

На правах рукописи



Зарубин Егор Алексеевич

Межклеточные взаимодействия в развитии поражений легких при COVID-19

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Коган Евгения Алтаровна

Официальные оппоненты:

Самсонова Мария Викторовна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России, лаборатория патологической анатомии, заведующий лабораторией

Орлинская Наталья Юрьевна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский Университет Медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «27» января 2025 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.001.31

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Zhu et al., 2020). Заболевание продолжает распространяться в настоящее время, после официального завершения пандемии всемирной организацией здравоохранения (*WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing – 5 May 2023, n.d.*).

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 (Dong et al., 2020; Menachery et al., 2015; Ong et al., 2020). 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 (*Definition and Categorization of the Timing of Mother-to-Child Transmission of SARS-CoV-2, n.d.*). 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 (Liu et al., 2020; Wang & Zhang, 2020), 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, мочевого пузыря и нервная система (Zou et al.,

2020; Коган et al., 2020).

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 (Lobanova et al., 2020). 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.

После проникновения вируса в клетку происходит транскрипция вирусной репликазы, геномная транскрипция и репликация, трансляция структурных белков, сборка с дальнейшим высвобождением вириона (Gorbalenya et al., 2020).

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 (Коган et al., 2020). 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 неконтролируемой продукции цитокинов макрофагами и нейтрофилами (Hussman, 2020). 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 (Moore & June, 2020) и полиорганной недостаточности. Истощение иммунной системы с развитием лимфопении имеет неблагоприятный прогноз и коррелирует с тяжестью состояния COVID-19 (Zhou et al., 2022).

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 ауто толерантности.

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 (Theoharides, 2022). Однако существует недостаточно доказательств, определяющих точное молекулярное взаимодействие между вирусом и иммунной системой, вызывающее аутореактивность, что требует дополнительных исследований (Mobasher et al., 2022).

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 (Nekrasov et al., 2024).

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) (Doyle & Wang, 2019). ВКВ синтезируются всеми типами клеток (van der Pol et al., 2012). ВКВ представлены несколькими подвидами, отличающимися по структуре, составу и механизму синтеза. Ключевыми представителями ВКВ являются экзосомы, эктосомы, микровезикулы, апоптотные тельца,

онкосомы и т.д., однако, критерии классификации везикул пересекаются друг с другом, что усложняет их дифференцировку, а в различных источниках приводятся различные подтипы. 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 (Hassanpour et al., 2020). 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 (*Autopsy Rate*, n.d.; *COVID - Coronavirus Statistics - Worldometer*, n.d.). 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 (Martines et al., 2020; Zarubin et al., 2023). 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 (Hassanpour et al., 2020; Tahyra et al., 2022). 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование является проспективным, наблюдательным, нерандомизированным. Проведено 118 вскрытий умерших от COVID-19 с полным изучением историй 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 диагностика 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 вскрытия был сформулирован предварительный патологоанатомический диагноз, 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.

Взятые фрагменты фиксированы в забуференном 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.

Изготавливались серийные парафиновые срезы с окраской гематоксилином и эозином по стандартизированным методикам (Fischer A. et al, 2008). 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 (октябрь 2020 г - май 2021 г); 2 группа - 59 случаев (50%), умерших в период 3 волны (сентябрь 2021 г. - январь 2022 г).

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.

В 32 случаях (27%): была проведена иммуногистохимическая реакция с использованием моноклональных антител к нуклеокапсиду, S-белку, SARS-CoV-2, белкам-тетраспанинам участвующим во внутриклеточной сборке экзосом (CD63, CD81). 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. 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 постановке иммуногистохимических реакций в обязательном порядке ставили положительные и отрицательные контроли.

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 x40. Все отсканированные препараты проанализированы с применением количественной оценки окрашенных клеток в приложении QuPath, Aperio ImageScope x64.

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 x400 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-морфологический анализ

Было исследовано 118 летальных исходов COVID-19. 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.

