплазии альвеолярного и бронхиального эпителия в совокупности с остатками гиалиновых мембран (Рисунок 11). Сохранялись описанные выше интраальвеолярные кровоизлияния, а в некоторых случаях визуализировались скопления гемосидерофагов. В отдельных случаях помимо вышеописанных проявлений определялось сочетание ДАП с очаговой пневмонией (Рисунок 14), реактивный аденоматоз в виде выраженной пролиферации пневмоцитов II типа с полной выстилкой просветов альвеол и формированием железистоподобных структур

(Рисунок 12). Во 2 волну процент наблюдений признаков пролиферативной фазы ДАП составил 35 случаев (59,4%), в 3 волну – 32 (54,3%). В единичных наблюдениях в ткани легких определялись немногочисленные гигантские многоядерные клетки по типу клеток инородных тел (Рисунок 13).

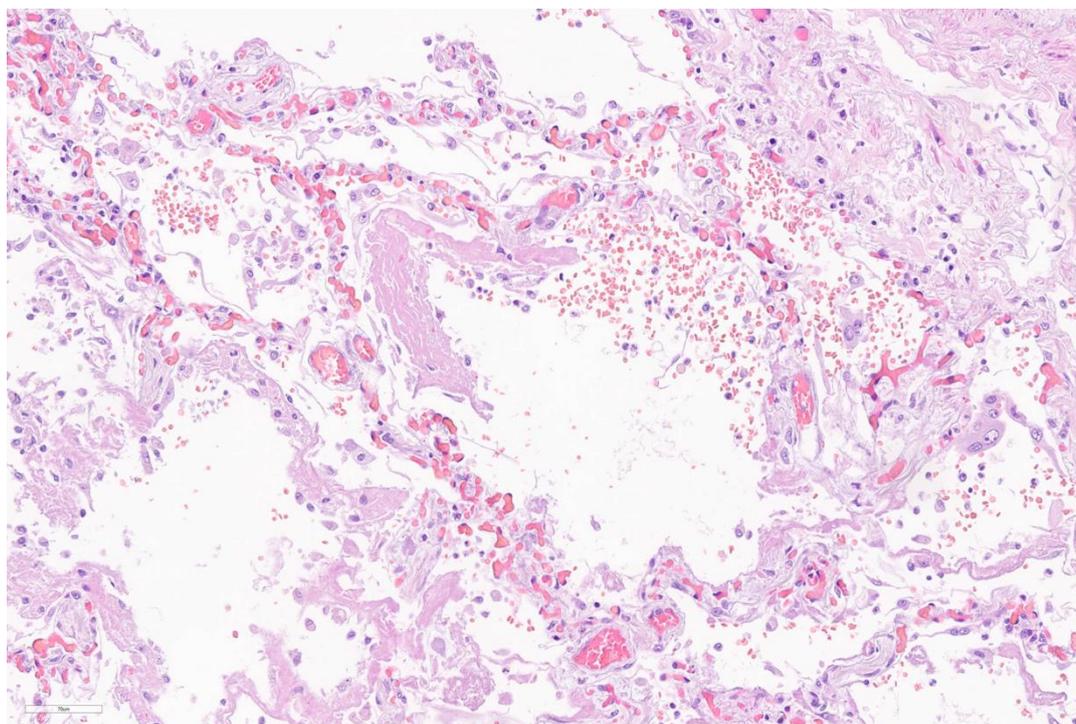


Рисунок 10 - ДАП в фазе экссудации. Гиалиновые мембраны, полнокровие сосудов и капилляров, в просветах которых определяется сладж-феномен. Интраальвеолярные кровоизлияния, скопления макрофагов. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение х30

Лимфоцитарный альвеолит

В 36 случаях (61%) 2ой волны наблюдались признаки альвеолита, сопровождающиеся воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок в виде очаговых и диффузных лимфоплазмоцитарных скоплений (Рисунок 15). Воспалительный инфильтрат нередко распространялся на стенки прилежащих кровеносных сосудов. Альвеолиты иногда протекали с развитием интерстициального фиброза. В нашем исследовании альвеолит регистрировался только при выраженной воспалительной инфильтрации. В большинстве случаев признаки альвеолита встречались не более чем в 39 случайных полях зрения из 100,

что может говорить о малом объеме поражения, а характер инфильтрации был очаговый. В 3 волну признаки альвеолита встречались в 24 случаях (40,7%) и не чаще чем в 29 полях зрения.

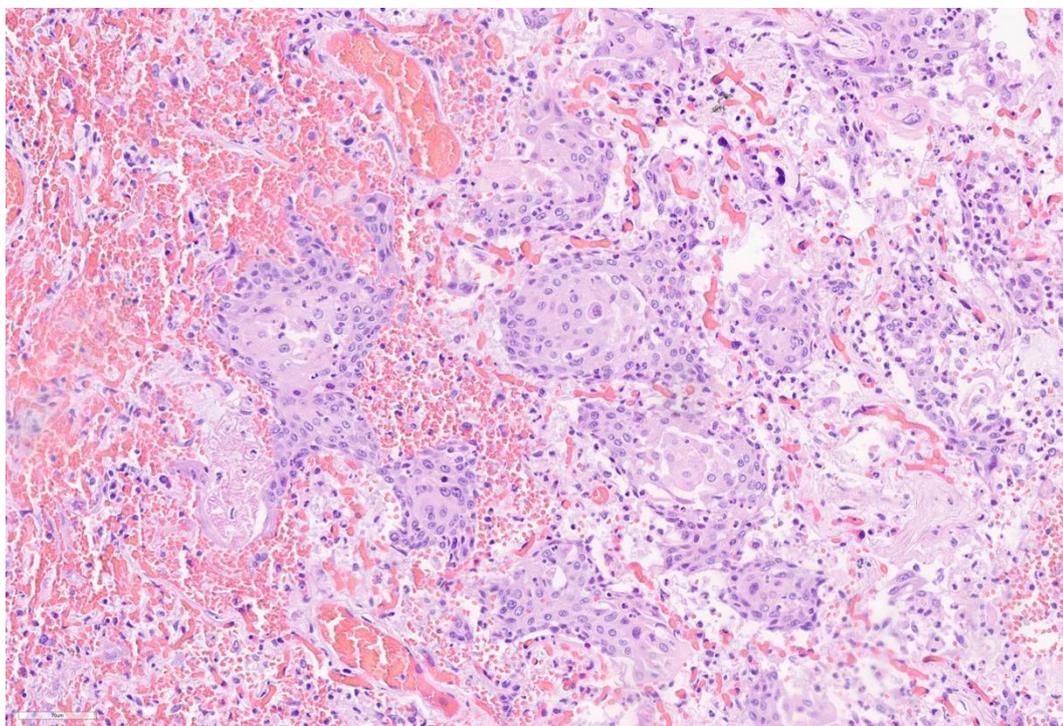


Рисунок 11 - ДАП в фазе пролиферации. Просветы альвеол выполнены очагами плоскоклеточной метаплазии с цитологическими признаками реактивной атипии ядер. Полнокровные сосудов и капилляров, начальные признаки миофибробластической пролиферации. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

Тромбоваскулит и COVID-ассоциированная коагулопатия

В некоторых случаях было отмечено развитие васкулитов, характеризующихся нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрацией сосудов мелкого калибра (Рисунок 16) с развитием в отдельных случаях фибриноидного некроза стенки. В просветах сосудов с вышеописанной морфологической картиной определялись тромбы красного и смешанного видов (Рисунки 17, 18). Во 2 волне признаки тромбоваскулита наблюдались в 19 случаях (32,2%), в 3 - лишь в 7 (11,9%). У умерших в 1 волну коронавирусной инфекции морфологические признаки воспаления сосудистой стенки встречались в 75% случаев.

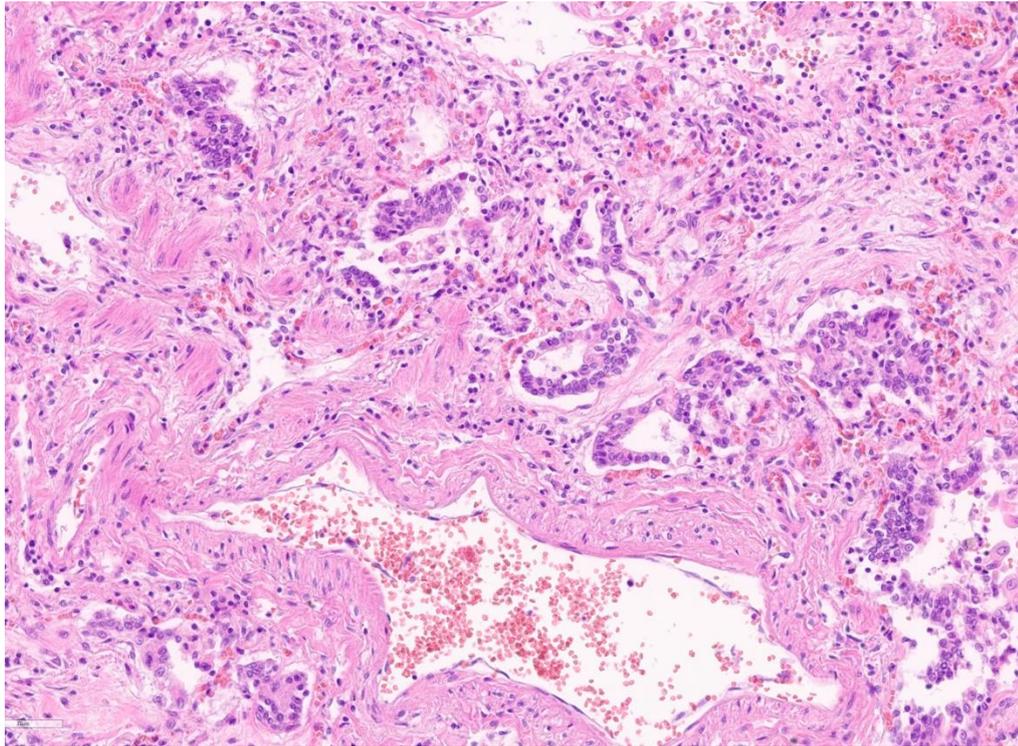


Рисунок 12 - ДАП в фазе пролиферации с пролиферацией пневмоцитов 2 типа с формированием железистоподобных структур (аденоматоз). Просветы альвеол выполнены полиморфноклеточным инфильтратом. Полнокровие сосудов и интраальвеолярные кровоизлияния. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

Несмотря на то, что воспаление сосудистой стенки встречалось относительно редко, признаки коагулопатии в виде сладжированных эритроцитов, красных и смешанных тромбов в просветах сосудов мелкого и крупного калибра наблюдались во всех (100%) исследуемых случаях во 2 и 3 волнах. Поражение сосудов микроциркуляторного русла и мелкого калибра проявлялось в виде сладж-феномена и образования тромбов. В некоторых случаях микротромбоз сопровождался дальнейшим развитием интраальвеолярных кровоизлияний, порой занимающих большую площадь микропрепарата.

Бронхопневмония

Бактериальная и грибковая пневмония диагностирована в виде скоплений лейкоцитов в просветах мелких бронхов и альвеол (Рисунки 14, 19). Во 2 волну бронхопневмония встречалась в 47 случаях (79,7%), в 3 волну в 31 (52,6%).

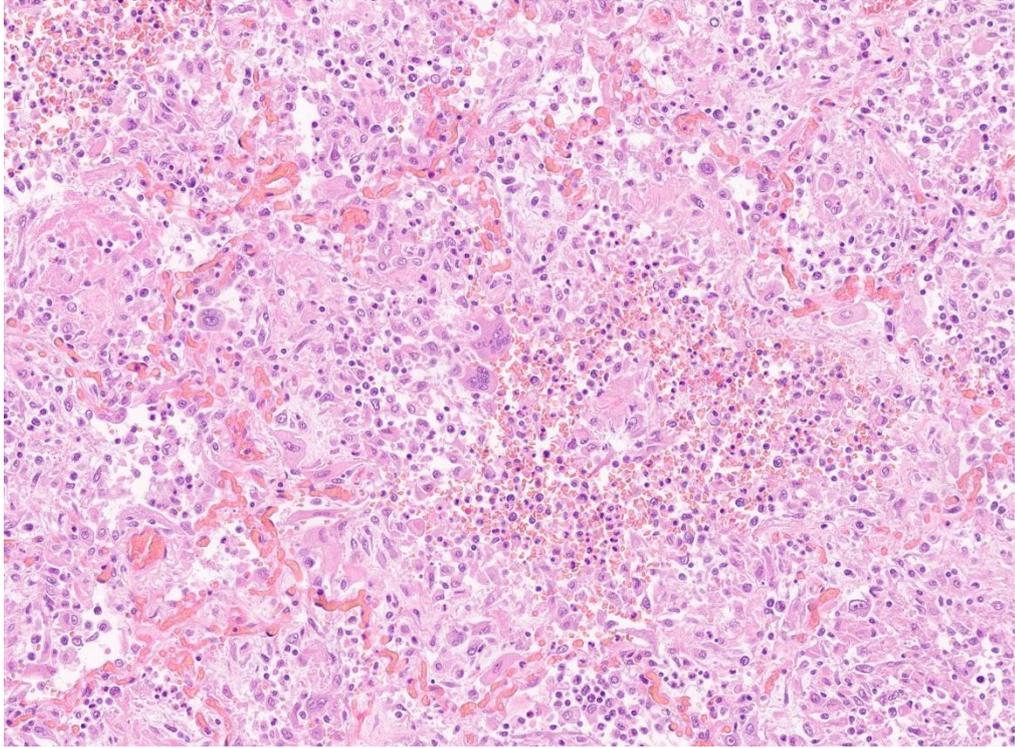


Рисунок 13 - ДАП в фазе пролиферации с полиморфноклеточной интраальвеолярной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, плазмочитами, макрофагами с признаками гемофагоцитоза и единичными гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

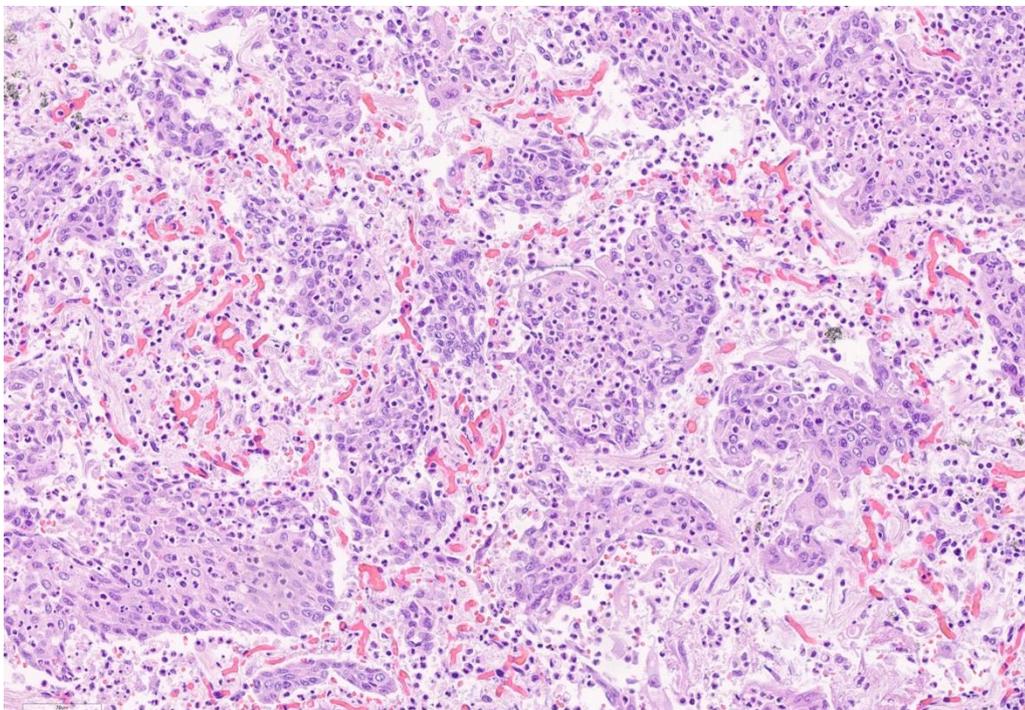


Рисунок 14 - ДАП в фазе пролиферации с очагами плоскоклеточной метаплазии в сочетании с очаговой пневмонией с интраальвеолярными и интерэпителиальными скоплениями нейтрофилов. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

Интерстициальный фиброз

Морфологические признаки интерстициального фиброза наблюдались на различных сроках заболевания, начиная с самых первых суток (Рисунки 20, 21). Степень выраженности варьировала от случая к случаю. Во 2-ую волну интерстициальный фиброз с миофибробластическими изменениями был выявлен в 43 случаях (72,8%). В 3-ю волну в 33 случаях (55,9%). Лишь в единичных случаях фиброз занимал более половины исследованных полей зрения. Стоит отметить, что в некоторых случаях затяжного течения, COVID-19 признаки фиброза отсутствовали.

Резюмируя вышесказанное, обращает на себя внимание то, что варианты поражения легких могут отличаться от случая к случаю, однако, в различные волны картина схожая: на первое место выступает поражение микроциркуляторного русла с развитием особого варианта ДВС-синдрома при новой коронавирусной инфекции - COVID-ассоциированной коагулопатии, проявляющейся преимущественно тромбообразованием, а не геморрагическим синдромом. Вторым по частоте встречаемости процессом является ДАП, обнаруженное преимущественно в фазу экссудации. Также обращает на себя внимание несоответствие длительности заболевания и стадии ДАП, выявленного при гистологическом исследовании. Также довольно часто были выявлены признаки интерстициального фиброза, который наблюдался на различных сроках заболевания, начиная с первых суток.

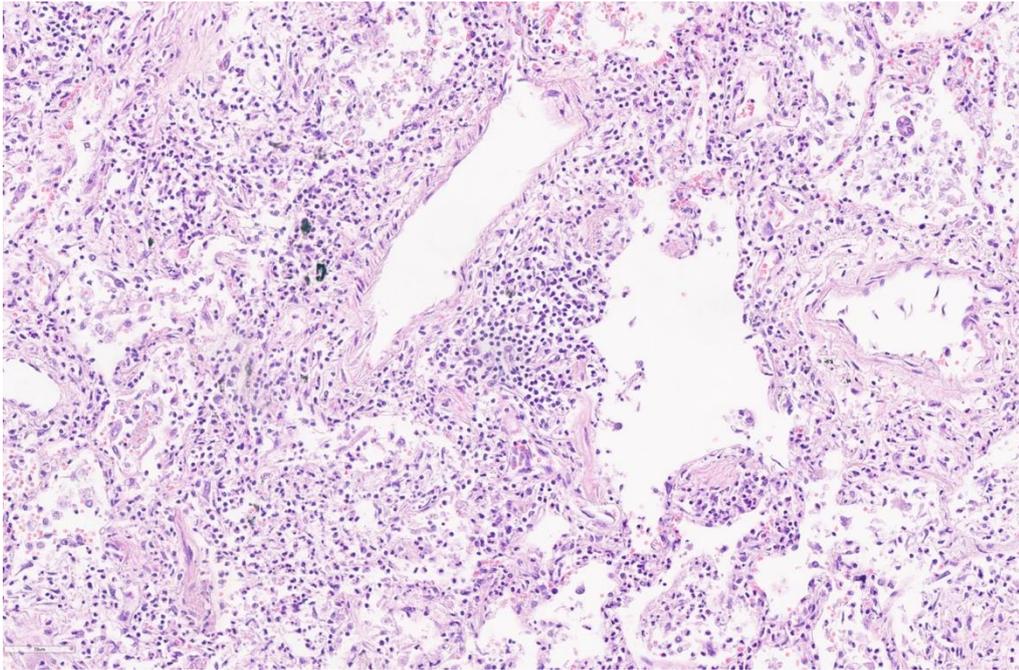


Рисунок 15 - Выраженная лимфоплазмочитарная и макрофагальная инфильтрация интерстиция легкого с примесью немногочисленных лейкоцитов. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

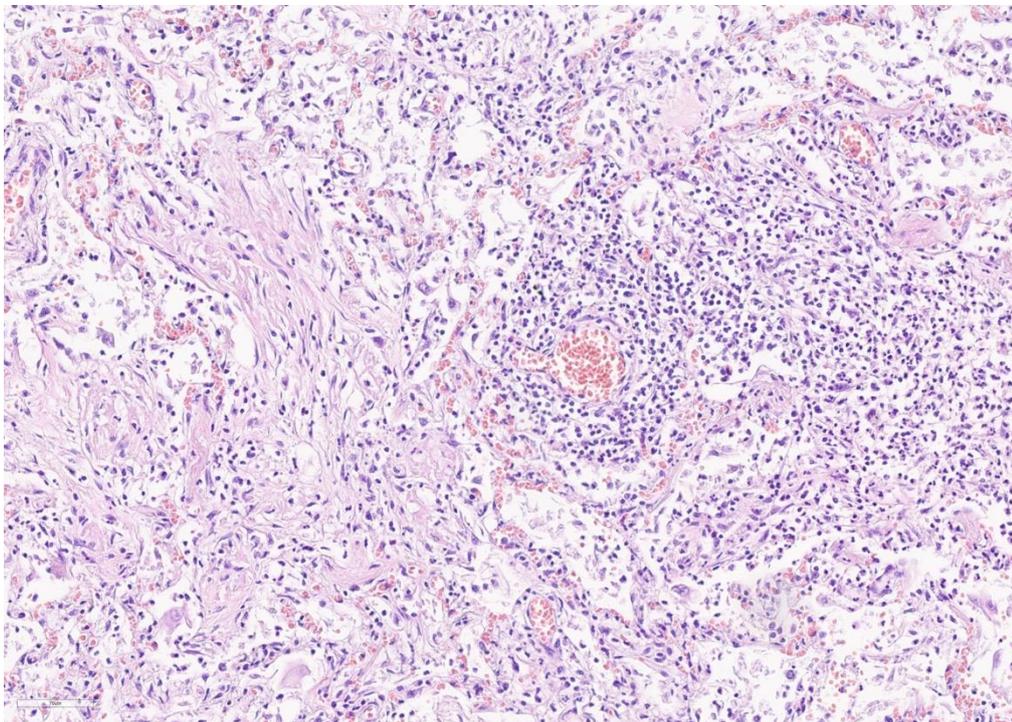


Рисунок 16 - Выраженная лимфолейкоцитарная инфильтрация стенки мелкого сосуда с распространением воспалительного инфильтрата на прилежащий интерстиций. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

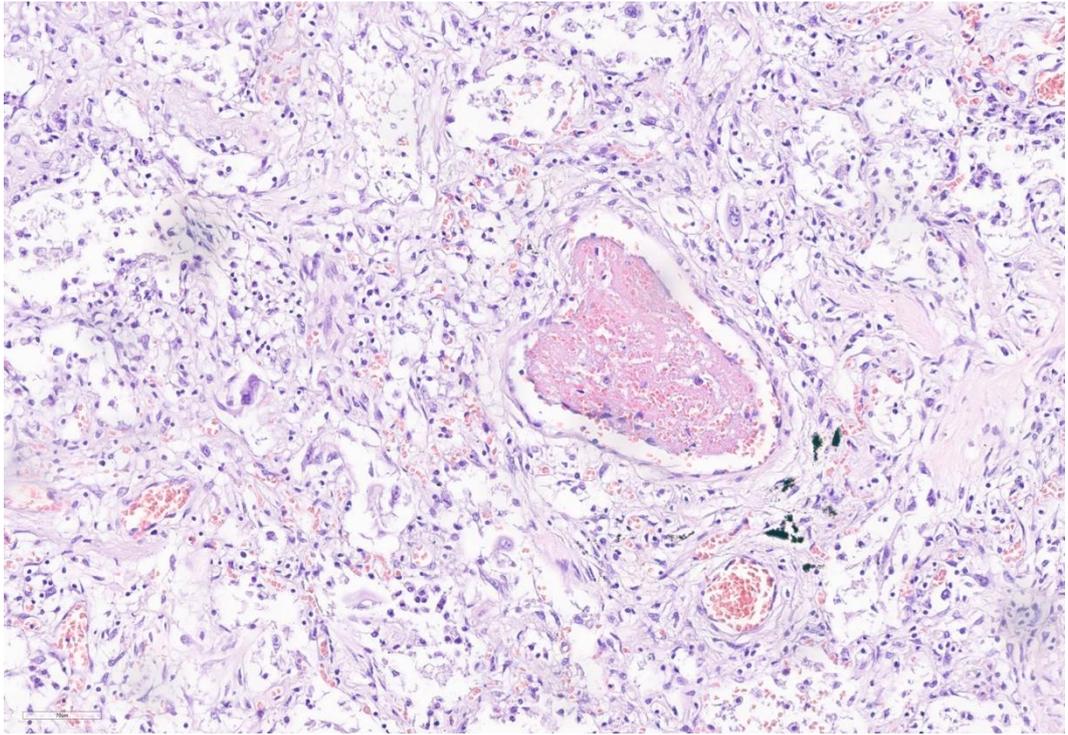


Рисунок 17 - Смешанный тромб в просвете мелкой ветви легочной артерии на фоне ДАП в фазе пролиферации. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

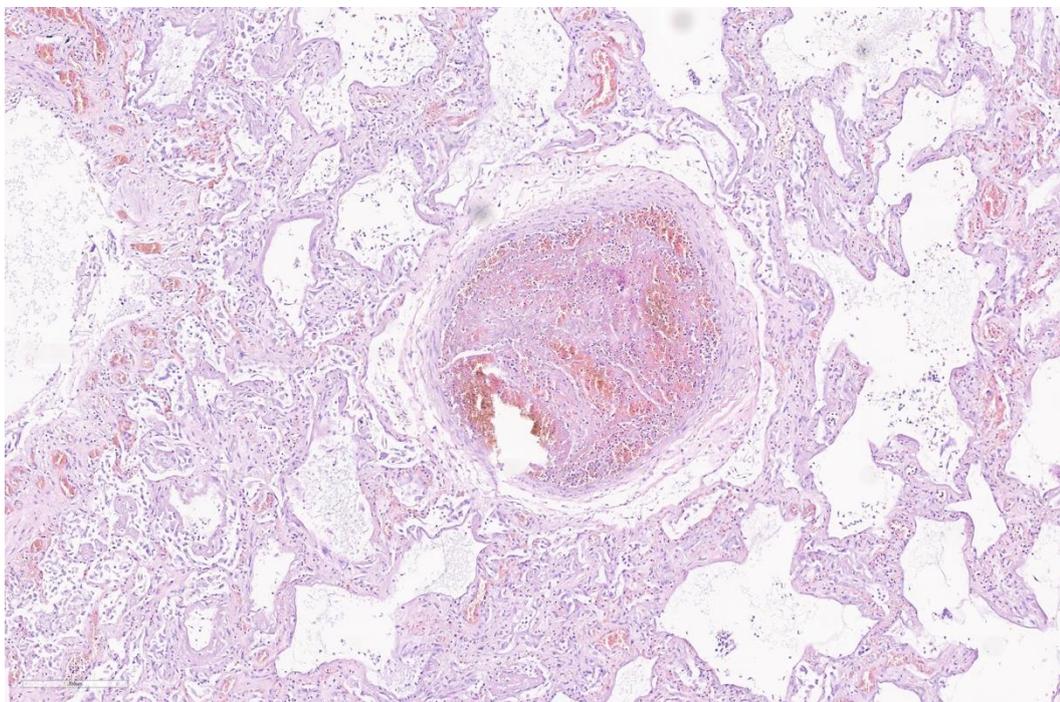


Рисунок 18 - Смешанный тромб в просвете субсегментарной ветви легочной артерии на фоне ДАП в фазе экссудации. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x10

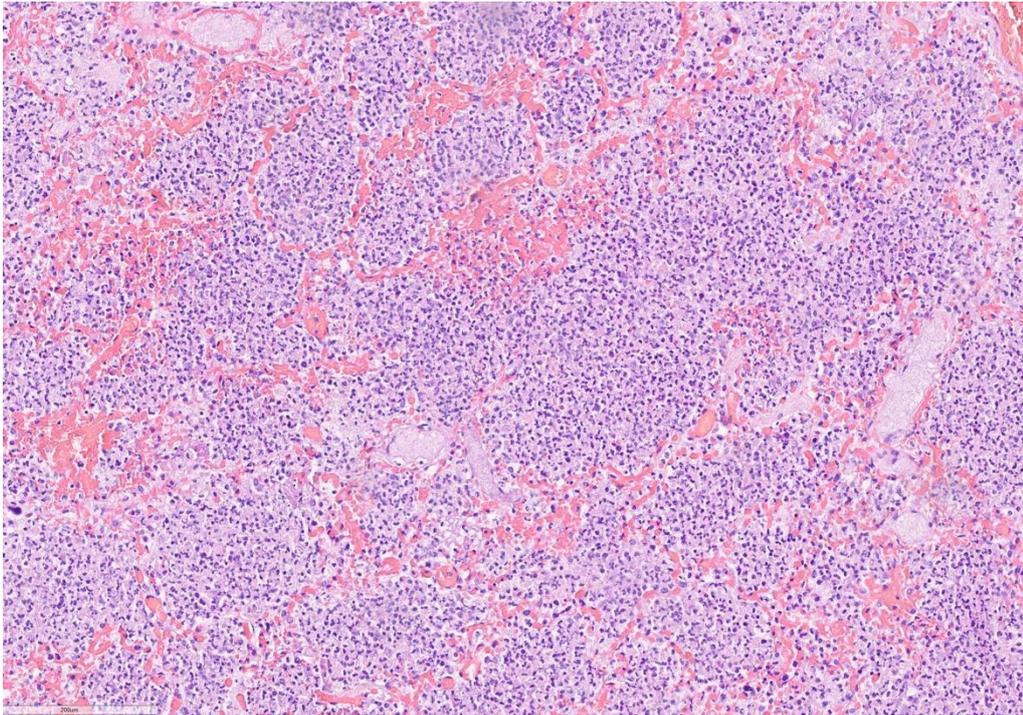


Рисунок 19 - Интраальвеолярные скопления колоний микроорганизмов с диффузной нейтрофильной инфильтрацией. Фокальная деструкция межальвеолярных перегородок. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x20

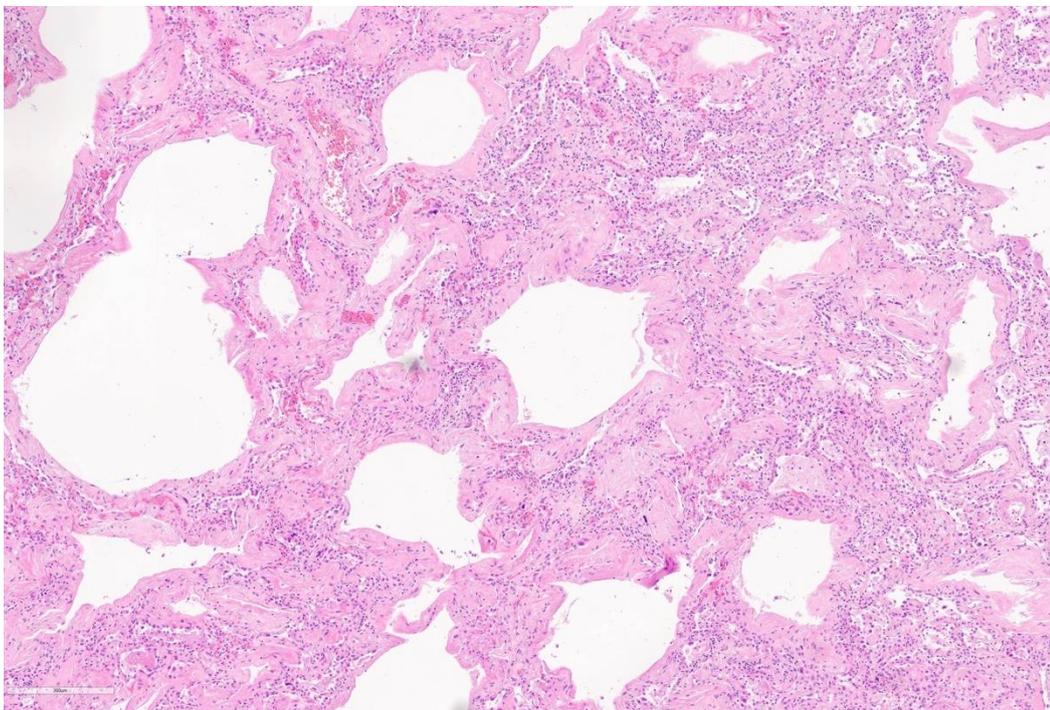


Рисунок 20 - Проращение гиалиновых мембран фибробластами и коллагеновыми волокнами с формированием интерстициального фиброза и начальными признаками образования «сотового» легкого. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x10

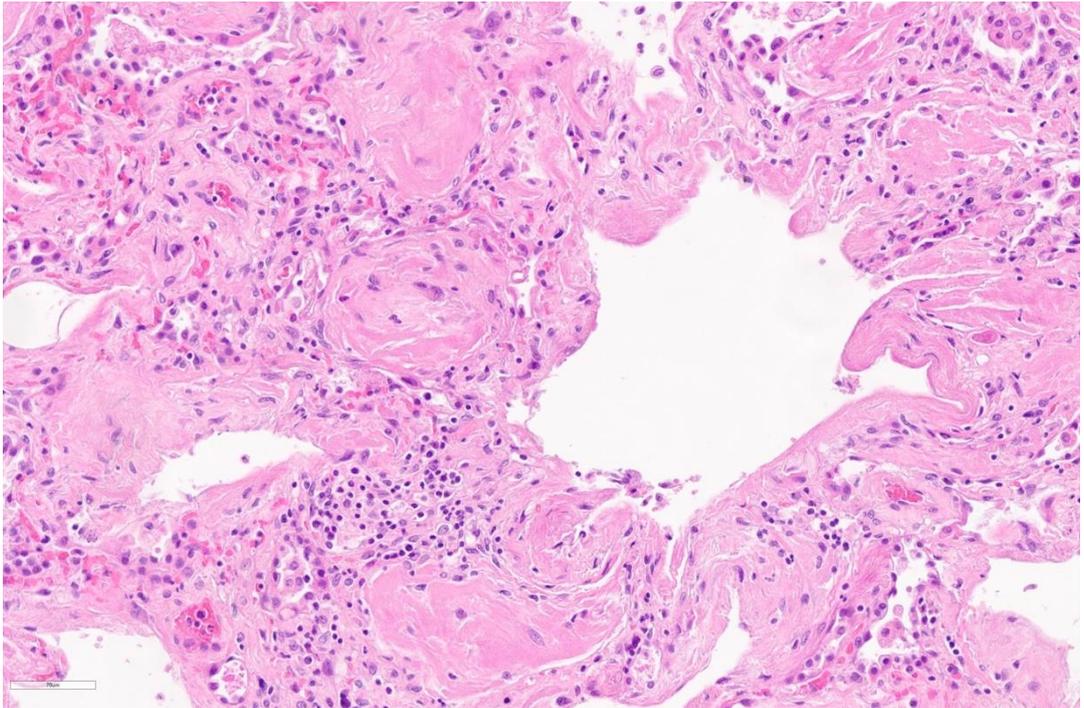


Рисунок 21 - Прорастание гиалиновых мембран фибробластами и коллагеновыми волокнами с формированием интерстициального фиброза. Окр. г/э. Отсканированное изображение. Увеличение x30

Вышеуказанные формы развивались у различных пациентов как сочетанно, так и изолированно друг от друга, а клеточный состав был схожим: в исследованных зонах преобладали альвеолярные макрофаги, пневмоциты 2 типа, лимфоциты, нейтрофилы. Число макрофагов при ДАП было высоким даже с самых первых дней заболевания.

3.4. Иммуногистохимическое исследование Nucleocapsid и Spike-протеина вируса SARS-CoV-2

При проведении иммуногистохимической реакции вирусные белки (S-белок и нуклеокапсид) обнаруживались с самых ранних сроков заболевания. Характер окрашивания преимущественно гранулярный цитоплазматический (Рисунки 22-24), в единичных клетках определялось ядерное окрашивание. Наиболее часто вирусные белки обнаруживались в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах как 1,

так и 2 типа, в эндотелиоцитах, лейкоцитах и в бронхиальном эпителии.

Визуализация альвеолоцитов 1 типа представляла трудности ввиду их тонкой структуры и скудного количества цитоплазмы, но в случаях их набухания и сдувания, окрашивание цитоплазмы антителами против вирусных белков наблюдалось отчетливо. Вирусные белки были также обнаружены в мезотелии висцеральной плевры. Клеточная локализация вирусных белков и количество окрашенных клеток отличались в зависимости от варианта поражения легких.

ДАП в стадии экссудации.

При исследовании случаев 2 и 3 волны вирусные белки обнаружены в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах 2 порядка и эндотелиоцитах (Рисунки 25А, 25Б) (Таблица 3).

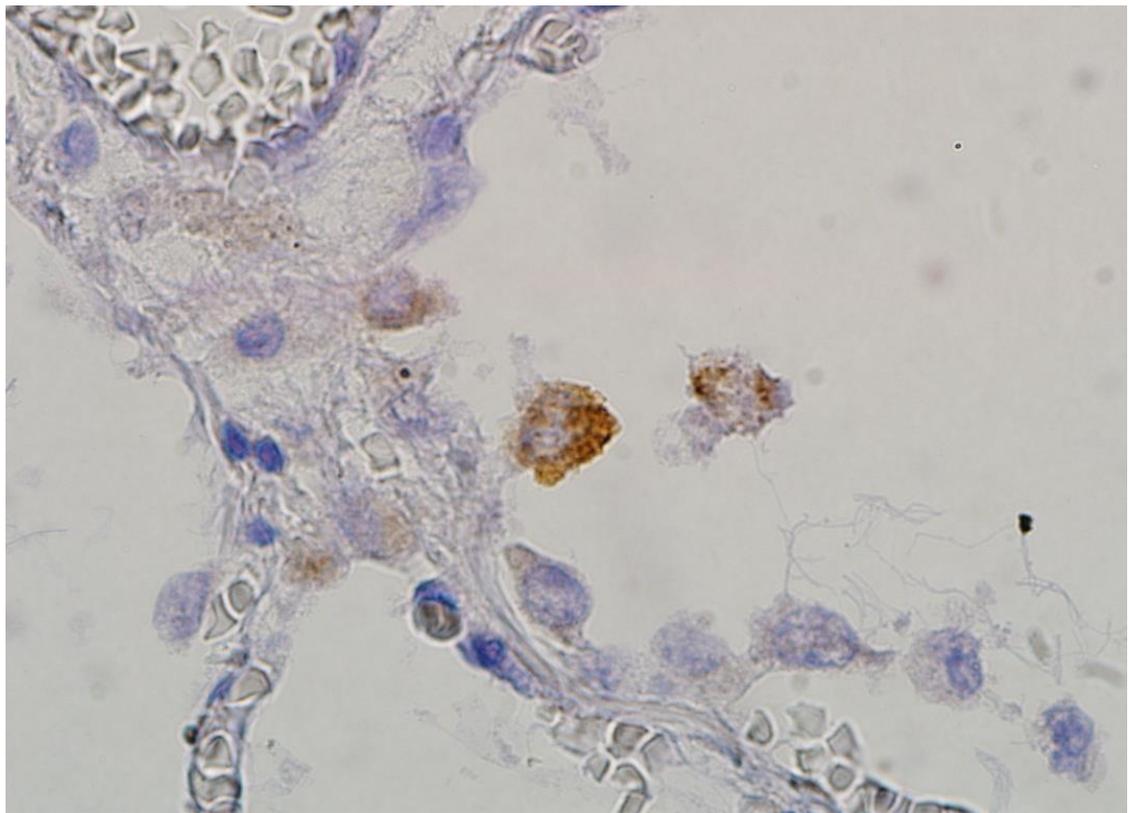


Рисунок 22 - Цитоплазматическое окрашивание макрофагов и пневмоцитов 2 типа. ИГХ реакция с антителами против Nucleocapsid. ДАБ, гематоксилин.
Увеличение x1000

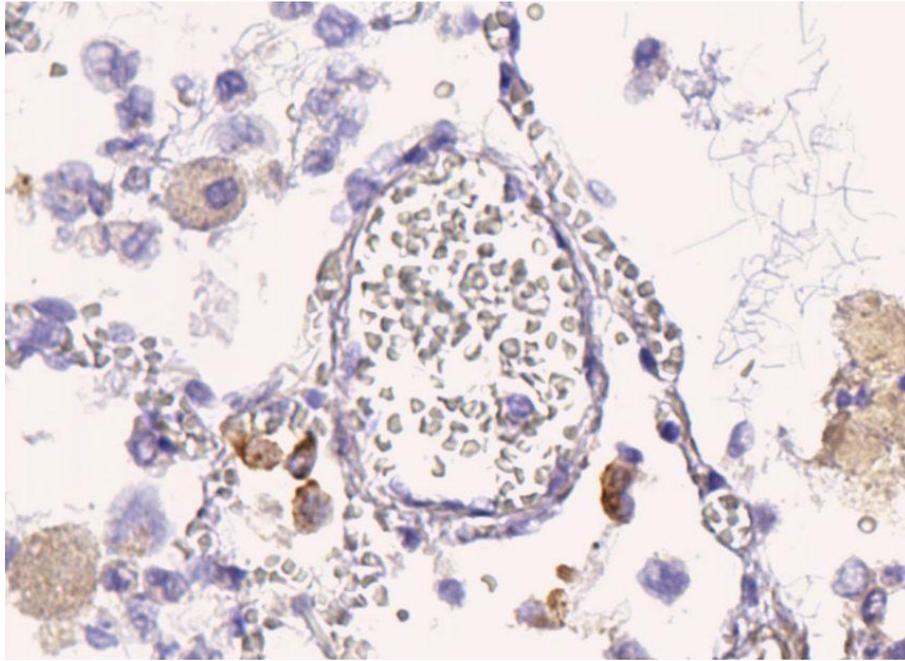


Рисунок 23 - Локализация Spike в цитоплазме альвеолярных макрофагов и эндотелиоцитов в начале заболевания (2 сутки). ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

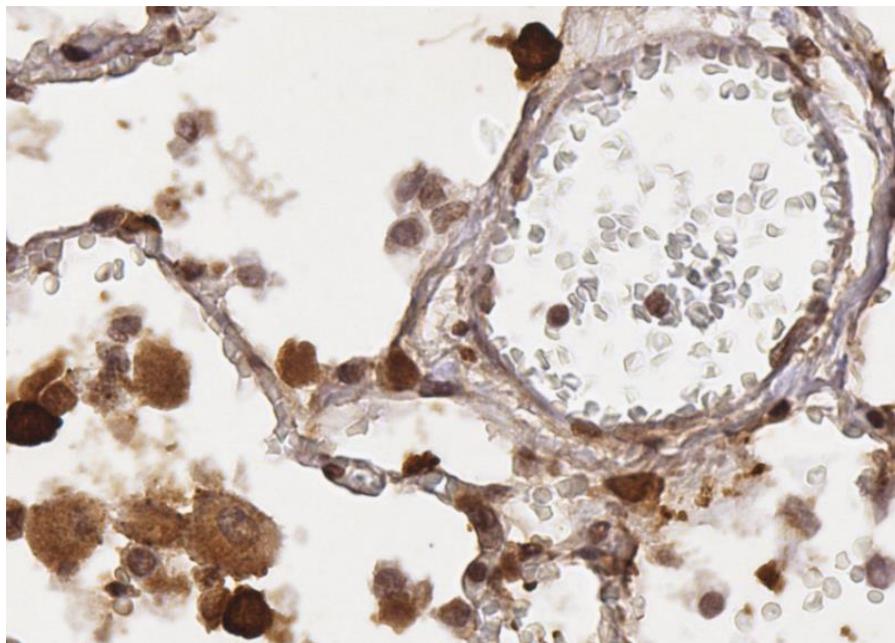


Рисунок 24 - Локализация Nucleocapsid в цитоплазме альвеолярных макрофагов и эндотелиоцитов в начале заболевания (2 сутки). ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