Самой распространенной (в 54,2% наблюдений) непосредственной причиной смерти во 2 волну явилось ДАП. 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%).

Макроскопическое исследование

У пациентов, умерших от COVID-19, в экссудативную фазу ДАП макроскопически легкие увеличены в размере, плотные. Поверхность красного цвета, «лакированного» вида (рисунок 1А). В ткани легких определяются кровоизлияния различных размеров. В пролиферативную фазу легкие приобретали более плотную консистенцию, окрашивались в серовато-бордово-серый цвет (Рисунок 1Б). На поздних этапах заболевания при макроскопическом исследовании визуализировались тяжи белесовато-серой волокнистой фиброзной ткани с формированием в единичных случаях «сотового» легкого.

В отдельных случаях при присоединении вторичной флоры развивалась долевая или очаговая пневмония с характерными для них морфологическими проявлениями (Рисунки 1Б-В).

В отдельных случаях пневмония носила деструктивный характер (Рисунок 1Г).

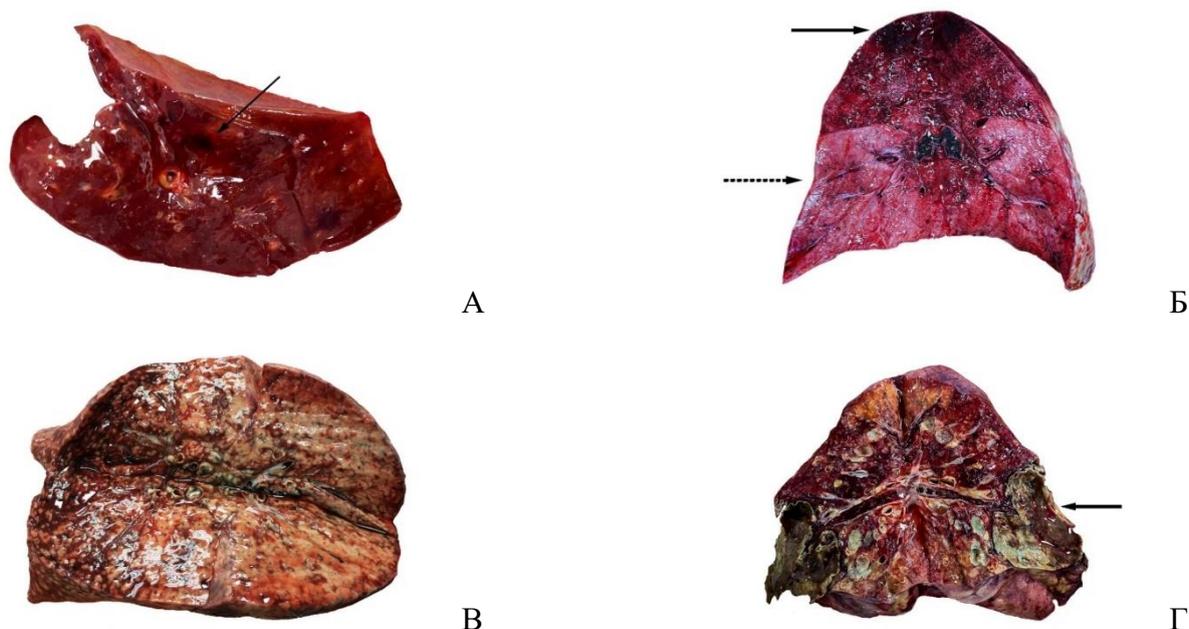


Рисунок 1 – Макроскопическое исследование легких: а – диффузное альвеолярное повреждение, фаза экссудации. Поверхность разреза с кровоизлияниями (стрелка); б – диффузное альвеолярное повреждение, фаза пролиферации. Геморрагический инфаркт (стрелка), долевая пневмония в стадии серого опеченения (пунктирная стрелка); в - Субтотальная очагово-сливная пневмония с абсцедированием; г – Вирусно-бактериальная пневмония, цилиндрические бронхоэктазы, хронический абсцесс легкого (стрелка).