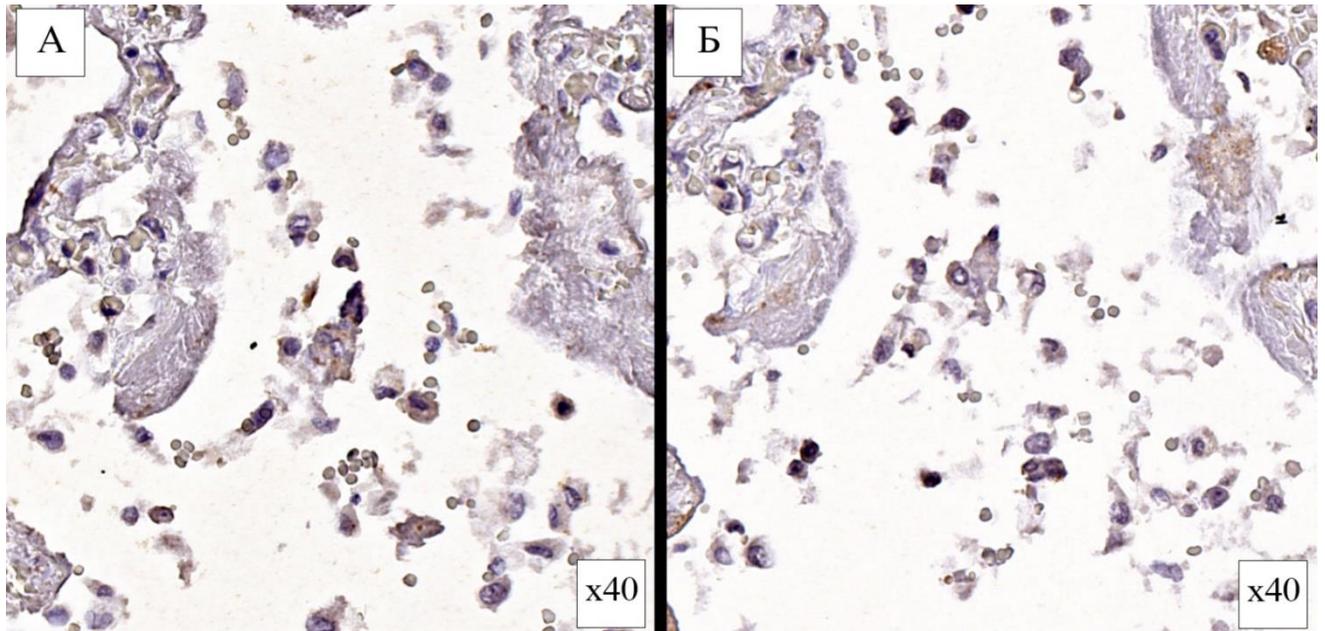


Рисунок 25 - Локализация Spike (А) и Nucleocapsid (Б) в цитоплазме альвеолярных макрофагов, пневмоцитов II типа и в гиалиновых мембранах во время экссудативной фазы ДАП. ДАБ, гематоксилин. Отсканированное изображение. Увеличение x400

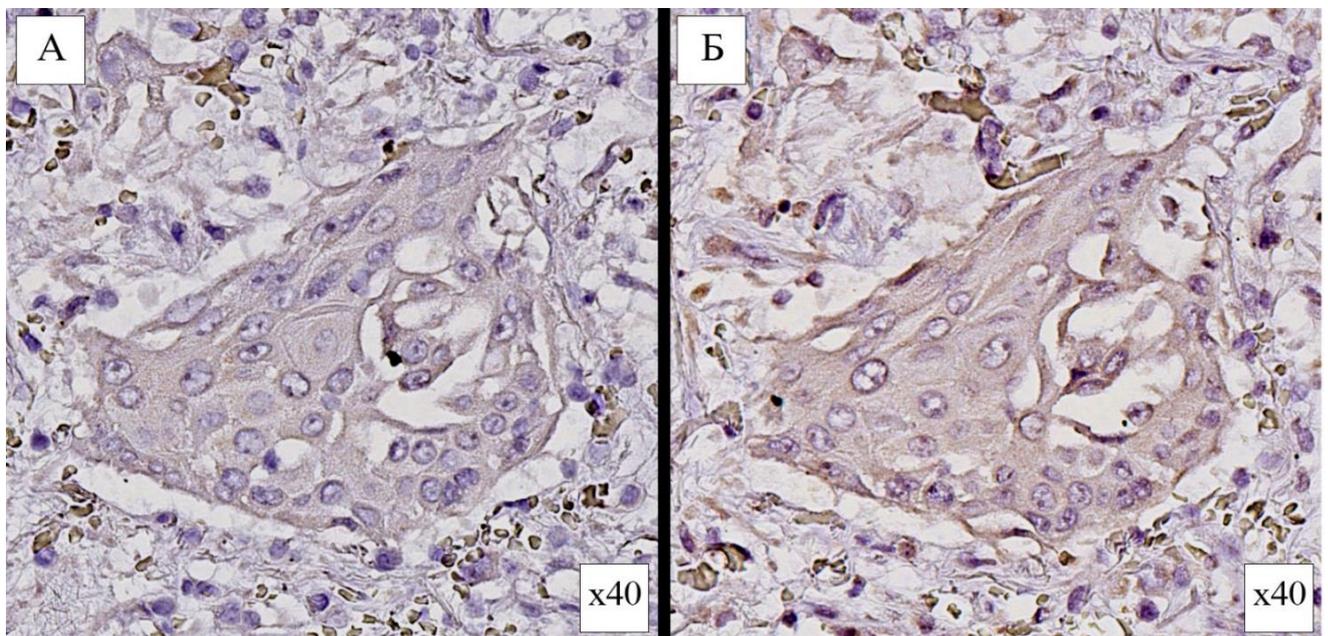


Рисунок 26 - Локализация Spike (А) и Nucleocapsid (Б) в цитоплазме пневмоцитов II типа в состоянии плоскоклеточной метаплазии во время пролиферативной фазы ДАП. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

ДАП в стадии пролиферации.

Белки вируса обнаруживались в тех же клетках, однако с большей частотой в пневмоцитах 2 типа, особенно в очагах аденоматоза (Рисунки 26, 27). Кроме того, высокая частота окрашивания клеток антителами против вирусных белков выявлялась в очагах плоскоклеточной метаплазии эпителия, достигая 100% в случаях 2ой волны (Таблица 3). При этом отмечено некоторое увеличение частоты встречаемости вирусных белков в макрофагах и в эндотелии сосудов в случаях 3 волны.

Таблица 3 - Клеточная локализация белков вируса и доля окрашенных клеток при разных вариантах поражения легких при 2 и 3 волнах пандемии. S – Spike-protein, N – Nucleocapsid

Средняя доля окрашенных клеток в %		2 волна			3 волна		
		Макрофаги	Пневмоциты II типа	Эндотелиоциты	Макрофаги	Пневмоциты II типа	Эндотелиоциты
ДАП, фаза экссудации	S	84,6	87,7	17	89,2	92,9	24,8
	N	87	95,8	29,3	93,3	88,6	43,9
ДАП, фаза пролиферации	S	78	100	28	96	98,8	31,9
	N	89	100	39	97,3	99,5	43,9
Аденоматоз	S	92,9	98,5	16,5	96,9	99,4	35,7
	N	93,8	99,9	30,5	97,3	99,5	43,5
Альвеолит	S	94	-	30	87,1	-	18,6
	N	84,1	-	36,6	83,3	-	27,3
Тромбоваскулит	S	-	-	11	-	-	13,3
	N	-	-	23	-	-	27,1

Альвеолит

У пациентов, в ткани легких которых определялась выраженная воспалительная инфильтрация легочного интерстиция окрашивание определялось в эндотелиоцитах, а также в макрофагах, которые присутствовали в составе воспалительного инфильтрата. Во 2 волне S-белок был обнаружен в 94% макрофагов и в 30% эндотелиоцитов. Нуклеокапсид определялся в 84,1% макрофагов и 36,6% эндотелиоцитов (Таблица 3). В 3-ю волну S-белок был выявлен в 83,3% макрофагов и 27,3% эндотелиоцитов. Нуклеокапсид обнаружен в 86,6%

макрофагов и 31,1% эндотелиоцитов (Рисунок 28). Окрашивание цитоплазмы лимфоцитов не обнаружено.

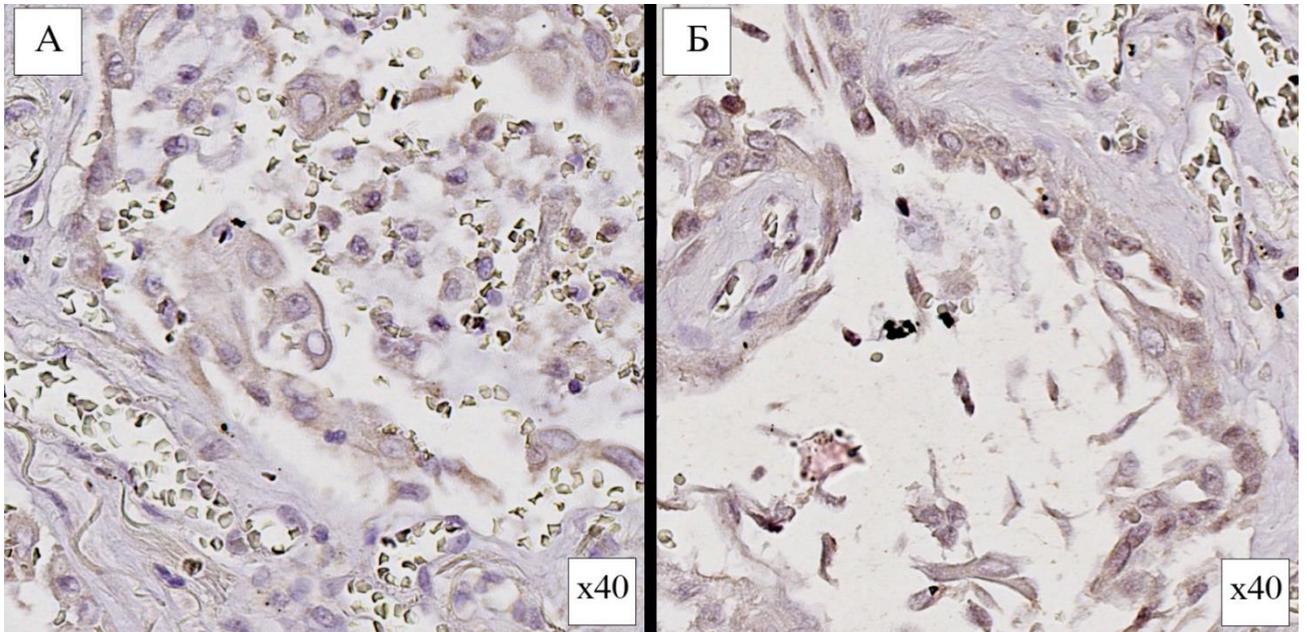


Рисунок 27 - Локализация Spike (А) и Nucleocapsid (Б) в цитоплазме пневмоцитов II типа в очагах аденоматоза. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

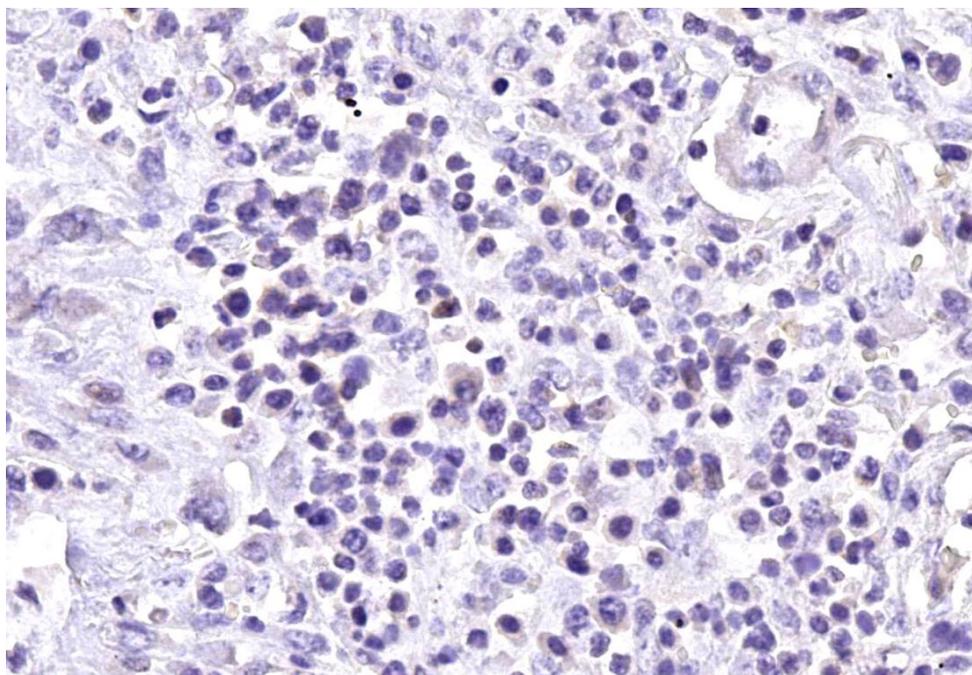


Рисунок 28 - Локализация Nucleocapsid в цитоплазме макрофагов и эндотелиоцитов в очагах альвеолита. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

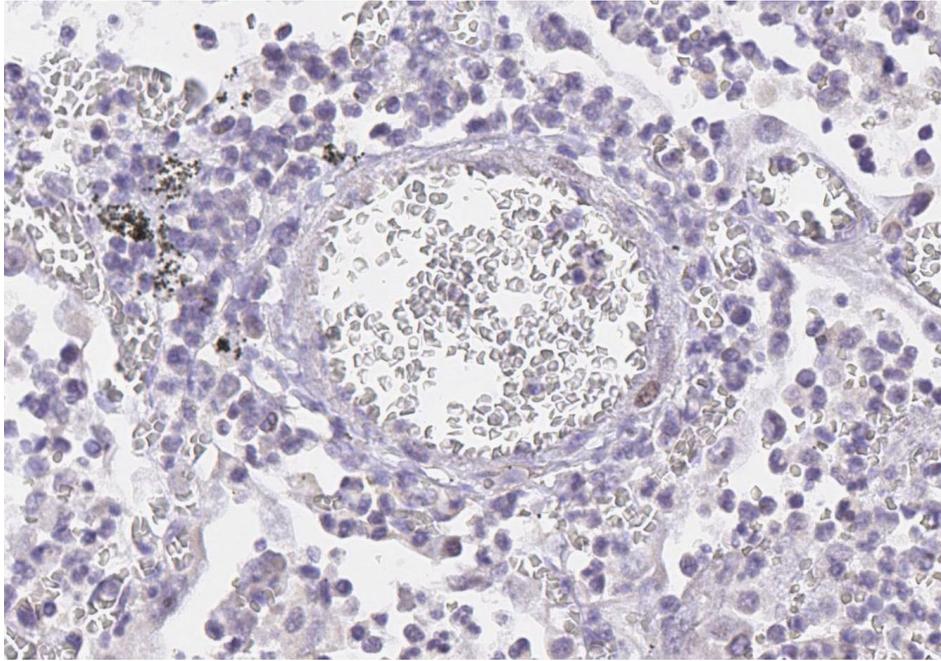


Рисунок 29 - Локализация Nucleocapsid в цитоплазме и ядрах эндотелиоцитов в очагах воспаления сосудистой стенки. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

Тромбоваскулит.

Локализация вирусных белков анализировалась в цитоплазме эндотелиоцитов. Во 2 волну S-белок был выявлен в 11% эндотелиоцитов, нуклеокапсид был обнаружен в 23% клеток. В случаях 3 волны было обнаружено окрашивание антителами против S-белка 13,3% эндотелиоцитов, экспрессия нуклеокапсида составила 27,1% (Рисунок 29).

3.5. Иммуногистохимическое исследование внеклеточных везикул

Наиболее яркое окрашивание везикул определялось в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах 2 типа, эндотелиоцитах, лимфоцитах, лейкоцитах. Также окрашивание определяли в мезотелии, бронхиальном эпителии, фибробластах, гладкомышечных клетках, однако, интенсивность и частота окрашивания последних были сравнительно ниже. Характер окрашивания – цитоплазматический, гранулярного вида, преимущественно в субапикальной области клеток. При большом увеличении определяли и зернистое окрашивание во

внеклеточной области, близкое к поверхности мембраны (Рисунок 30).

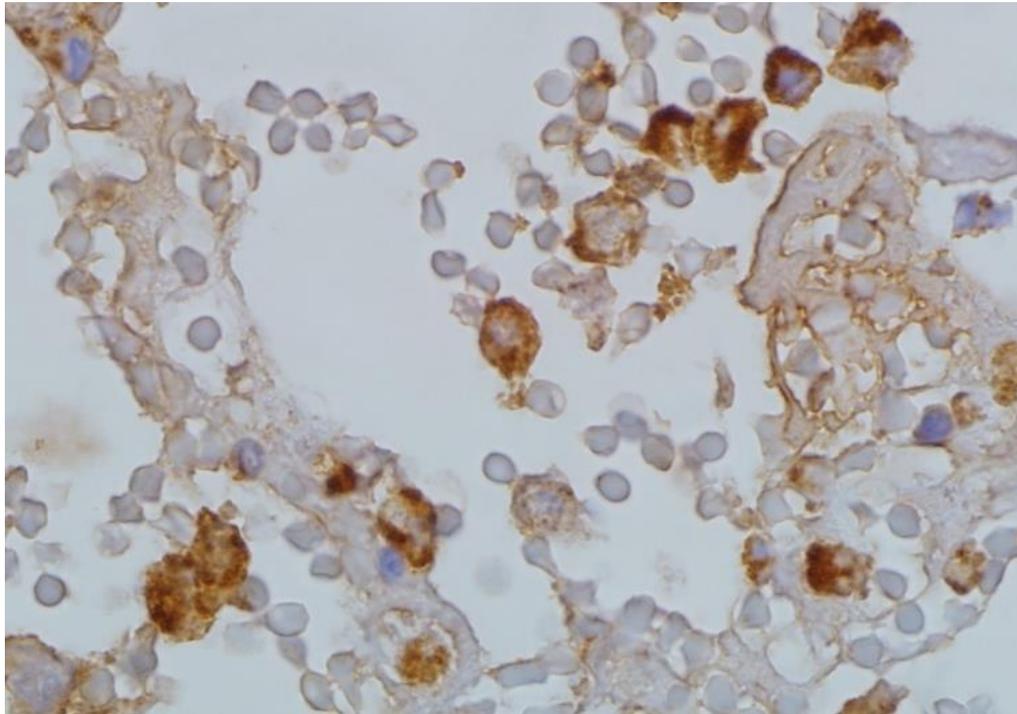


Рисунок 30 - Цитоплазматическое окрашивание макрофагов и пневмоцитов 2 типа. Антитела к CD63, ДАБ, гематоксилин. Увеличение x1000

Клеточная локализация и характер иммуногистохимического окрашивания антителами против CD63, соответствовали клеточной локализации вирусных частиц [96]. При проведении иммуногистохимической реакции с антителами против вирусных белков (S-белок и нуклеокапсид) окрашивание обнаруживали с первых дней заболевания в цитоплазме и реже в ядрах аналогичных клеток: преимущественно в макрофагах, пневмоцитах как 1, так и 2 типа, эндотелиоцитах, а также в лейкоцитах и в бронхиальном эпителии, как уже было сказано ранее.

Диффузное альвеолярное повреждение и аденоматоз.

В наблюдениях с экссудативной фазой ДАП наиболее яркое окрашивание везикул определялось в макрофагах, пневмоцитах 2 типа и эндотелиоцитах (Рисунок 31). Средняя доля окрашенных макрофагов составила 94,4%, пневмоцитов 2 типа – 86,4%, эндотелиоцитов – 59,3%. В пролиферативную фазу ДАП клеточный состав был идентичен (Рисунок 32). Средняя доля окрашенных

макрофагов антителами против CD63 составила 95%, пневмоцитов 2 типа – 91,9%, эндотелиоцитов – 62,2%.

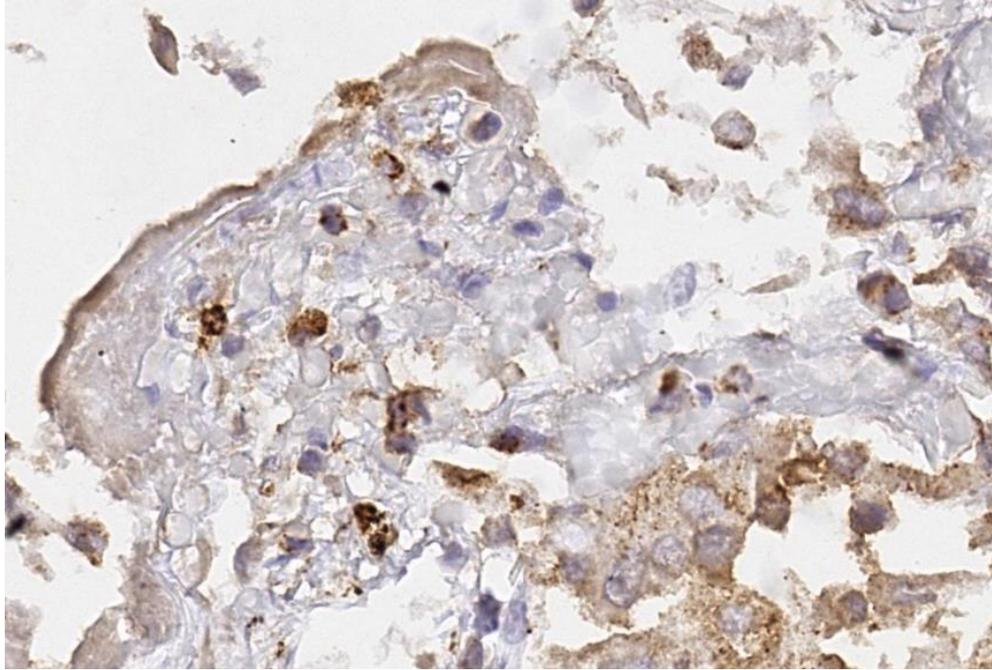


Рисунок 31 - Окрашивание макрофагов, пневмоцитов II типа, а также гиалиновых мембран при ДАП в фазе экссудации. Антитела к CD63, ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

В наблюдениях с аденоматозом везикулы были выявлены в 96% макрофагов, в 92,1% пневмоцитов 2 типа и в 62,8% эндотелиоцитов. Среди особенностей можно отметить особо яркое гранулярное субапикальное окрашивание пневмоцитов 2 типа при развитии реактивного аденоматоза (Рисунок 32, правый верхний угол микропрепарата), а также снижение интенсивности окрашивания до единичных гранул или до тотального отсутствия окраски в очагах плоскоклеточной метаплазии пневмоцитов 2 типа (Рисунок 32, левый нижний угол микропрепарата).

Альвеолит.

При исследовании наблюдений с альвеолитом чаще всего внеклеточные везикулы были обнаружены в макрофагах, лимфоцитах, эндотелиоцитах прилежащих мелких сосудов (Рисунок 33). Средняя доля окрашенных макрофагов – 91,7%, лимфоцитов – 70,7%, эндотелиоцитов - 64,5%. Интенсивность

окрашивания эндотелиоцитов была заметно ярче в сравнении с наблюдениями с ДАП. Как уже было сказано выше: в некоторых наблюдениях среди клеток воспалительного инфильтрата обнаруживались и немногочисленные лейкоциты, яркое цитоплазматическое окрашивание которых было выявлено в 100% обнаруженных клеток.

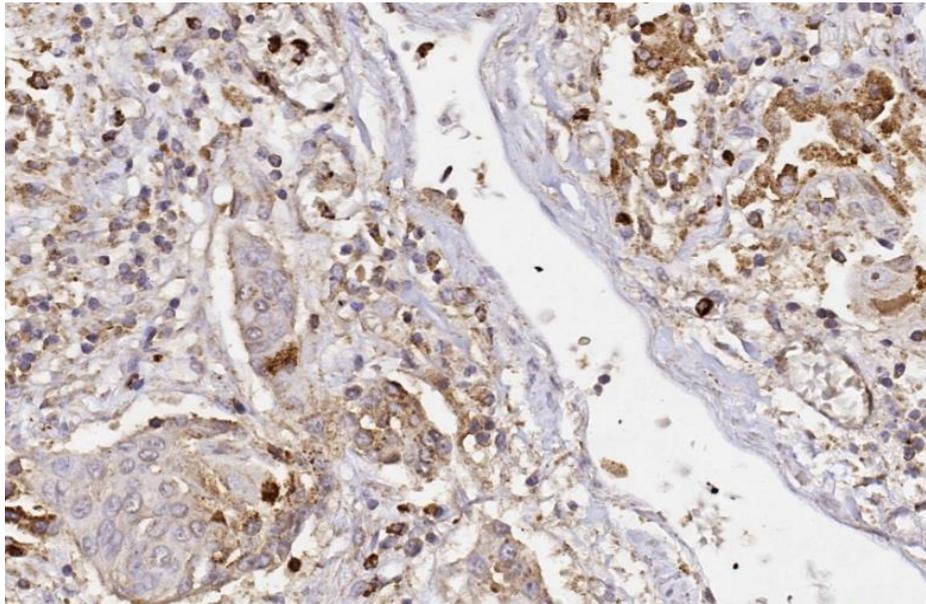


Рисунок 32 - Окрашивание пневмоцитов II типа в очагах аденоматоза (правый верхний угол) и плоскоклеточной метаплазии (левый нижний угол) при ДАП в фазе пролиферации. Антитела к CD63. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x300

Васкулит.

В полях зрения с воспалением сосудистой стенки наиболее интенсивное окрашивание было выявлено в макрофагах (89,6%), в лимфоцитах (74,9%) и в эндотелиоцитах (59,5%) (Рисунок 34).

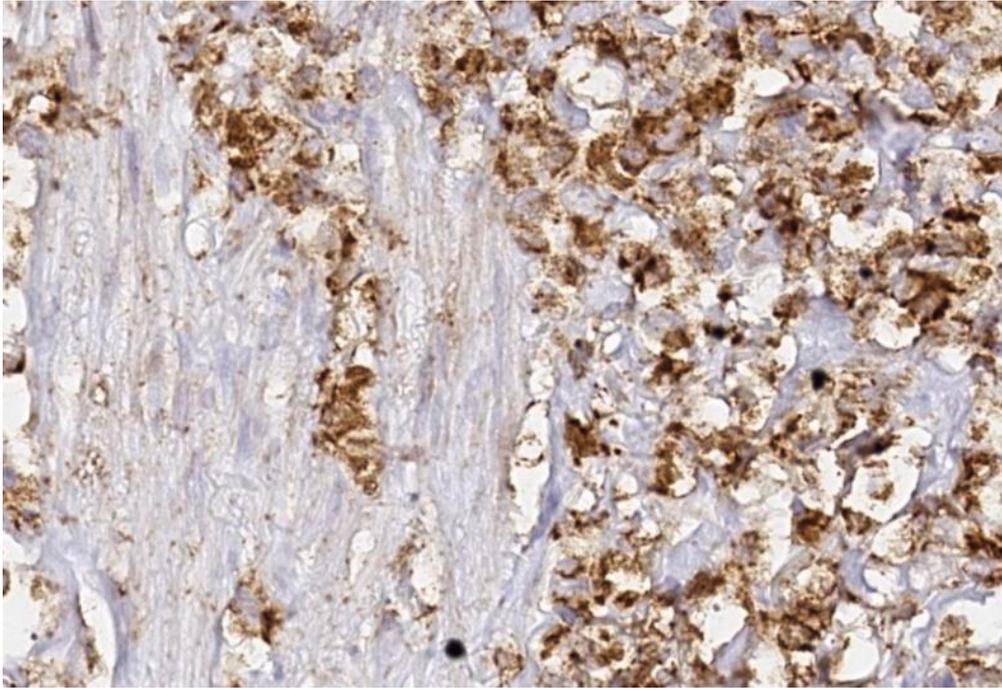


Рисунок 33 - Окрашивание макрофагов и лимфоцитов в участках воспалительной инфильтрации интерстиция. Антитела к CD63. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

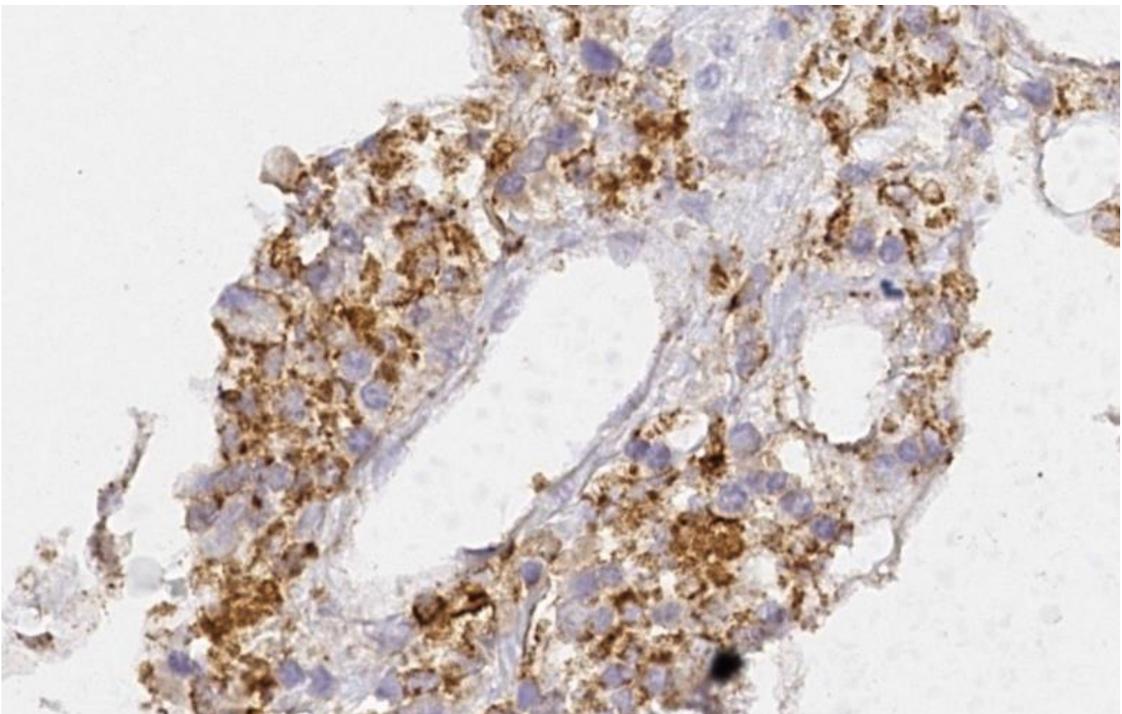


Рисунок 34 - Окрашивание макрофагов, лимфоцитов и эндотелиоцитов в очагах воспаления сосудистой стенки. Антитела к CD63. ДАБ, гематоксилин. Увеличение x400

3.6. Статистический анализ

При проведении корреляционного статистического анализа полученных результатов были обнаружены несколько заметных, сильных и очень сильных взаимосвязей (Рисунки 35-37, Таблицы 5-7). Для проведения корреляционного анализа были использованы следующие инструменты:

- расчёт коэффициента корреляции Пирсона;
- тепловые карты для визуализации результатов;
- расчёт статистической значимости полученных результатов (p-value);
- интерпретация результатов с помощью шкалы Чеддока.

Коэффициент корреляции Пирсона является мерой линейной связи между двумя переменными. Принимает значения от -1 до 1, где:

- -1 – отрицательная линейная корреляция между двумя переменными. То есть, чем больше одна переменная, тем меньше другая;
- 0 – отсутствие линейной корреляции между двумя переменными;
- 1 – положительная линейная корреляция между двумя переменными. То есть, чем больше одна переменная, тем больше другая.

Было рассмотрено 2 варианта проведения корреляционного анализа:

1. Сгруппируем данные по отдельным видам клеток;
2. Общий корреляционный анализ данных.

Для того, чтобы наглядно визуализировать полученные результаты с помощью тепловых карт, были использованы следующие сокращения:

- mcf – макрофаги;
- pnev – пневмоциты II типа;
- endo – эндотелиоциты;
- eks – ДАП, экссудация;
- prol – ДАП, пролиферация;
- ade – аденоматоз;
- cd63 – CD63;

- spike – Spike-протеин;
- nucleo – Nucleocapsid;

3.6.1. Корреляционный анализ при группировке по отдельным видам клеток

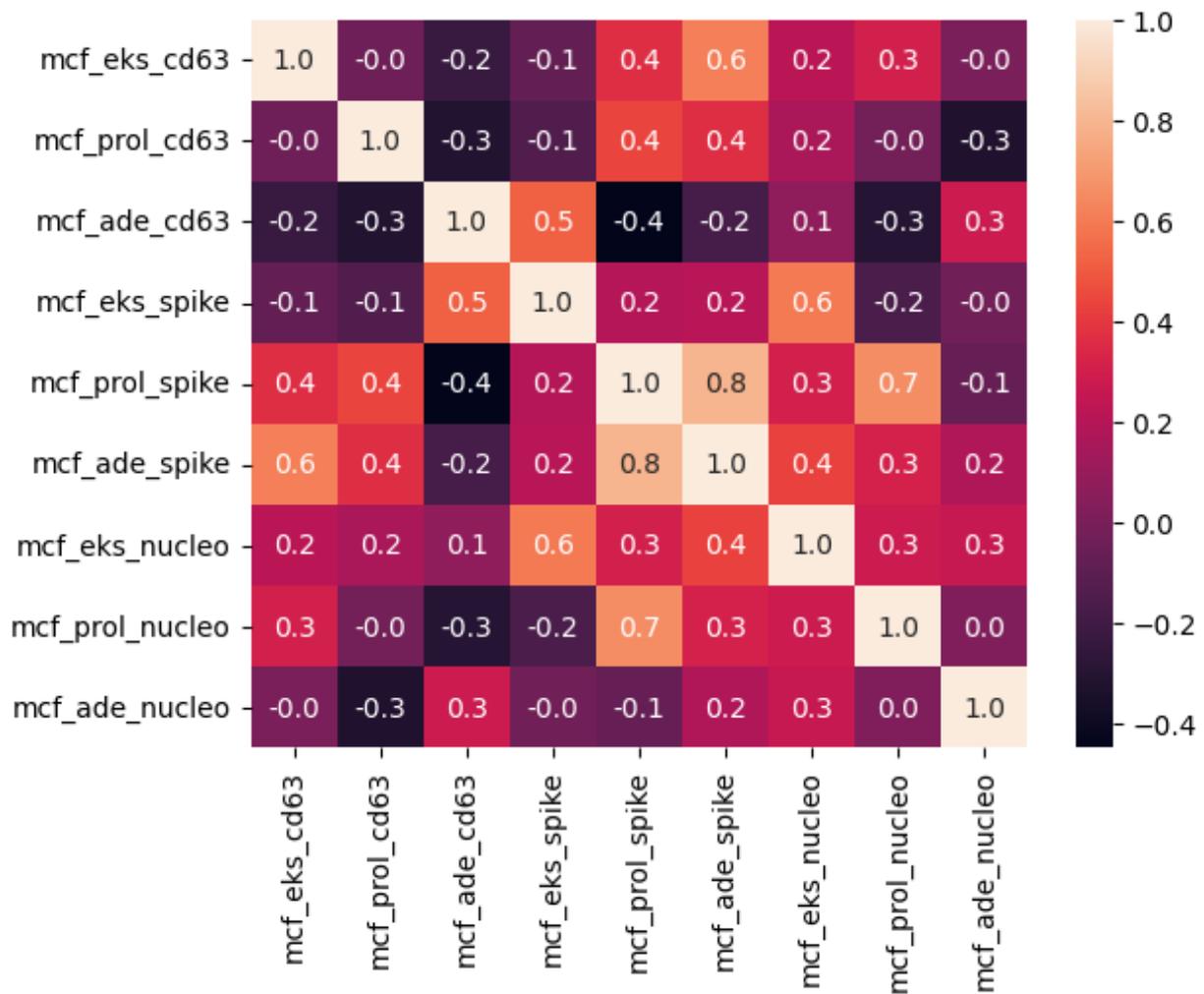


Рисунок 35 - Тепловая карта результатов корреляционного анализа при группировке по макрофагам

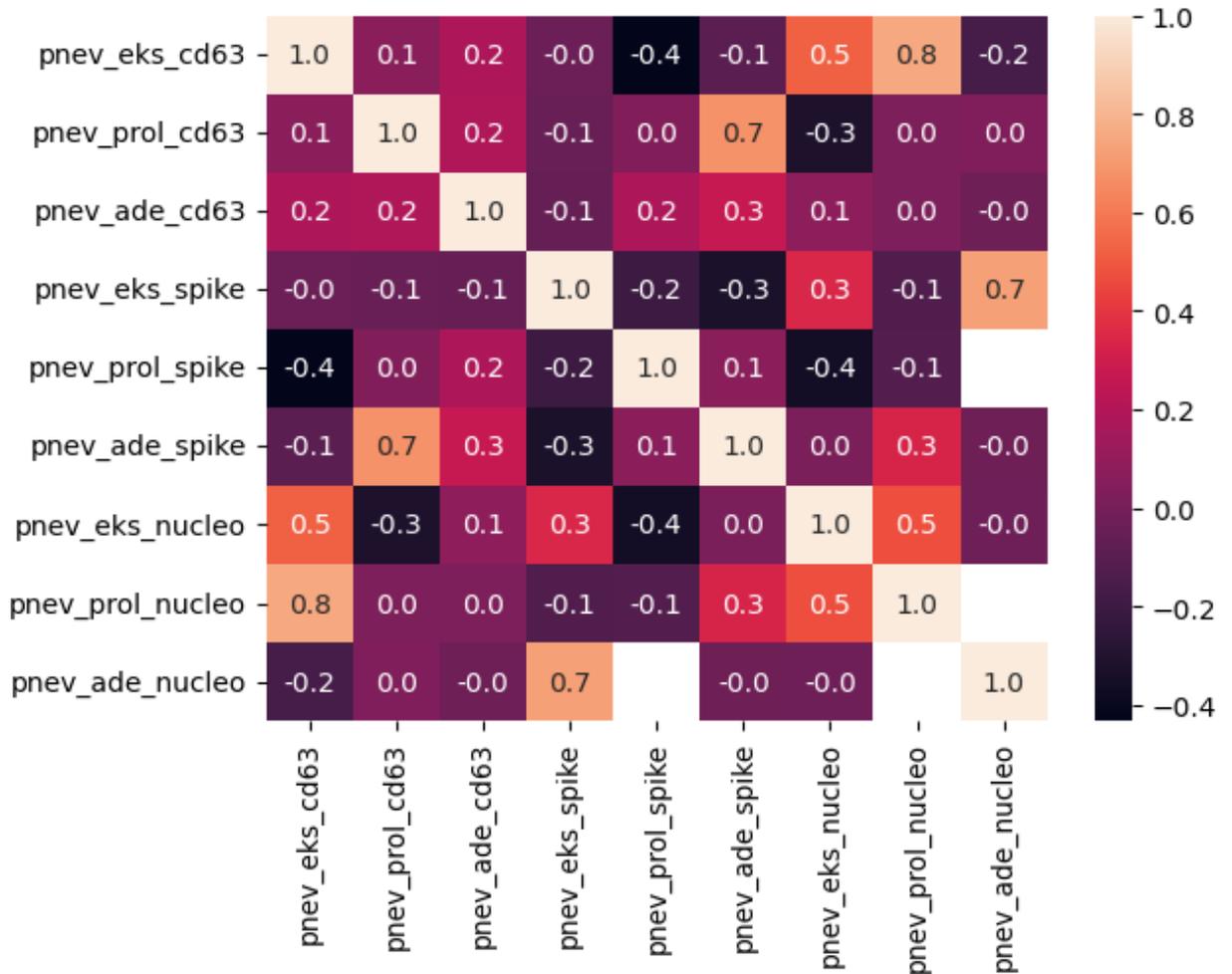


Рисунок 36 - Тепловая карта результатов корреляционного анализа при группировке по пневмоцитам II типа

Таблица 4 - Результаты корреляционного анализа при группировке по макрофагам

Первый признак	Второй признак	Коэффициент корреляции	Характеристика связи	Значимость
mcf_eks_cd63	mcf_ade_spike	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_eks_nukleo	mcf_eks_spike	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_prol_spike	mcf _prol_nucleo	0,7	Сильная	$p < 0,05$
mcf_prol_spike	mcf_ade_spike	0,8	Сильная	$p < 0,05$

Таблица 5 - Результаты корреляционного анализа при группировке данных по пневмоцитам II типа.

Первый признак	Второй признак	Коэффициент корреляции	Характеристика связи	Значимость
pnev_prol_cd63	pnev_ade_spike	0,7	Сильная	$p < 0,05$
pnev_eks_spike	pnev_ade_nucleo	0,7	Сильная	$p < 0,05$
pnev_eks_cd63	pnev_prol_nucleo	0,8	Сильная	$p < 0,05$

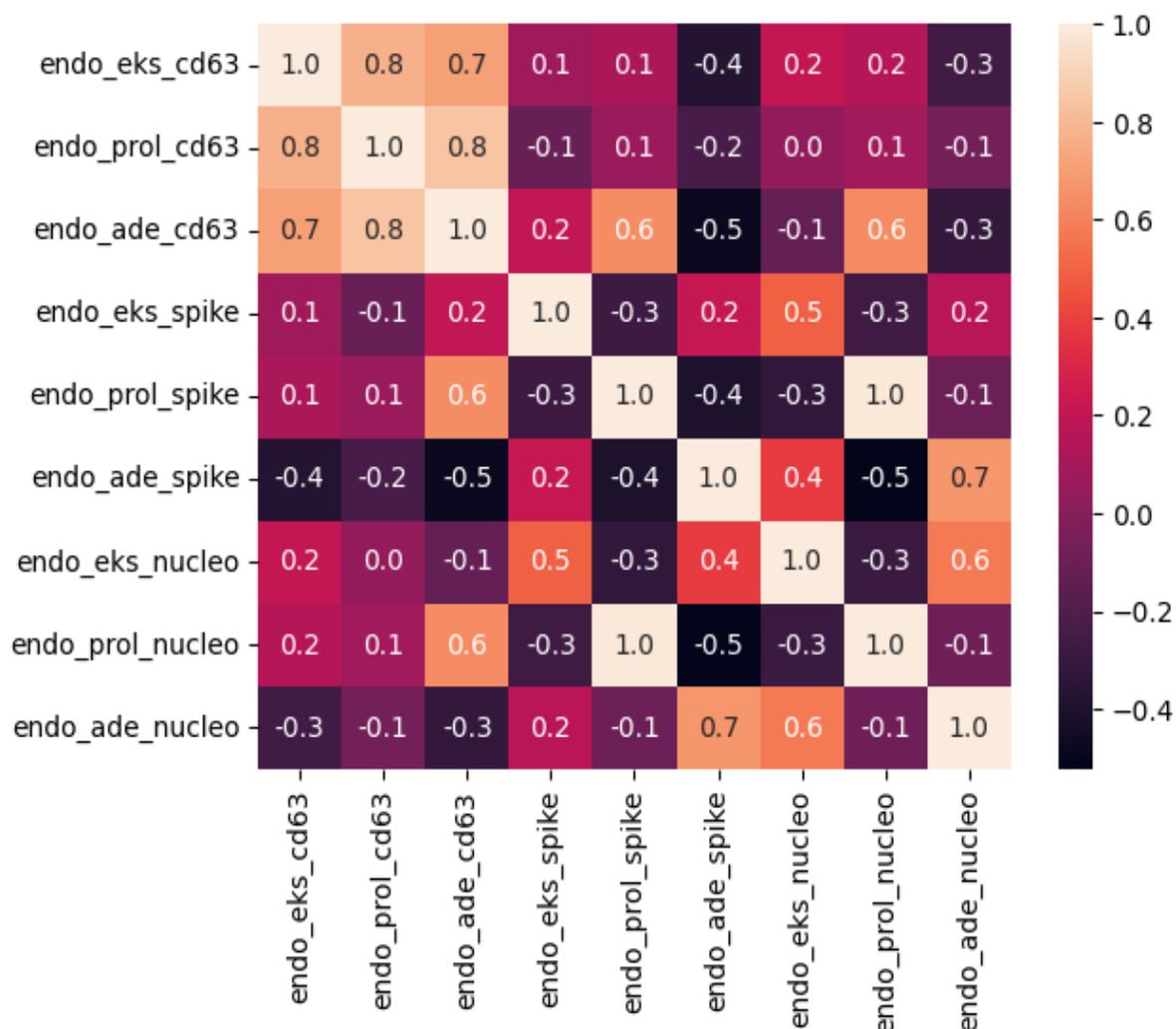


Рисунок 37 - Тепловая карта результатов корреляционного анализа при группировке по эндотелиоцитам

Таблица 6 - Результаты корреляционного анализа при группировке данных по эндотелиоцитам

Первый признак	Второй признак	Коэффициент корреляции	Характеристика связи	Значимость
endo_ade_cd63	endo_prol_nucleo	0,6	Заметная	$p < 0,05$

Продолжение Таблицы 6

endo_prol_spike	endo_ade_cd63	0,6	Заметная	$p < 0,05$
endo_eks_nucleo	endo_ade_nucleo	0,6	Заметная	$p < 0,05$
endo_ade_cd63	endo_eks_cd63	0,7	Сильная	$p < 0,05$
endo_ade_nucleo	endo_ade_spike	0,7	Сильная	$p < 0,05$
endo_prol_cd63	endo_eks_cd63	0,8	Сильная	$p < 0,05$
endo_prol_cd63	endo_ade_cd63	0,8	Сильная	$p < 0,05$
endo_prol_spike	endo_prol_nucleo	0,98	Очень сильная	$p < 0,05$

3.6.2. Общий корреляционный анализ

Значимые результаты общего корреляционного анализа вынесены в таблицу, исключая результаты, полученные при проведении корреляционного анализа с группировкой по отдельным видам клеток (Таблица 7).