Микроскопическое исследование

При микроскопическом исследовании в ткани легких определены участки поражения, подсчитана площадь поражения следующими патологическими процессами.

Диффузное альвеолярное повреждение

При микроскопическом исследовании легких были выявлены признаки диффузного альвеолярного повреждения в стадии экссудации в виде отложения гиалиновых мембран (Рисунок 2А). Признаки ДАП в стадии экссудации были выявлены в 53 случаях 2 волны (89,8%). 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 (Рисунок 2Б). В отдельных случаях помимо вышеописанных проявлений определялось сочетание ДАП с очаговой пневмонией, реактивный аденоматоз (Рисунок 2В). 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.

Лимфоцитарный альвеолит

В 36 случаях (61%) 2ой волны наблюдались признаки альвеолита, сопровождающиеся

воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок в виде очаговых и диффузных лимфоплазмочитарных скоплений (Рисунок 2Г). В нашем исследовании альвеолит регистрировался только при выраженной воспалительной инфильтрации. В 3 волну признаки альвеолита встречались в 24 случаях (40,7%) и не чаще чем в 29 полях зрения.

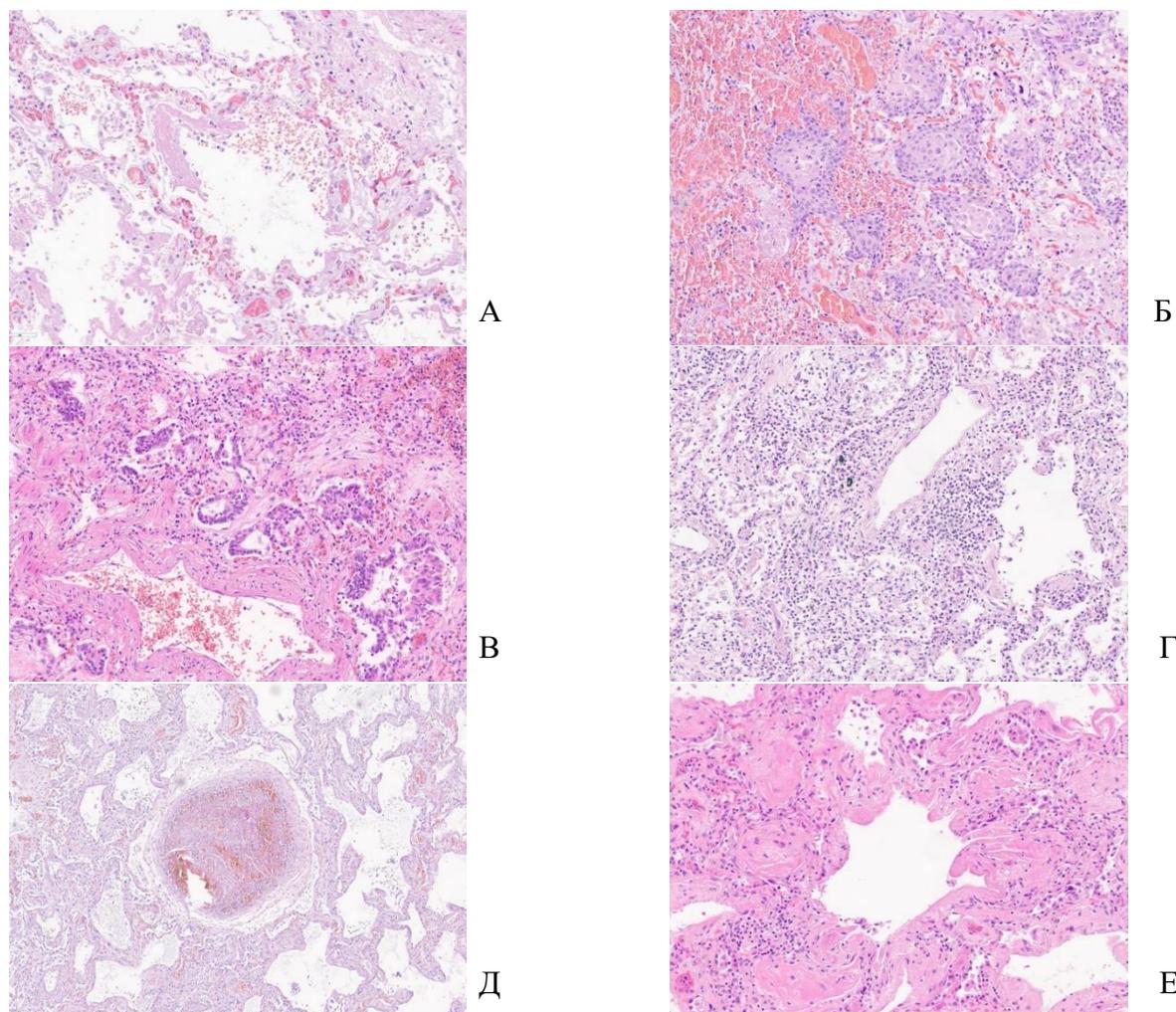


Рисунок 2 – Микрофотографии ткани легких, окр. г/э, отсканированные изображения, х300; А – ДАП в фазе экссудации; Б - ДАП в фазе пролиферации; В - ДАП в фазе пролиферации с участками аденоматоза; Г - альвеолит; Д - смешанный тромб в просвете крупной веточки легочной артерии; Е - прорастание гиалиновых мембран фибробластами и коллагеновыми волокнами с формированием интерстициального фиброза.

Тромбоваскулит и COVID-ассоциированная коагулопатия

В некоторых случаях было отмечено развитие васкулитов с тромбообразованием. Во 2 волне признаки тромбоваскулита наблюдались в 19 случаях (32,2%), в 3 - лишь в 7 (11,9%).