Таблица 7 - Результаты общего корреляционного анализа

Первый признак	Второй признак	Коэффициент корреляции	Характеристика связи	Значимость
mcf_prol_cd63	pnev_eks_cd63	0,6	Заметная	$p < 0,05$
endo_eks_cd63	pnev_eks_cd63	0,6	Заметная	$p < 0,05$
pnev_prol_spike	mcf_ade_spike	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_prol_cd63	endo_prol_cd63	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_ade_cd63	endo_ade_cd63	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_eks_spike	pnev_ade_nucleo	0,6	Заметная	$p < 0,05$
mcf_prol_spike	pnev_prol_spike	0,7	Сильная	$p < 0,05$
pnev_prol_cd63	endo_eks_nucleo	- 0,7	Сильная	$p < 0,05$
mcf_prol_cd63	pnev_prol_spike	0,8	Сильная	$p < 0,05$
pnev_prol_spike	endo_eks_nucleo	- 0,8	Сильная	$p < 0,05$
endo_ade_spike	pnev_prol_nucleo	- 0,9	Очень сильная	$p < 0,05$

3.6.3. Графический и статистический анализ данных

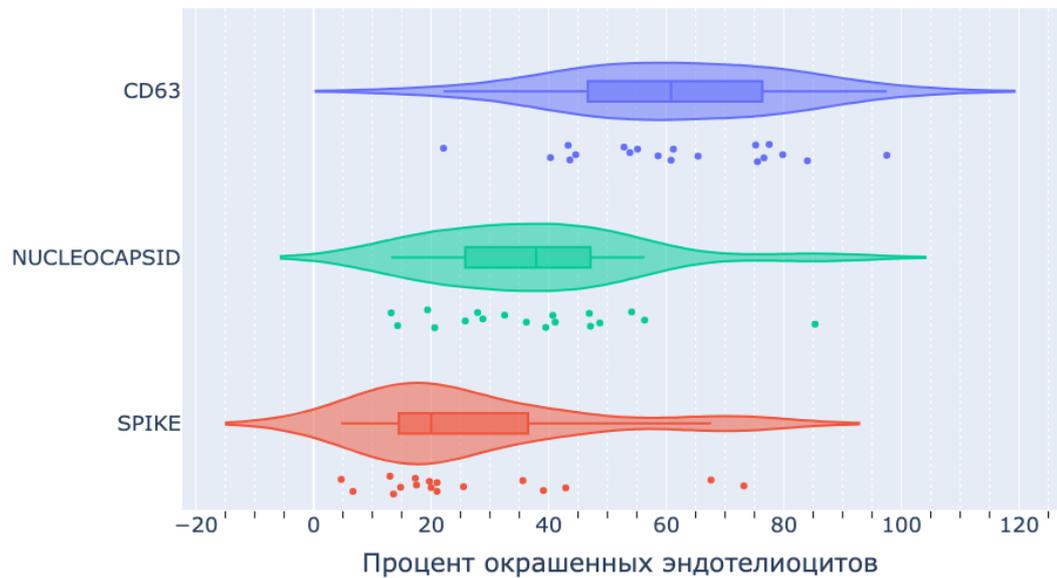


Рисунок 38 - Скрипичная диаграмма распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при аденоматозе в зависимости от антитела

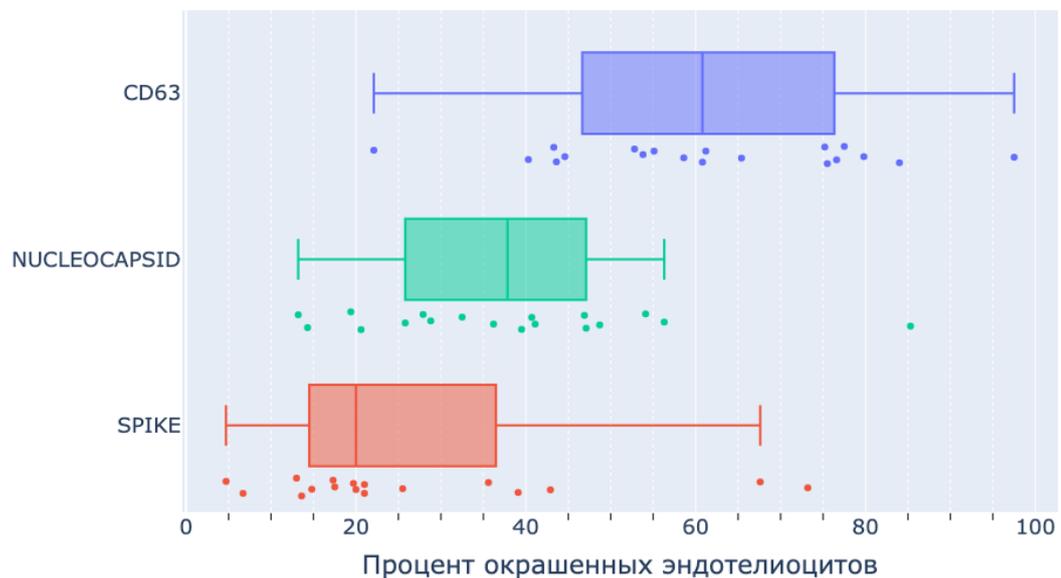


Рисунок 39 - Диаграмма размаха распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при аденоматозе в зависимости от антитела

Таблица 8 - Основные статистические показатели распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при аденоматозе в зависимости от антитела

Антитело	Всего	Мин	Макс	Среднее	Медиана	Ско*
CD63	19	22,1	97,5	61,5	60,8	18,5

Продолжение Таблицы 8

NUCLEOCAPSID	18	13,2	85,3	37,7	37,9	17,7
SPIKE	17	4,7	73,2	26,7	73,2	19,4

*- среднеквадратичное отклонение

При проведении графического и статистического анализа данных получены следующие результаты (Рисунки 38-41, Таблицы 8-9).

Используя непараметрический критерий Краскена-Уоллиса для распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при аденоматозе в зависимости от антитела и уровень статистической значимости 5%, получили p-value $p < 0,05$. В связи с чем, в данном случае, можно говорить о получении статистически значимого результата.

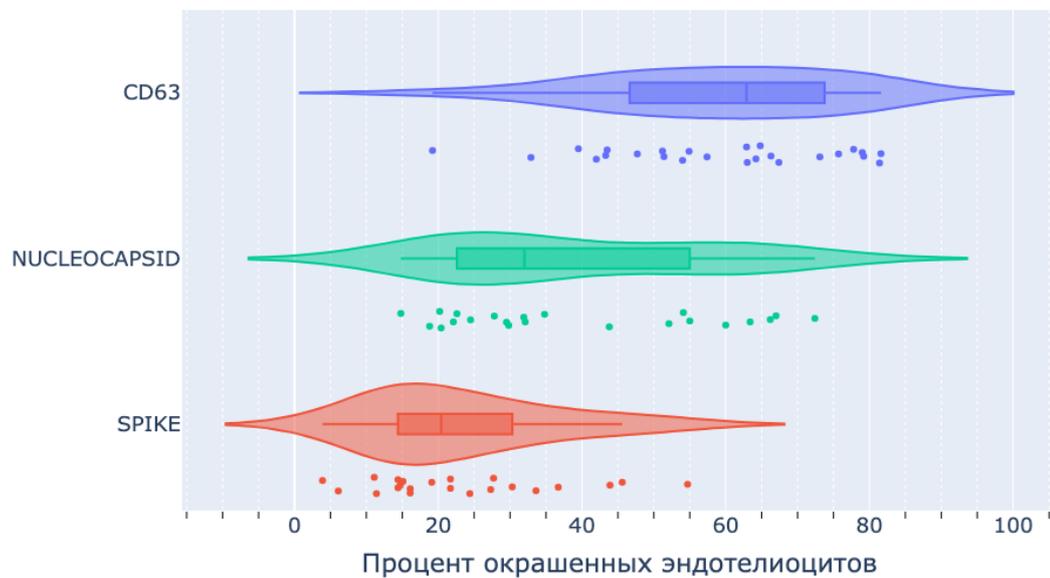


Рисунок 40 - Скрипичная диаграмма распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при ДАП в стадии экссудации в зависимости от антитела

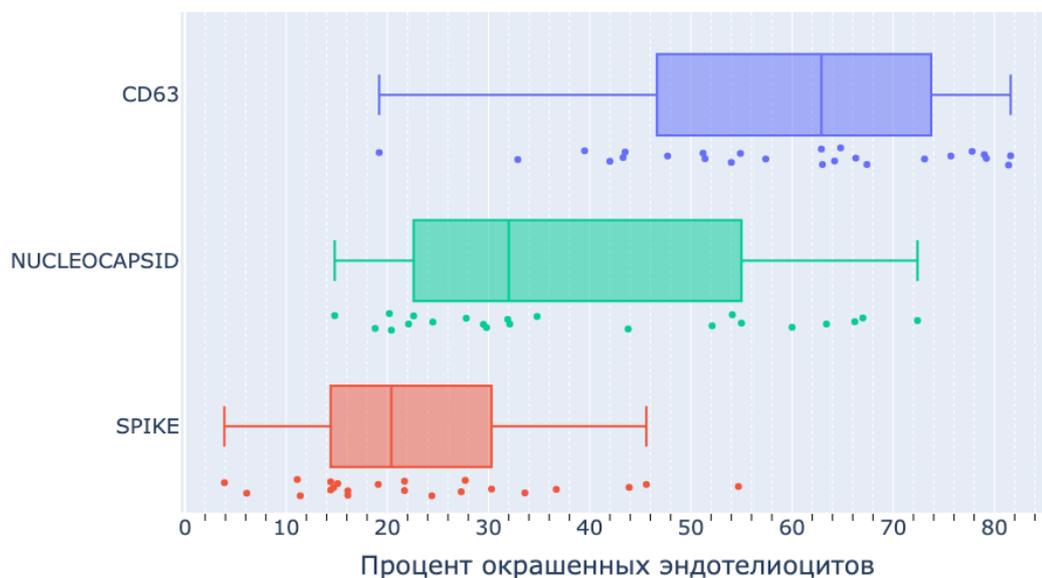


Рисунок 41 - Диаграмма размаха распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при ДАП в стадии экссудации в зависимости от антитела

Таблица 9 - Основные статистические показатели распределения доли окрашенных эндотелиоцитов при ДАП в стадии экссудации в зависимости от антитела

Антитело	Всего	Мин	Макс	Среднее	Медиана	Ско*
CD63	25	19,2	81,6	58,9	62,9	16,6
NUCLEOCAPSID	22	14,8	72,4	39,2	32,0	18,6
SPIKE	22	3,9	54,7	23,2	20,4	13,2

*- среднеквадратичное отклонение

3.6.4. Основные статистические показатели

При анализе основных статистических показателей получены следующие результаты (Таблицы 10-15, Рисунки 42-43).

Таблица 10 - Основные статистические показатели распределения доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против CD63

		Всего	Мин	Макс	Среднее	Медиана	Ско*
ДАП, экссудация	Макрофаги	25	79,8	99,5	94,8	96,2	4,8
	Пневмоциты 2 типа	25	67,1	98,6	86,3	87,5	8,6
	Эндотелиоциты	25	19,2	81,6	58,9	62,9	16,6
ДАП, пролиферация	Макрофаги	15	80,8	100,0	95,3	96,6	5,0
	Пневмоциты 2 типа	15	71,7	100,0	92,0	93,8	8,6
	Эндотелиоциты	15	29,7	89,5	62,2	70,8	19,7
Аденоматоз	Макрофаги	19	78,7	100,0	95,7	97,3	5,5
	Пневмоциты 2 типа	19	63,6	98,9	91,8	94,2	8,2
	Эндотелиоциты	19	22,1	97,5	61,5	60,8	18,5
Альвеолит	Макрофаги	19	79,2	98,4	91,6	92,5	4,4
	Лимфоциты	19	44,6	87,9	70,5	70,5	10,4
	Лейкоциты	12	100,0	100,0	100,0	100,0	0
	Эндотелиоциты	19	40,7	85,2	64,4	67,2	14,2
Васкулит	Макрофаги	9	75,7	96,9	90,5	90,8	6,2
	Эндотелиоциты	9	39,2	84,6	62,3	55,1	17,5
	Лимфоциты	9	63,6	82,8	73,8	73,3	6,4

*- среднеквадратичное отклонение

Таблица 11 - Основные статистические показатели распределения доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимической реакции антителами против вирусного белка SPIKE-протеина

		Всего	Мин	Макс	Среднее	Медиана	Ско*
ДАП, экссудация	Макрофаги	22	65,3	100,0	88,2	89,0	10,2
	Пневмоциты 2 типа	22	45,1	100,0	84,5	89,7	14,9
	Эндотелиоциты	22	3,9	54,7	23,2	20,4	13,2

Продолжение Таблицы 11

ДАП, пролиферация	Макрофаги	12	50,0	100,0	85,2	86,5	15,6
	Пневмоциты 2 типа	12	51,3	100,0	94,5	100,0	14,0
	Эндотелиоциты	12	19,8	100,0	71,6	100,0	35,8
Аденоматоз	Макрофаги	17	83,7	100,0	95,0	100,0	4,9
	Пневмоциты 2 типа	17	88,7	100,0	99,0	100,0	2,9
	Эндотелиоциты	17	4,7	73,2	26,7	73,2	19,4

*- среднеквадратичное отклонение

Таблица 12 - Основные статистические показатели распределения доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимической реакции антителами против вирусного белка NUCLEOCAPSID

		Всего	Мин	Макс	Среднее	Медиана	Ско*
ДАП, экссудация	Макрофаги	22	71,3	100,0	91,3	93,8	9,0
	Пневмоциты 2 типа	22	67,6	100,0	90,9	94,3	9,5
	Эндотелиоциты	22	14,8	72,4	39,2	32,0	18,6
ДАП, пролиферация	Макрофаги	12	61,5	100,0	92,8	97,9	11,1
	Пневмоциты 2 типа	12	98,9	100,0	99,9	100,0	0,3
	Эндотелиоциты	12	23,1	100,0	74,9	100,0	31,9
Аденоматоз	Макрофаги	18	85,4	100,0	95,7	97,4	4,8
	Пневмоциты 2 типа	18	95,2	100,0	99,7	100,0	1,1
	Эндотелиоциты	18	13,2	85,3	37,7	37,9	17,7

*- среднеквадратичное отклонение

Таблица 13 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против CD63

		Среднее	95% доверительный интервал
ДАП, экссудация	Макрофаги	94,8	92,8 – 96,8
	Пневмоциты 2 типа	86,3	82,7 – 89,8
	Эндотелиоциты	58,9	52,1 – 65,8
ДАП, пролиферация	Макрофаги	95,3	92,5 – 98,0
	Пневмоциты 2 типа	92,0	87,2 – 96,8
	Эндотелиоциты	62,2	51,3 – 73,1
Аденоматоз	Макрофаги	95,7	93,0 – 98,3
	Пневмоциты 2 типа	91,8	87,9 – 95,8
	Эндотелиоциты	61,5	52,6 – 70,4
Альвеолит	Макрофаги	91,6	89,6 – 93,7
	Лимфоциты	70,5	65,5 – 75,5
	Лейкоциты	100,0	-
	Эндотелиоциты	64,4	57,6 – 71,2
Васкулит	Макрофаги	90,5	85,7 – 95,3
	Эндотелиоциты	62,3	48,8 – 75,7
	Лимфоциты	73,8	68,9 – 78,7

Средняя доля окрашенных клеток антителами против SPIKE-протеина в % при разных вариантах поражения

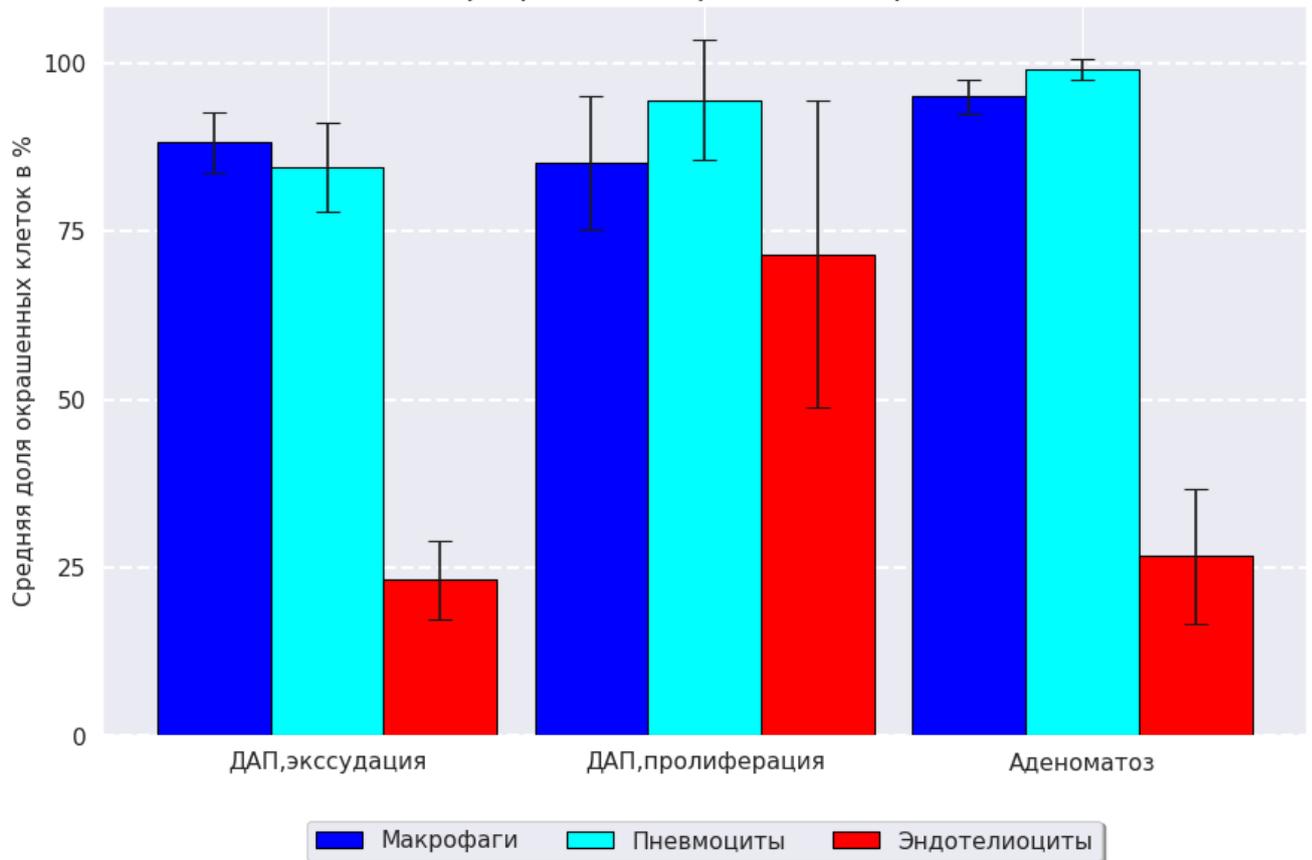


Рисунок 42 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против SPIKE-протеина

Таблица 14 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против SPIKE-протеина

		Среднее	95% доверительный интервал
ДАП, экссудация	Макрофаги	88,2	83,6 – 92,7
	Пневмоциты 2 типа	84,5	77,9 – 91,1
	Эндотелиоциты	23,2	17,3 – 29,0
ДАП, пролиферация	Макрофаги	85,2	75,3 – 95,1
	Пневмоциты 2 типа	94,5	85,6 – 103,4
	Эндотелиоциты	71,6	48,9 – 94,4

Продолжение Таблицы 14

Аденоматоз	Макрофаги	95,0	92,4 – 97,5
	Пневмоциты 2 типа	99,0	97,5 – 100,5
	Эндотелиоциты	26,7	16,7 – 36,7

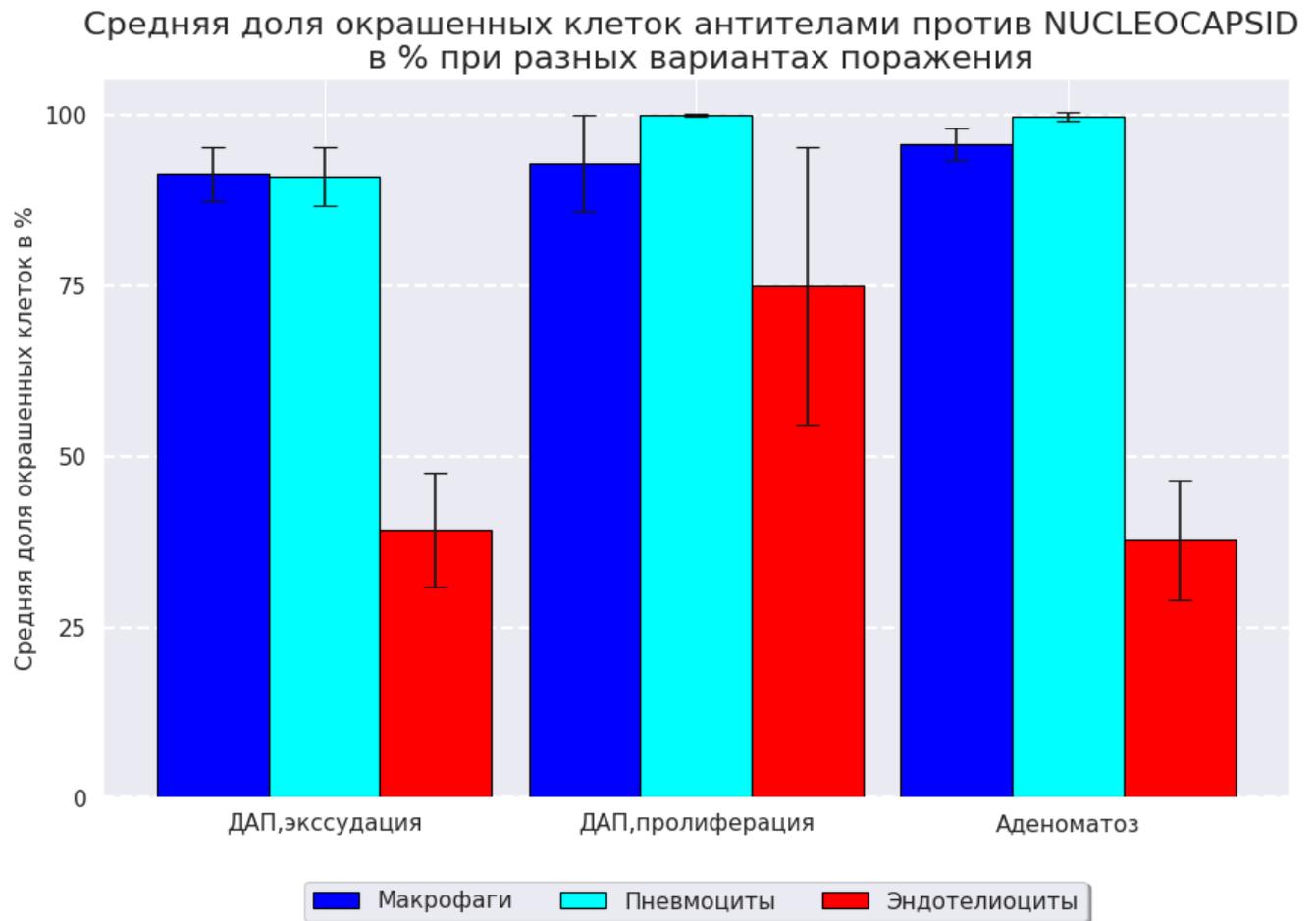


Рисунок 43 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против NUCLEOCAPSID

Таблица 15 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток в зависимости от заболевания при иммуногистохимическом окрашивании антителами против NUCLEOCAPSID

		Среднее	95% доверительный интервал
ДАП, экссудация	Макрофаги	91,3	87,3 – 95,3
	Пневмоциты 2 типа	90,9	86,7 – 95,1
	Эндотелиоциты	39,2	31,0 – 47,5
ДАП, пролиферация	Макрофаги	92,8	85,8 – 99,9
	Пневмоциты 2 типа	99,9	99,7 – 100,1
	Эндотелиоциты	74,9	54,6 – 95,2
Аденоматоз	Макрофаги	95,7	93,4 – 98,1
	Пневмоциты 2 типа	99,7	99,1 – 100,3
	Эндотелиоциты	37,7	28,9 – 46,5

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании проведен анализ аутопсийного материала от 118 пациентов, умерших от COVID-19 во 2 и 3 волны пандемии в г. Москва (в период с октября 2020 г по январь 2022 г.). На момент начала исследования в мировой литературе имелись лишь единичные работы, посвященные изучению межклеточным взаимодействиям, а также анализу роли внеклеточных везикул в этих коммуникациях. На сегодняшний день количество подобных работ увеличилось, однако, все они имеют разрозненный характер, рассматривая внеклеточные везикулы, синтезируемые отдельно взятыми клетками, и теряя существенную нить комплексного взгляда на патологический процесс. Помимо этого, вышеописанные исследования не акцентируют взгляд на потенциальных возможностях исследования внеклеточных везикул в рутинной патологоанатомической практике.

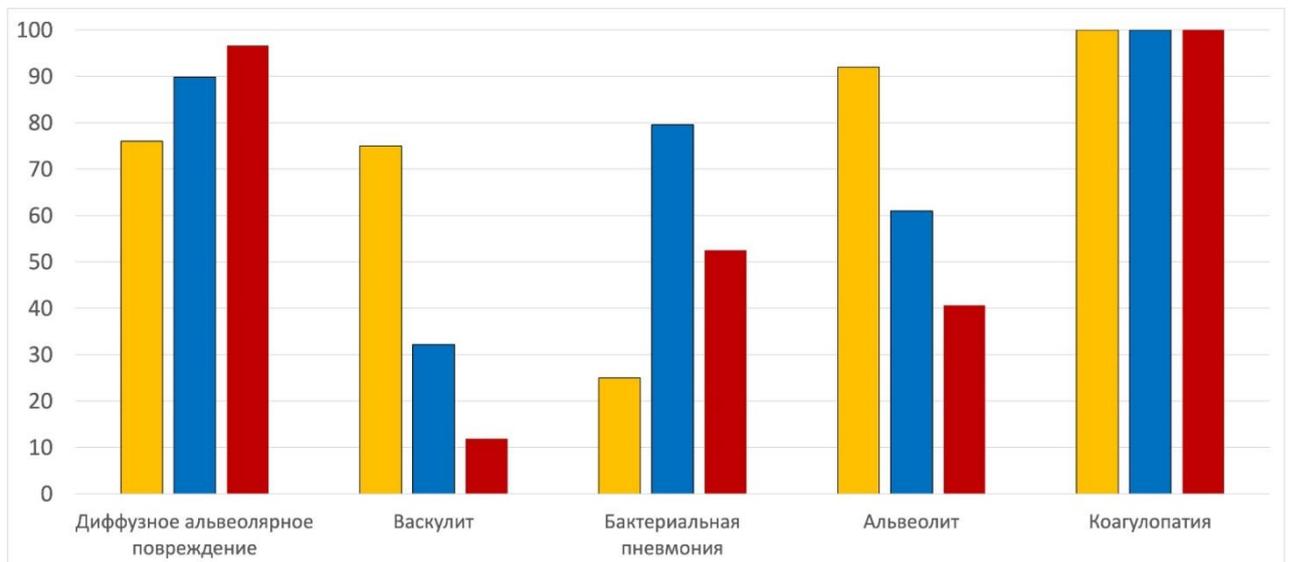


Рисунок 44 - Частота встречаемости различных вариантов поражения легких у умерших в 1 (по данным литературы), 2 и 3 волны в г. Москва, в % от общего числа исследуемых случаев. Желтый – у умерших в 1 волну, синий - во 2 волну, красный – в 3 волну

Клинико-морфологический анализ вариантов поражения ткани легких.

Клинико-морфологический анализ летальных случаев SARS-CoV-2 инфекции показал, что непосредственной причиной смерти чаще всего являлось ДАП, а летальный исход наступал на 8-28 сутки заболевания, что должно служить поводом к повышенному вниманию к пациентам, у которых данное состояние диагностируется клинически в виде ОРДС особенно в этот период заболевания.

В различные волны встречаемость разных форм поражения легких отличалась. Это особенно отчетливо заметно при сравнении с данными отечественной литературы, в которых производился анализ поражения ткани легких в 1-ую волну пандемии (Рисунок 44) [10]. В первую очередь с точки зрения клинической значимости наиболее важным вариантом поражения легких является ДАП, который встречался в подавляющем большинстве случаев. Клиническое течение пациентов с ДАП (клинически – ОРДС) сопровождается развитием дыхательной недостаточности различной степени тяжести и может быть потенциальной причиной для перевода пациента в отделение реанимации и интенсивной терапии с подключением к лечению аппарата искусственной вентиляции легких. Помимо этого, ДАП является самой частой непосредственной причиной смерти среди всех исследованных случаев. Наблюдение о том, что ОРДС является ключевым вариантом поражения легких, приводящим к летальному исходу, тоже находит свое подтверждение и в зарубежной литературе [97]. Также интересным является наблюдение несоответствия морфологических фаз ДАП и длительности заболевания: при затяжном течении болезни обнаруживались признаки, соответствующие стадии экссудации, а на самых ранних стадиях болезни могли быть обнаружены признаки миофибробластических изменений. Подобные наблюдения подтверждаются и другими исследованиями [98].

Еще одним ключевым патологическим процессом, который наблюдается в ткани легких, является особый вариант ДВС-синдрома, который называется COVID-ассоциированная коагулопатия. Признаки данного состояния были обнаружены во всех исследованных случаях всех волн (100%). Особенность

COVID-ассоциированной коагулопатии заключается в преобладании фазы гиперкоагуляции, результатом которой являются тромбообразование и инфаркты внутренних органов, в том числе и легких, что было отмечено при макроскопическом исследовании в отдельных случаях. Помимо этого, в зарубежных работах имеются доказательства того, что тромботические явления у пациентов с тяжелой формой COVID-19 могут вовлекать легочные и другие крупные артерии, что приводит к серьезному вентиляционно-перфузионному расстройству в легких и периферическим ишемическим явлениям, усугубляя дыхательную недостаточность [99,100]. Расстройство системы коагуляции и кровообращения при коронавирусной инфекции особенно выражено у пациентов с сочетанной онкологической патологией. При данном развитии событий оба заболевания могут отягощать течение друг друга, приводя к летальным осложнениям [101].

Альвеолит был обнаружен в 92% случаев 1 волны, что существенно выше, чем в последующих волнах. Данное наблюдение может являться следствием различных подходов к терапии пациентов с тяжелыми формами COVID-19 и добавлением высоких доз глюкокортикостероидов в последующие волны, имеющее положительный эффект в отношении снижения частоты данных вариантов поражения легких. При гистологическом исследовании аутопсийного материала признаки альвеолита в большинстве случаев наблюдались в отдельно взятых полях зрения, количество которых не превышало 39 из 100, что может говорить о малом объеме поражения, а характер инфильтрации был очаговый. В 3 волну признаки альвеолита встречались еще реже (в 24 случаях), а площадь поражения была еще меньше - не чаще чем в 29 полях зрения из 100 исследованных.

Бронхопневмония была выявлена в 25% случаев во время 1 волны [10]. Количество случаев присоединения вторичной флоры разнится от волны к волне и, скорее всего, является не особенностью отдельных штаммов SARS-CoV-2, а особенностью отдельных взятых пациентов. Несмотря на более низкую

встречаемость бактериальной пневмонии в 3 волну, сепсис чаще являлся непосредственной причиной смерти, что может быть связано как с наличием других инфицированных источников в организме, так и возможными особенностями вирусных частиц в отношении запуска механизмов сепсиса, однако данная концепция до сих пор не нашла своего подтверждения.

Интерстициальный фиброз, который встречался в достаточно большом количестве наблюдений, не коррелировал с длительностью заболевания: как уже было сказано выше миофибробластические изменения определялись с самых первых дней болезни, а при затяжном течении подобные изменения могли и полностью отсутствовать. Клиническая значимость подобных находок все еще является объектом научного интереса, так как у отдельных пациентов наблюдались признаки формирования «сотового» легкого, что может привести к серьезному ухудшению жизни, инвалидизации и в долгосрочной перспективе к летальному исходу. Вышесказанные наблюдения указывают на важность дальнейшего исследования причин, механизмов, определения методов диагностики и терапии COVID-ассоциированного фиброза.

Особенности клеточной локализации вирусных белков и внеклеточных везикул.

При ИГХ исследовании локализация вирусных белков при различных вариантах поражения легких была обнаружена в одних и тех же клетках, что может свидетельствовать о широкой тропности вируса и наличии единых звеньев в цепочках патогенеза различных вариантов поражения легких вне зависимости от изученных волн COVID-19. Самое частое и самое интенсивное накопление белков было выявлено в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах II типа и эндотелиоцитах, что может объясняться непосредственной тропностью вируса к вышеуказанным клеткам и их участием на различных этапах в патогенезе COVID-19. По данным литературы важную роль в патогенезе ДАП при коронавирусной инфекции играют альвеолярные макрофаги [102], которые в первую очередь контактируют с вирусными частицами, поступающими аэрогенным механизмом,

что подтверждается крайне высокой частотой окрашивания этих клеток при различных формах поражения легких, достигая 100% значений при затяжном течении диффузного альвеолярного повреждения. В фазе пролиферации ДАП было выявлено окрашивание всех (100%) исследованных пневмоцитов II типа, что указывает на их непосредственную роль в патогенезе COVID-19, что так же подтверждается данными из литературы [103].

Большую роль играют и эндотелиоциты [104], окрашивание которых наблюдалось во всех исследованных случаях, но в меньшей частоте. Эндотелиоциты могут выступать как самостоятельные звенья в механизмах развития COVID-19, а также как возможный источник гематогенной диссеминации вирусных частиц.

В совокупности с данными о том, что различные формы поражения легких могут встречаться изолированно друг от друга, можно судить о различных путях проникновения вируса в ткань легких: либо аэрогенно с развитием ДАП или острой интерстициальной пневмонии, либо гематогенно с развитием тромбоваскулитов и коагулопатии. Коагулопатия встречалась в 100% случаев, что, в совокупности с наличием вирусных белков в гиалиновых мембранах, так же может свидетельствовать о первостепенности поражения сосудистого русла с дальнейшим распространением вирусных частиц из просветов сосудов в альвеолярные пространства, что, в свою очередь, позволяет рассматривать COVID-19 как не просто респираторную инфекцию, а как системный сосудистый инфекционный процесс, полное понимание патогенеза которого требует дальнейших наблюдений и тщательного анализа. Подобные суждения находят свое отражение в зарубежной литературе, а отдельные авторы и вовсе рассматривают COVID-19 как «сосудистое заболевание» [72].

При анализе микропрепаратов с антителами против CD63 были выявлены ключевые клетки-продуценты ВКВ при COVID-19: макрофаги, пневмоциты 2 типа, эндотелиоциты, лимфоциты, лейкоциты (Рисунок 45). В аналогичных

клетках определялись и вирусные белки. Характер окрашивания белков везикул и вирусных белков схожий: окрашивание наблюдали в субапикальных отделах цитоплазмы клеток в гранулярном виде. Обнаружение внеклеточных везикул и белков вируса в одних и тех же клетках при всех вариантах поражения легких позволяют судить о непосредственной роли внеклеточных везикул в межклеточных взаимодействиях в патогенезе COVID-19.

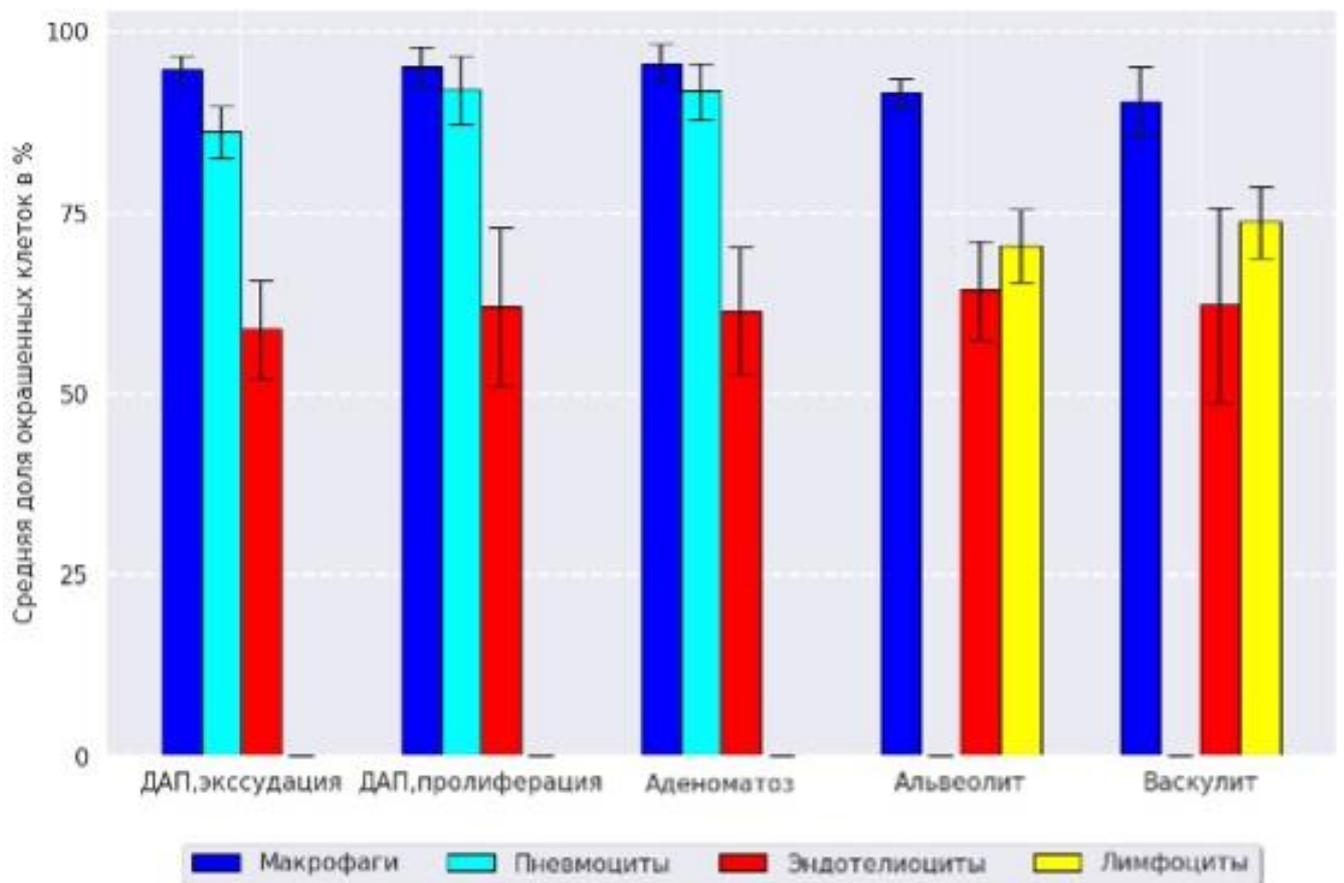


Рисунок 45 - Среднее и 95% доверительный интервал доли окрашенных клеток антителами против CD63 при разных вариантах поражения легких

Роль внеклеточных везикул в межклеточных взаимодействиях в патогенезе различных форм поражения легких при COVID-19.

Одним из важнейших вариантов поражения легких при COVID-19 является диффузное альвеолярное повреждение, патогенез которого напрямую зависит от внеклеточных везикул. Антигены микроорганизмов или эндогенные молекулы, связанные с повреждением клеток (danger- or pathogen-associated molecular

patterns), которые могут секретироваться с помощью экзосом, взаимодействуя с Toll-подобными рецепторами пневмоцитов и альвеолярных макрофагов, активируют врожденную иммунную систему и приводят к повышению проницаемости сосудов и активации нейтрофилов [64,65]. Повреждение альвеолоцитов приводило к повышению продукции ими экзосом и микровезикул с дальнейшей активацией макрофагов, синтезирующих провоспалительные вещества, такие как воспалительный протеин макрофагов 2 (MIP-2), привлекающих и активирующих в ткани легких нейтрофилы [68]. Нейтрофилы являются авангардом неспецифического иммунного ответа, активация которых на ранних этапах ДАП приводит к повреждению эпителиоцитов, повышению проницаемости и отеку. На начальных этапах ДАП лейкоциты и макрофаги действуют содружественно, запуская каскад провоспалительных механизмов, однако, было показано, что в дальнейшем нейтрофилы с помощью секреции везикул могут осуществлять обратный, противовоспалительный эффект, и ускорять репарацию тканей [68]. Макрофаги, как полагается, являются основным продуцентом внеклеточных везикул не только при COVID-19, но и при других инфекционных процессах [105]. В нашем исследовании мы обнаружили внеклеточные везикулы в цитоплазме и на поверхности макрофагов при всех формах поражения легких, а среднее число окрашенных макрофагов было наибольшим среди прочих исследованных клеток (рисунок 36). Также было показано, что макрофаги, содержащие вирусные частицы, могут способствовать распространению SARS-CoV-2 в легких, приводя к инфицированию других клеточных популяций и дальнейшему распространению возбудителя в организме хозяина [81]. Генерализация SARS-CoV-2 будет способствовать взаимодействию с адаптивной иммунной системой организма и формированию иммунитета.

Во все фазы ДАП и при аденоматозе ВКВ выявлены в пневмоцитах 2 типа. В некоторых наблюдениях с ДАП число окрашенных клеток в нашем исследовании достигало 100%, а в очагах плоскоклеточной метаплазии это число и интенсивность окрашивания заметно снижались. При исследовании наблюдений с

аденоматозом было выявлено, что пневмоциты II типа активно участвуют в продукции ВКВ, так как среднее число окрашенных клеток достигало 92,1%, а яркость окрашивания была заметно выше, чем в очагах плоскоклеточной метаплазии. Вероятно, пневмоциты II типа могут выполнять двойную роль: быть активным участником регуляции воспаления, активируя макрофаги в начальных этапах с помощью синтеза ИФН-у, а затем, в случаях метаплазии, в связи с сохранением в их цитоплазме вирусных частиц, выступать в качестве инертной «тюрьмы». Стоит полагать, что пневмоциты II типа могут участвовать в хронизации процесса и потенциальном развитии постковидного синдрома.

Еще одними основными продуцентами ВКВ являются эндотелиоциты [28]. В мировой литературе и в нашем исследовании было показано, что вирусные частицы находились внутри эндотелиальных клеток, но в настоящее время неясно, поддерживают ли эти клетки репликацию вируса *in vivo* и способствует ли инфицирование этих клеток тяжести заболевания [106]. Однако, течение коронавирусной инфекции у большинства пациентов, особенно в летальных случаях, сопровождалось серьезными, порой жизнеугрожающими, сосудистыми осложнениями: от синдрома гиперкоагуляции с ишемическими повреждениями внутренних органов и синдромом полиорганной недостаточности до геморрагического синдрома. Наличие ACE2 на эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках и периваскулярных перицитах почти во всех органах указывает на то, что SARS-CoV-2 может легко диссеминировать по всему организму после попадания в систему кровообращения [107]. Секреция ВКВ эндотелиальными клетками оказывает провоспалительный эффект, приводя к повреждению межклеточных контактов, активации нейтрофилов, которые путем NETоза могут вновь повреждать эндотелиоциты, замыкая порочный круг [28,108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на официальное окончание пандемии вопрос поражения легких COVID-19 является объектом научного интереса ввиду разнообразия патологических процессов, встречающихся в ткани легких. В нашем исследовании мы показали наличие нескольких вариантов поражения легких, которые имеют как уникальные, так и общие звенья патогенеза. Поражение легких при инфекции SARS-CoV-2 может проявляться в виде ДАП, лимфоцитарного альвеолита, тромбоваскулита, COVID-ассоциированной коагулопатии, интерстициального фиброза, которые могут являться как самостоятельными формами поражения, так и представлять собой единую цепочку патогенеза поражения легких. Данные варианты поражения легких встречались в течение всех исследованных волн в похожем соотношении за исключением альвеолита, частота встречаемости которого была наибольшей в первые волны. Постепенное снижение удельного веса данного варианта по отношению к остальным от волны к волне, вероятнее всего, обусловлено более совершенным подходом к терапии пациентов, страдающих от COVID-19, в том числе в виде добавления и увеличения дозировки глюкокортикостероидов. Более подробное изучение всех вариантов поражения легких приведет к более углубленному пониманию клинической картины пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, к совершенствованию методов диагностики для более точного прогноза заболевания и более эффективного лечения пациентов.

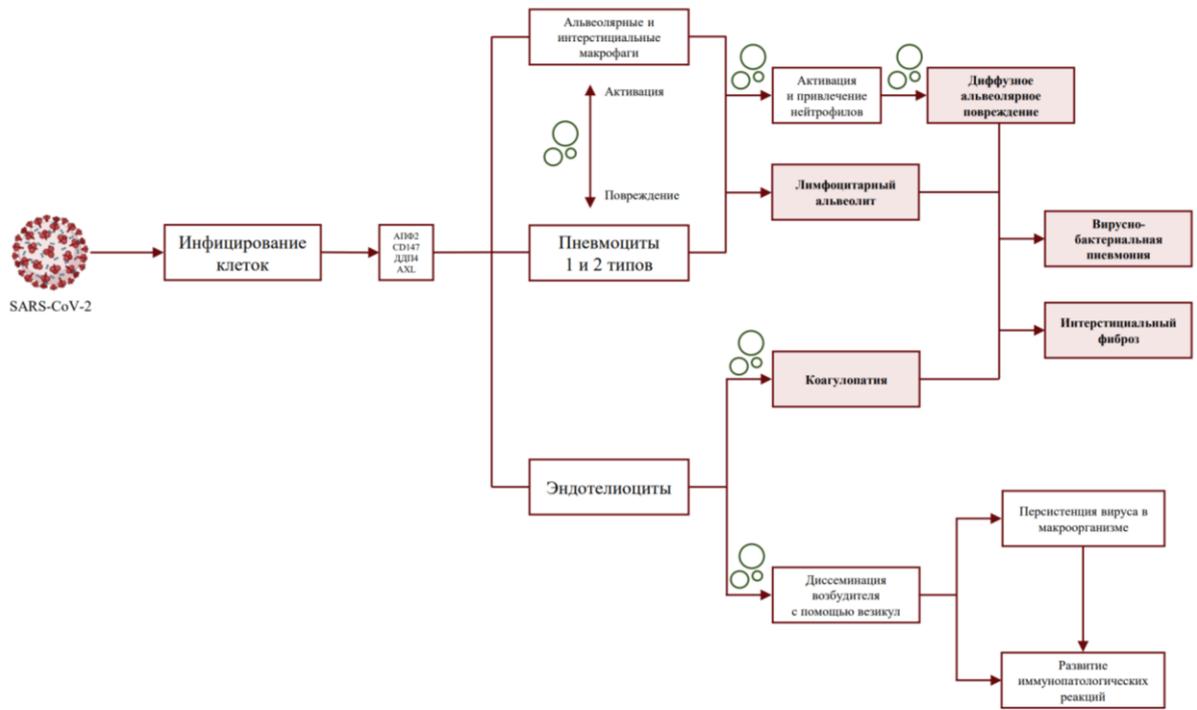
Среди исследованных случаев чаще всего встречались признаки COVID-ассоциированной коагулопатии, однако, доминирующей непосредственной причиной смерти явился ДАП. Наиболее часто смерть наступает в период с 8 по 28 дни заболевания, что свидетельствует о необходимости ранней диагностики той или иной формы поражения легких для раннего старта терапевтических манипуляций и минимизации тяжелых форм течения болезни и летальных исходов.

Понимание клеточной локализации вирусных белков имеет важное

теоретическое и практическое значения. Обнаружение их в основных клетках-регуляторах врожденного иммунитета доказывает факт потенциального развития иммунопатологических процессов, включающих в себя реакции гиперчувствительности, а, при затяжном течении, и иммунодефицитных состояний. Обнаружение вирусных белков в эндотелиоцитах говорит о возможной гематогенной диссеминации возбудителя и показывает более вероятным гемоконтактный механизм передачи возбудителя. Выявление вирусных белков в клетках воспаления и эндотелиоцитах после перенесенной коронавирусной инфекции может свидетельствовать о развитии постковидного синдрома, ассоциированного с длительной персистенцией вируса в макроорганизме. Применение подобных знаний в рутинной патологоанатомической практике позволит прогнозировать расстройства иммунной системы у пациентов с COVID-19 на материале с парафиновых блоков.

Обнаружение вирусных белков в клетках, содержащих внеклеточные везикулы доказывает факт участия ВКВ в патогенезе различных форм поражения легких. Таким образом, с учетом результатов ИГХ основными участниками в патогенезе коронавирусной инфекции являются альвеолярные пневмоциты II типа, макрофаги, эндотелиоциты, лимфоциты и лейкоциты. Обнаружение вирусных частиц в этих клетках при всех формах поражения может свидетельствовать о перекрестных механизмах патогенеза и широкой тропности вируса. Наличие клеточных белков в вышеописанных клетках на поздних стадиях заболевания может являться потенциальной причиной дальнейшего развития постковидного синдрома, однако, необходимы дальнейшие исследования.

Полученные результаты в виде идентичной клеточной локализации вирусных белков и ВКВ, а также схожих характеристиках их окрашивания, доказывают роль внеклеточных везикул в межклеточных взаимодействиях в развитии поражения легких COVID-19 (Рисунок 46), что дополняет имеющиеся знания о патогенезе новой коронавирусной инфекции (109).



 - Внеклеточные везикулы.

Рисунок 46 - Схема патогенеза поражения легких при COVID-19

ВЫВОДЫ

1. Основными вариантами поражения легких при COVID-19 являются диффузное альвеолярное повреждение, лимфоцитарный альвеолит, тромбоваскулит, ДВС-синдром, вирусно-бактериальная пневмония, интерстициальный фиброз. Наиболее важной формой поражения легких с точки зрения летального исхода является диффузное альвеолярное повреждение, которое явилось непосредственной причиной смерти в 54,2% наблюдений во время 2 волны и в 27,11% случаев во время 3 волны.
2. Диффузное альвеолярное повреждение, лимфоцитарный альвеолит, тромбоваскулит, COVID-ассоциированная коагулопатия являются самостоятельными формами поражения легких. Бактериальная пневмония и интерстициальный фиброз развивались на различных стадиях заболевания и являются вторичными состояниями по отношению к другим формам поражения легких. Вышеописанные варианты поражения легких встречались во всех исследованных волнах.
3. Признаки коагулопатии обнаруживались во всех (100%) исследованных случаях. Морфологические признаки диффузного альвеолярного повреждения в фазу экссудации были обнаружены в 89,8% случаях 2 волны и практически во всех случаях 3 волны (96,6%). Признаки пролиферативной фазы ДАП были выявлены в 59,4% случаев 2 волны и в 54,3% случаев 3 волны. Тромбоваскулит был зарегистрирован в 32,2% случаев 2 волны и лишь в 11,9% случаев 3 волны. В 61% случаев 2 волны наблюдались признаки альвеолита, в 3 волну частота встречаемости была ниже - 40,7%. Различия частоты встречаемости ДАП и тромбоваскулита незначительна. Однако, частота встречаемости альвеолита снижалась в течение последующих волн, что может быть обусловлено совершенствованием медицинских воздействий с повышением дозировки глюкокортикостероидов.
4. Основными клетками ткани легких, в которых содержатся белки вируса

SARS-CoV-2 (Spike-протеин, Nucleocapsid) при различных вариантах поражения легких являются макрофаги, пневмоциты, эндотелиоциты, лейкоциты. Вирусные белки также обнаружены в бронхиальном эпителии, мезотелии, гигантских многоядерных клетках типа инородных тел. В случаях с ДАП (фаза экссудации и пролиферации) Spike-протеин и Nucleocapsid были обнаружены в подавляющем большинстве макрофагов, в пневмоцитах 2 типа и в эндотелиоцитах. В случаях с зонами аденоматоза доля окрашенных клеток антителами против вирусных белков напоминала таковую при пролиферативной фазе ДАП: Spike-протеин и Nucleocapsid определялись в тех же клетках. При развитии альвеолита вирусные белки определялись преимущественно в макрофагах и эндотелиоцитах в очагах воспаления. В случаях с тромбоваскулитом вирусные белки определялись в эндотелиоцитах. Полученные количественные результаты свидетельствуют об отсутствии существенных различий в клеточной локализации белков вируса SARS-CoV-2, однако, при всех вариантах поражения легких вне зависимости от исследованной волны количество клеток, содержащих Nucleocapsid, было выше в сравнении с клетками, содержащими Spike-протеин, что может быть обусловлено более высокой иммуногенностью последнего.

5. Ключевыми клетками-продуцентами внеклеточных при различных вариантах поражения легких вирусом SARS-CoV-2 являются макрофаги, пневмоциты 2 типа, эндотелиоциты, лейкоциты, лимфоциты. В наблюдениях с экссудативной фазой ДАП наиболее яркое окрашивание везикул определялось в макрофагах, пневмоцитах 2 типа и эндотелиоцитах.

6. При проведении корреляционного анализа выявлена схожесть клеточной локализации вирусных белков и внеклеточных везикул при различных вариантах поражения легких. Отмечалось иммуногистохимическое окрашивание субапикальных отделов цитоплазмы в одних и тех же клетках: было выявлено положительное окрашивание подавляющего большинства макрофагов, пневмоцитов 2 типа, отдельных эндотелиоцитов.

7. Длительная персистенция белков вируса после перенесенной

коронавирусной инфекции потенциально может приводить к гиперстимуляции врожденного иммунитета с развитием иммунопатологических реакций путем межклеточных коммуникаций как в сторону реакций гиперчувствительности, так и в сторону иммунодефицитов.

8. Внеклеточные везикулы, содержащих вирусные белки Spike-протеин, Nucleocapsid, играют ключевую роль в патогенезе поражения не только легких, но и других органов при COVID-19, поскольку они могут участвовать в переносе белков вируса, а также, вероятно, и самого вируса в макроорганизме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На вскрытии рекомендовано забирать не менее 5 фрагментов ткани легких из каждой доли обоих легких ввиду потенциально выявления различных стадий ДАП и различных вариантов поражения легких в различных сегментах.
2. Обнаружение интерстициального фиброза при макро- и микроскопическом исследовании не может являться поводом для суждения о затяжном течении коронавирусной инфекции.
3. Выявление различных стадий ДАП при макро- и микроскопическом исследовании не может являться поводом для суждения о продолжительности течения коронавирусной инфекции.
4. Ввиду многообразия различных форм поражения легких не рекомендуется объединять все обнаруженные изменения термином «коронавирусная пневмония». Необходим точный анализ микроскопической картины с выявлением всех возможных вариантов.
5. При выявлении различных стадий ДАП в биоптатах ткани легких, полученных от пациентов с коронавирусной инфекцией, рекомендуется оказывать повышенное внимание к течению болезни ввиду высокого риска развития тяжелой дыхательной недостаточности и потенциального летального исхода.
6. В рутинной патологоанатомической практике возможно выявление вирусных белков на парафиновых блоках у пациентов с аутоиммунными расстройствами, перенесших коронавирусную инфекцию, для определения потенциальной причины данных иммунопатологических процессов.
7. Определение ВКВ возможно в рутинной патологоанатомической практике на материале ткани легких, в том числе взятых при аутопсийном исследовании.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АПФ-2 - ангиотензинпревращающий фермент 2
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- ВКВ – внеклеточные везикулы
- Г/Э – гематоксилин и эозин
- ДАБ – диаминобензидин
- ДАП – диффузное альвеолярное повреждение
- ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания
- ДНА – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДПП4 – дипептидил пептидаза 4
- ЕМИАС – единая медицинская информационно-аналитическая система
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИГХ – иммуногистохимия
- ИФН-у – гамма-интерферон
- КТ – компьютерная томография
- НКИ – новая коронавирусная инфекция
- Окр. – окраска
- ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- Соав. - соавторы
- ЦНС – центральная нервная система
- АСЕ-2 – angiotensin-converting enzyme 2
- Ade – аденоматоз
- AXL – рецептор тирозин-протеинкиназы UFO, кодируемый геном AXL
- CCL – C-C motif ligand 2
- CD – cluster of differentiation
- CoV – коронавирус

COVID-19 – coronavirus disease 2019

DAMP – damage associated molecular proteins

Eks – ДАП, экссудация

Endo – эндотелиоциты

ERGIC - endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment

И – интерлейкин

Mcf – макрофаги

MERS - Middle East respiratory syndrome

MERS-CoV - Middle East respiratory syndrome coronavirus

MHC – major histocompatibility complex

MIP-2 - macrophage inflammatory protein-2

NET - нейтрофильные внеклеточные ловушки

Nucleo – Nucleocapsid

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1

PAMP – pathogen associated molecular proteins

Pnev – пневмоциты II типа

Prol – ДАП, пролиферация;

SARS - severe acute respiratory syndrome

SARS-CoV – severe acute respiratory syndrome coronavirus

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

Spike – Spike-протеин

TF – tissue factor

TLR – toll-like receptor

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. - 2020. - Vol. 382. - № 8. - P. 727-733.
2. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing – 5 May 2023 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/speeches/item/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing---5-may-2023> (дата обращения: 16.11.2023).
3. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient / S. Ong, Y. Tan, P. Chia, [et al.] // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. - 2020. - Vol. 323. - № 16. - P. 1610–1612.
4. Epidemiology of COVID-19 among children in China / Y. Dong, X. Mo, H. Yabin, [et al.] // *Pediatrics*. - 2020. - Vol. 145. - № 6.
5. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence / V. Menachery, B. Yount, K. Debbink, [et al.] // *Nature Medicine*. - 2015. - Vol. 21. - № 12. - P. 1508–1513.
6. Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-mother-to-child-transmission-2021.1> (дата обращения: 28.02.2021).
7. Community transmission of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2, Shenzhen, China, 2020 / J. Liu, X. Liao, S. Qian, [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. - 2020. – Vol. 26. - №6. – P. 1320-1323
8. Wang, F.S. What to do next to control the 2019-nCoV epidemic? / F. S. Wang, C. Zhang // *The Lancet*. - 2020. – Vol. 395. – Issue 10222. – P. 391-393.
9. 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, [et al.] // *Front Med. Higher Education Press.* - 2020. - Vol. 14. - № 2. - P. 185–192.

10. Формы-фазы патологических изменений в легких при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 / Е. Коган, С. Демура, Ю. Березовский [и др.] // “Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза”. - 2020. - № 4. - С. 49–63.

11. Патоморфология новой коронавирусной инфекции COVID-19 / О. А. Лобанова, Д. С. Трусова, Е. Е. Руденко, Д. Д. Проценко, Е. А. Коган // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* - 2020. - Т. 35, № 3. С. 47–52.

12. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A. Gorbalenya, S. Baker, R. S. Baric, [et al.] // *Nature Microbiology.* - 2020. – Vol. 5. – P. 536-544.

13. Hussman, J. P. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention/ J. P. Hussman // *Frontiers in Pharmacology.* - 2020. - Vol. 11.

14. Moore, J.B. Cytokine release syndrome in severe COVID-19 / J. Moore, C. June // *Science.* - 2020. - Vol. 368. - № 6490. - P. 473–474.

15. IL-6 drives T cell death to participate in lymphopenia in COVID-19 / X. Zhou, G. Ye, Y. Lv, [et al.] // *International immunopharmacology.* - 2022. - Vol. 111.

16. Theoharides, T. C. Could SARS-CoV-2 Spike Protein Be Responsible for Long-COVID Syndrome? / T. C. Theoharides // *Molecular Neurobiology.* - 2022. - Vol. 59. - № 3. - P. 1850.

17. SARS-CoV-2 triggering autoimmune diseases / L. Mobasheri, M. Nasirpour, E. Masoumi. [et al.] // *Cytokine.* - 2022. - Vol. 154. - P. 155873.

18. Клинико-патогенетические особенности тиреопатий постковидного периода / А. И. Некрасов, И. Г. Починка, Л. Г. Стронгин, Н. Ю. Орлинская, [и др.] // *Медицинский Совет.* - 2024. - Vol. 0. - № 13. - P. 164–172.

19. Doyle, L. M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition,

Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis / L. M. Doyle, M. Z. Wang // *Cells*. - 2019. - Vol. 8. - № 7.

20. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles / E. van der Pol, A. Böing, P. Harrison, [et al.] // *Pharmacological reviews*. - 2012. - Vol. 64. - № 3. - P. 676–705.

21. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions / M. Yáñez-Mó, P. Siljander, Z. Andreu, [et al.] // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015. - Vol. 4. - № 2015. - P. 1–60.

22. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection / M. Hassanpour, J. Rezaie, M. Nouri [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. - Vol. 85, - № June. - P. 104422.

23. Raposo, G. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends / G. Raposo, W. Stoorvogel // *Journal of Cell Biology*. - 2013. - Vol. 200. - № 4. - P. 373–383.

24. COVID - Coronavirus Statistics - Worldometer [Электронный ресурс]. URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (Дата обращения: 27.04.2024).

25. Autopsy rate [Электронный ресурс]. URL: <https://ourworldindata.org/grapher/autopsy-rate?tab=table&time=earliest..2020&country=~ARM> (Дата обращения: 27.04.2024).

26. Клинико-морфологический анализ поражения легких с определением клеточной локализации белков вируса SARS-CoV-2 в летальных случаях COVID-19 / Е. А. Зарубин, Е. А. Коган, Н. В. Жарков [и др.] // *Клиническая и экспериментальная хирургия*. - 2023. - Т. 11. - № 1. - С. 54–63.

27. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States / R. Martines, J. Ritter, E. Matkovic, [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 26. - № 9. - P. 2005-2015.

28. Tahyra, A. S. C. The Role of Extracellular Vesicles in COVID-19 Pathology / A. S. C. Tahyra, R. T. Calado, F. Almeida // *Cells*. - 2022. - Vol. 11. - № 16.

29. Weiss, S. R. Coronavirus Pathogenesis / S. R. Weiss, J. L. Leibowitz // *Advances*

in *Virus Research*. - 2011. - Vol. 81. - P. 85-164.

30. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses / S. Su, G. Wong, W. Shi, [et al.] // *Trends in Microbiology*. - 2016. - Vol. 24. - № 6. - P. 490.
31. Coleman, C.M. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens / C. M. Coleman, M. B. Frieman // *Journal of Virology*. - 2014. – Vol. 88. - № 10. – P. 5209-5212
32. Peiris, J.S.M. Severe acute respiratory syndrome / J. S. M. Peiris, Y. Guan, K. Y. Yuen // *Nature Medicine*. - 2004. - Vol. 10. - № Suppl 12. - P. S88.
33. Chan-Yeung, M. SARS: epidemiology / M. Chan-Yeung, R. H. Xu // *Respirology*. - 2003. - Vol. 8. - № Suppl 1. - P. S9-S14.
34. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia / A. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer, [et al.] // *The New England journal of medicine*. - 2012. - Vol. 367. - № 19. - P. 1814–1820.
35. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li, [et al.] // *Lancet*. - 2020. - Vol. 395. - № 10224. - P. 565-574.
36. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X. Yang, X. Wang, [et al.] // *Nature*. - 2020. - Vol. 579. - № 7798. - P. 270-273.
37. Cui, J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z. L. Shi // *Nature Reviews Microbiology*. - 2019. - Vol. 17. - № 3. - P. 181–192.
38. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation / D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett, [et al.] // *Science*. - 2020. - Vol. 367 – N. 6483. – P. 1260-1263.
39. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 / R. Wölfel, V. Corman, W. Guggemos, [et al.] // *Nature*. - 2020. - Vol. 581. - № 7809. - P. 465–469.
40. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study/ L. Ren, Y. Wang, Z. Wu, [et al.] // *Chinese medical journal*. - 2020. - Vol. 133. - № 9. - P. 1015–1024.
41. Tracking SARS-CoV-2 variants [Электронный ресурс]. URL:

<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (Дата обращения: 31.03.2022).

42. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions> (Дата обращения: 18.11.2024).

43. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application / S. Lauer, K. Grantz, Q. Bi, [et al.] // *Annals of Internal Medicine*. - 2020. - Vol. 172. - № 9. - P. 577–582.

44. Постковидный миоэндокардит подострого и хронического течения: клинические формы, роль персистенции коронавируса и аутоиммунных механизмов / О. В. Благова, Е. А. Коган, Ю. А. Лутохина [и др.] // *Кардиология*. - 2022. - Т. 61. - № 6. – С. 11-27.

45. Fehr, A.R. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis / A. R. Fehr, S. Perlman // *Coronaviruses: Methods and Protocols*. - 2015. – Vol. 1282. – P. 1-23.

46. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections / J. Machhi, J. Herskovitz, A. M. Senan, [et al.] // *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. - 2020. – Vol. 15. - № 3. – P. 359-386.

47. Kleine-Weber, H. Spike proteins of novel MERS-coronavirus isolates from North- and West-African dromedary camels mediate robust viral entry into human target cells / H. Kleine-Weber, S. Pöhlmann, M. Hoffmann // *Virology*. - 2019. - Vol. 535. - P. 261–265.

48. Polymorphisms in dipeptidyl peptidase 4 reduce host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus / H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger // *Emerging Microbes and Infections*. - 2020. - Vol. 9. - № 1. - P. 155–168.

49. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells / S. Wang, Z. Qui, Y. Hoy, [et al.] // *Cell Research*. - 2021. - Vol. 31. - № 2. - P. 126–140.

50. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome/ D. Kim, J. Y. Lee, J. S. Yang, [et al.] // *Cell*. - 2020. – Vol. 181. - № 4. – P. 914-921.
51. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research / K. W. Witwer, E. I. Buzás, L. T. Bemis, [et al.] // *Journal of extracellular vesicles*. - 2013. – Vol. 2. - № 1.
52. The Impact of the CD9 Tetraspanin on Lentivirus Infectivity and Exosome Secretion / K. Böker, N. Lemus-Diaz, R. Ferreira, [et al.] // *Molecular Therapy*. - 2018. - Vol. 26. - № 2. - P. 634–647.
53. Early events during human coronavirus OC43 entry to the cell / K. Owczarek, A. Szczepanski, A. Milewska, [et al.] // *Scientific Reports*. - 2018. - Vol. 8. - № 1. - P. 7124.
54. Gould, S.J. The Trojan exosome hypothesis / S. J. Gould, A. M. Booth, J. E. K. Hildreth // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. - Vol. 100. - № 19. - P. 10592–10597.
55. The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission/ Urbanelli L., S. Buratta, B. Tancini, [et al.] // *Vaccines*. - 2019. - Vol. 7. - № 3. – P. 102.
56. Biochemical and Biologic Characterization of Exosomes and Microvesicles as Facilitators of HIV-1 Infection in Macrophages / I. Kadiu, P. Narayanasamy, P. K. Dash, [et al.] *Journal of immunology*. - 2012. - Vol. 189. - № 2. - P. 744-754.
57. Inhibition of HIV Replication by Apolipoprotein A-I Binding Protein Targeting the Lipid Rafts / L. Dubrovsky, A. Ward, S. Choi, [et al.] // *mBio*. - 2020. - Vol. 11. - № 1. – P. 19.
58. Exosomes from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Cells License Quiescent CD4+ T Lymphocytes To Replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-Dependent Mechanism / C. Arenaccio, C. Chiozzini, S. Columba-Cabezas, [et al.] // *Journal of Virology*. 2014. - Vol. 88. - № 19. - P. 11529-11539.
59. Extracellular Vesicles from Human Papilloma Virus-Infected Cervical Cancer Cells Enhance HIV-1 Replication in Differentiated U1 Cell Line / S. Ranjit, S. Kodidela, N. Sinha, [et al.] // *Viruses*. - 2020. - Vol. 12. - № 2. – P. 239.
60. Extracellular Vesicle Activation of Latent HIV-1 Is Driven by EV-Associated c-

Src and Cellular SRC-1 via the PI3K/AKT/mTOR Pathway / R. A. Barclay, G. A. Mensah, M. Cowen, [et al.] // *Viruses*. - 2020. - Vol. 12. - № 6. – P. 665

61. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19 / C. Guervilly, A. Bonifay, S. Burtey, [et al.] // *Blood Advances*. - 2021. - Vol. 5. - № 3. - P. 628–634.

62. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus / W. Li, M. Moore, N. Vasilieva, [et al.] // *Nature*. - 2003. - Vol. 426. - № 6965. - P. 450.

63. Acute respiratory distress syndrome / M. A. Matthay, R. L. Zemans, G. Zimmerman // *Nature reviews. Disease primers*. - 2019. - Vol. 5. - № 1. – P. 18.

64. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung / B. Opitz, V. Van Laak, J. Eitel, [et al.] // *American journal of respiratory and critical care medicine*. - 2010. - Vol. 181. - № 12. - P. 1294–1309.

65. Release mechanisms of major DAMPs / A. Murao, M. Aziz, H. Wang, [et al.] // *Apoptosis*. - 2021. - Vol. 26. - № 3–4. - P. 152–162.

66. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease / Y. Yi, P. N. P. Lagniton, S. Ye, [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. - 2020. - Vol. 16. - № 10. - P. 1753-1766.

67. Channappanavar, R. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology / R. Channappanavar, S. Perlman // *Seminars in Immunopathology*. - 2017. - Vol. 39. - № 5. - P. 529.

68. Lung epithelial cell-derived extracellular vesicles activate macrophage-mediated inflammatory responses via ROCK1 pathway / H. G. Moon, Y. Cao, J. Yang, [et al.] // *Cell death & disease*. - 2015. - Vol. 6. - № 12.

69. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, [et al.] // *Science*. - 2004. - Vol. 303. - № 5663. - P. 1532–1535.

70. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps / B. J. Barnes, J. M. Adrover, A. Baxter-Stoltzfus, [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. - 2020. - Vol. 217. - № 6.

71. Harrison, A. G. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis / A. G Harrison, T. Lin, P. Wang // Trends in Immunology. - 2020. - Vol. 41. - № 12. - P. 1100.
72. Siddiqi, H. K. COVID-19 – A vascular disease / H. K. Siddiqi, P. Libby, P. M. Ridker // Trends in Cardiovascular Medicine. - 2021. - Vol. 31. - № 1. - P. 1-5.
73. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult / K. Red-Horse, Y. Crawford, F. Shojaei, N. Ferrara // Developmental cell. - 2007. - Vol. 12. - № 2. - P. 181–194.
74. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 / A. Gupta, M. V. Madhavan, K. Sehgal, [et al.] // Nature medicine. - 2020. - Vol. 26. - № 7. - P. 1017–1032.
75. Endothelial Cell-derived Extracellular Vesicles Size-dependently Exert Procoagulant Activity Detected by Thromboelastometry / W. Holnthoner, C. Bonstingl, C. Hromada, // Scientific Reports. - 2017. - Vol. 7. - № 1. – P. 3707
76. Circulating extracellular vesicles are endowed with enhanced procoagulant activity in SARS-CoV-2 infection / C. Balbi, J. Burrello, S. Bolis. // EBioMedicine. - 2021. - Vol. 67. - P 103369.
77. Platelet and extracellular vesicles in COVID-19 infection and its vaccines / H. Goubran, J. Seghatchian, W. Sabry, [et al.] // Transfusion and Apheresis Science. - 2022. - Vol. 61. - № 3. - P. 103459.
78. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 / B. K. Manne, F. Denorme, E. A. Middleton, [et al.] // Blood. - 2020. - Vol. 136. - № 11. - P. 1317-1329.
79. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 / E. D. Hottz, I. G. Azevedo-Quintanilha, L. Palhinha, [et al.] // Blood. - 2020. - Vol. 136 - № 11. - P. 1330-1341.
80. Circulating Platelet-Derived Extracellular Vesicles Are a Hallmark of Sars-Cov-2 Infection / G. Cappellano, D. Raineri, R. Rolla, [et al.] // Cells. - 2021. - Vol. 10. - № 1. - P. 1–10.
81. Alveolitis in severe SARS-CoV-2 pneumonia is driven by self-sustaining circuits

- between infected alveolar macrophages and T cells / R.A. Grant, L. Morales-Nebreda, N. S. Markov, [et al.] // *Nature*. - 2021. – Vol. 590. – P. 635–641.
82. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 / B. Hu, H. Guo, P. Zhou [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. - 2021. - Vol. 19. - № 3. - P. 141-154.
83. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19) / H. Nishiura, N. Hiroshi, T. Kobayashi, [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 94. - P. 154-155.
84. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020 / K. Mizumoto, K. Kagaya, A. Zarebski, G. Chowell // *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. - Vol. 25. - № 10.
85. Akhmerov, A. COVID-19 and the Heart / A. Akhmerov, E. Marbán // *Circulation research*. - 2020. - Vol. 126. - № 10. - P. 1443–1455.
86. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review / M. Madjid, P. Safavi-Naeini, S. D. Solomon O. Vardeny // *JAMA cardiology*. - 2020. - Vol. 5. - № 7. - P. 831–840.
87. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19 / Y. Jin, H. Yang, W. Ji, [et al.] // *Viruses*. - 2020. – Vol. 12. - № 4. – P. 372
88. Diaphragm Pathology in Critically Ill Patients with COVID-19 and Postmortem Findings from 3 Medical Centers / Z. Shi, H. J. de Vries, A. P. J. Vlaar, [et al.] // *JAMA Internal Medicine*. - 2021. - Vol. 181. - № 1. - P. 122–124.
89. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2 / F. Xiao, M. Tang, X. Zheng, [et al.] // *Gastroenterology*. - 2020. – Vol. 158. - № 6. – P. 1831-1833.
90. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020 / E. K. Stokes, L. D. Zambrano, K. N. Anderson, [et al.] // *Morbidity and Mortality Weekly Report. Centers for Disease Control and Prevention*. - 2020. - Vol. 69. - № 24. - P. 759-765.
91. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study/ W. Zhao, Z. Zhong, X. Xie, [et

- al.] // *AJR. American journal of roentgenology*. - 2020. - Vol. 214. - № 5. - P. 1072–1077.
92. Attributes and predictors of long COVID / C. H. Sudre, B. Murray, T. Varsavsky, [et al.] // *Nature Medicine*. - 2021. – Vol. 27. - № 4. – P. 626–631.
93. Cerebral Micro-Structural Changes in COVID-19 Patients – An MRI-based 3-month Follow-up Study: A brief title: Cerebral Changes in COVID-19 / Y. Lu, X. Li, D. Geng, [et al.] // *EClinicalMedicine*. - 2020. - Vol. 25. – P. 100484
94. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations / H. E. Davis, L. McCorkell, J. M. Vogel, [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. - Vol. 21. - № 3. - P. 133–146.
95. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China / Y. Ding, H. Wang, H. Shen, [et al.] // *The Journal of pathology*. - 2003. - Vol. 200. - № 3. - P. 282-289.
96. Роль экзосом в межклеточных взаимодействиях при различных вариантах поражения легких в летальных случаях COVID-19 / Е. А. Зарубин, Е. А. Коган, Н. В. Жарков, [и др.] // *Архив патологии*. 2024. - Т. 86. - № 2. - С. 22-29.
97. COVID-19 and ARDS: Update on Preventive and Therapeutic Venues / A. Narota, G. Puri, V. P. Singh, [et al.] // *Current molecular medicine*. - 2022. - Vol. 22. - № 4. - P. 312–324.
98. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy / A. N. Duarte-Neto, R. A. A. Monteiro, L. F. F. da Silva, [et al.] // *Histopathology*. - 2020. - Vol. 77. - № 2. - P. 186-197.
99. Clinical and coagulation characteristics of 7 patients with critical COVID-2019 pneumonia and acro-ischemia / Z. Yan, W. Cao, M. Xiao, [et al.] // *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. - 2020. - Vol. 41. - № 0. - P. 302–307.
100. Potential for Lung Recruitment and Ventilation-Perfusion Mismatch in Patients With the Acute Respiratory Distress Syndrome From Coronavirus Disease 2019* / T. Mauri, E. Spinelli, E. Scotti, [et al.] // *Critical care medicine*. - 2020. - Vol. 48. - № 8. - P. 1129-1134.
101. Диффузное альвеолярное повреждение легких при COVID-19 в сочетании с

диффузной В-крупноклеточной лимфомой и инфарктом миокарда. Клинико-морфологическое наблюдение. / Е. А. Зарубин, Е. А. Коган, Н. В. Жарков, [и др.] // Вестник Новгородского государственного университета. - 2024. – Т. 2. - № 136. – С. 202-208.

102. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of SARS-CoV-2-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome / A. Kosyreva, D. Dzhalilova, A. Lokhonina, [et al.] // *Frontiers in immunology*. - 2021. - Vol. 12. - P. 1667.

103. Calkovska, A. Alveolar Type II Cells and Pulmonary Surfactant in COVID-19 Era / A. Calkovska, M. Kolomaznik, V. Calkovsky // *Physiological research*. - 2021. - Vol. 70. - № Suppl 2. - P. S195-S208.

104. Role of Epithelial-Endothelial Cell Interaction in the Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection / K. P. Y. Hui, M. C. Cheung, K. L. Lai, [et al.] // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. - 2022. - Vol. 74. - № 2. - P. 199–209.

105. Functional evidence of pulmonary extracellular vesicles in infectious and noninfectious lung inflammation / H. Lee, D. Zhang, D. L. Laskin, Y. Jin // *Journal of immunology*. - 2018. - Vol. 201. - № 5. - P. 1500-1509.

106. Lamers, M. M. SARS-CoV-2 pathogenesis / M. M. Lamers, B. L. Haagmans // *Nature Reviews Microbiology*. - 2022. - Vol. 20. - № 5. - P. 270–284.

107. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. L. Bulthuis, [et al.] // *The Journal of pathology*. - 2004. - Vol. 203/ - № 2. - P. 631-637.

108. Endothelial microvesicles carrying Src-rich cargo impair adherens junction integrity and cytoskeleton homeostasis / V. Chatterjee, X. Yang, Y. Ma, [et al.] // *Cardiovascular research*. - 2020. - Vol. 116. - № 8. - P. 1525-1538.

109. Зарубин, Е. А. Патогенез и морфологические изменения в легких при COVID-19 / Е. А. Зарубин, Е. А. Коган // *Архив патологии*. – 2021. – Т. 83, № 6. – С. 54-59.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 - Клинико-морфологический анализ и частота встречаемости различных вариантов поражения легких у пациентов, умерших во 2 и 3 волны

№ случая	2 волна								
	Длительность заболевания	% поражения легких	ДАП экссудация на 100 п/з	ДАП пролиферация на 100 п/з	ДВС-синдром на 100 п/з	Альвеолит на 100 п/з	Васкулит на 100 п/з	Бактериальная пневмония на 100 п/з	Интерстициальный фиброз на 100 п/з
1	12	90%	84	9	84	0	0	33	6
2	15	95%	71	6	71	3	3	15	61
3	17	75%	24	3	100	0	0	57	57
4	27	95%	36	3	100	0	0	48	60
5	36	90%	24	3	63	9	0	57	0
6	40	95%	87	0	100	3	0	36	75
7	40	95%	64	3	100	3	0	24	36
8	16	95%	66	45	72	6	6	27	33
9	12	95%	100	9	100	3	0	51	15
10	26	95%	84	0	100	3	0	18	63
11	14	95%	3	0	84	3	0	57	12
12	22	75%	33	0	87	0	0	87	6
13	24	95%	63	6	100	3	9	12	69
14	19	80%	81	9	100	3	0	3	24
15	12	95%	100	6	100	3	0	0	0
16	24	95%	45	6	100	6	0	3	42
17	22	95%	93	18	100	3	3	0	6
18	14	70%	100	9	100	0	0	15	0
19	15	95%	95	0	100	0	0	75	6
20	23	95%	94	29	100	3	0	6	62
21	21	90%	54	3	100	3	0	3	72
22	18	50%	62	0	100	14	6	0	9
23	18	50%	67	6	100	0	5	61	6
24	19	95%	68	3	91	37	3	0	11
25	40	80%	57	0	100	10	0	19	2
26	25	95%	93	18	100	3	3	0	6
27	14	95%	29	0	100	0	5	91	22
28	4	95%	6	0	100	0	0	100	0
29	17	50%	31	0	100	0	5	3	0
30	15	95%	25	0	100	6	4	55	0
31	12	95%	92	0	91	4	0	0	0
32	12	95%	88	7	100	0	0	10	0
33	10	95%	93	10	100	0	0	44	23
34	22	50%	9	0	100	3	0	31	10
35	11	50%	40	0	100	7	12	78	0
36	9	95%	52	0	100	0	0	57	0
37	19	75%	12	0	100	4	0	76	2
38	18	60%	16	4	100	3	0	0	16
39	10	60%	49	0	97	0	0	19	10
40	17	95%	97	0	100	0	6	7	25
41	23	75%	94	0	100	4	0	43	31
42	24	95%	31	4	100	3	0	34	69
43	12	50%	6	0	97	3	0	57	2
44	22	75%	52	2	98	6	0	6	40
45	11	75%	49	16	100	3	3	77	0
46	17	50%	4	49	98	0	3	72	7
47	12	50%	7	68	100	3	3	46	10
48	1	50%	0	0	100	0	0	0	0
49	1	50%	17	76	100	0	0	87	16
50	16	50%	0	6	100	0	0	95	0
51	20	75%	7	64	100	12	3	0	44
52	4	50%	0	65	100	4	4	89	0
53	16	90%	9	19	100	36	9	28	35
54	12	90%	0	0	95	0	0	64	0
55	3	90%	37	0	100	0	0	0	0
56	18	90%	0	12	90	0	0	0	6
57	16	75%	0	0	100	3	12	0	7
58	18	50%	23	10	100	16	0	0	34
59	31	75%	23	19	100	0	0	65	0

Продолжение Таблицы А.1

3 волна									
№ случая	Длительность заболевания	% поражения легких	ДАП экссудация на 100 п/з	ДАП пролиферация на 100 п/з	ДВС-синдром на 100 п/з	Альвеолит на 100 п/з	Васкулит на 100 п/з	Бактериальная пневмония на 100 п/з	Интерстициальный фиброз на 100 п/з
60	22	60%	18	9	100	5	2	2	5
61	53	95%	30	1	85	7	0	18	80
62	8	75%	86	1	95	0	0	5	0
63	9	75%	5	2	100	0	0	100	1
64	17	75%	78	4	100	0	0	1	0
65	6	75%	36	0	100	3	0	0	7
66	8	75%	10	0	100	2	0	69	1
67	18	50%	10	3	100	15	4	48	29
68	11	50%	18	4	100	6	0	4	20
69	16	95%	79	3	100	0	0	3	0
70	9	60%	75	12	100	9	0	0	0
71	2	80%	15	0	100	0	0	90	0
72	21	95%	4	0	100	0	0	0	46
73	12	75%	90	8	100	4	0	0	0
74	11	95%	66	0	100	6	0	0	14
75	13	95%	3	36	96	5	1	84	0
76	22	75%	13	0	100	0	0	0	0
77	17	75%	74	2	100	0	0	3	0
78	10	75%	33	0	100	0	0	0	0
79	18	75%	34	6	100	0	11	0	0
80	12	95%	68	5	100	0	0	0	0
81	9	75%	3	0	100	0	0	66	0
82	13	60%	19	2	100	26	5	18	0
83	6	60%	15	0	100	4	0	72	0
84	51	75%	5	8	100	0	0	0	27
85	28	95%	45	5	100	1	0	0	1
86	18	95%	48	0	100	5	0	50	2
87	10	75%	9	12	100	1	0	0	2
88	19	95%	56	6	100	0	0	55	0
89	22	95%	33	14	100	0	0	0	0
90	18	50%	6	6	100	0	0	0	0
91	23	50%	59	14	100	0	0	0	0
92	15	95%	17	3	100	3	0	3	0
93	18	60%	18	0	100	0	0	0	0
94	9	50%	50	0	100	0	0	0	0
95	22	75%	2	0	100	0	0	0	15
96	22	75%	24	5	100	0	0	11	10
97	13	70%	32	0	100	2	0	25	0
98	9	95%	7	0	100	0	0	0	0
99	15	75%	29	6	100	0	0	1	0
100	21	75%	38	0	100	0	0	18	0
101	7	75%	14	0	100	0	0	0	0
102	7	95%	57	2	100	0	0	81	0
103	3	40%	5	0	100	0	0	0	0
104	21	75%	26	4	100	2	0	0	52
105	13	50%	2	0	100	0	1	55	0
106	10	95%	58	0	100	0	0	0	0
107	10	75%	32	0	100	6	1	3	0
108	2	95%	21	1	100	2	0	5	0
109	15	75%	11	0	100	3	0	0	0
110	2	95%	71	0	100	0	0	33	0
111	25	60%	0	0	100	0	0	81	0
112	17	95%	79	6	100	0	0	0	0
113	20	75%	65	0	100	0	0	0	2
114	41	95%	0	0	100	0	0	88	0
115	13	75%	27	5	100	4	0	11	0
116	21	95%	37	8	100	5	0	5	8
117	12	95%	25	0	100	0	0	0	0
118	11	95%	60	6	100	1	0	0	0