Несмотря на то, что воспаление сосудистой стенки встречалось относительно редко, признаки коагулопатии наблюдались во всех (100%) исследуемых случаях во 2 и 3 волнах (Рисунок 2Д). 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. Во 2 волну бронхопневмония встречалась в 47 случаях (79,7%), в 3 волну в 31 (52,6%).

Интерстициальный фиброз

Морфологические признаки интерстициального фиброза наблюдались на различных сроках заболевания, начиная с самых первых суток (Рисунок 2Е). Во 2ую волну интерстициальный фиброз с миофибробластическими изменениями был выявлен в 43 случаях (72,8%). В 3-ю волну в 33 случаях (55,9%). Стоит отметить, что в некоторых случаях затяжного течения, COVID-19 признаки фиброза отсутствовали.

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

При проведении иммуногистохимической реакции с антителами против вирусных белков (S-белок и нуклеокапсид) вирусные белки в клетках обнаруживались с самых ранних сроков заболевания (Рисунки 3А-Б). Характер иммуногистохимического окрашивания Spike-протеина и нуклеокапсида преимущественно гранулярный цитоплазматический, 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. Клеточная локализация вирусных белков и количество окрашенных клеток отличались в зависимости от варианта поражения легких (Таблица 1).

Таблица 1 – 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	<u>Пневмоциты II типа</u>	<u>Эндотелиоциты</u>	Макрофаги	<u>Пневмоциты II типа</u>	<u>Эндотелиоциты</u>
ДАП, фаза экссудации (n=22)	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 (n=12)	S	78	100	28	96	98,8	31,9
	N	89	100	39	97,3	99,5	43,9
<u>Аденоматоз</u> (n=17)	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
<u>Альвеолит</u> (n=20)	S	94	-	30	87,1	-	18,6
	N	84,1	-	36,6	83,3	-	27,3
Тромбоваскулит (n=9)	S	-	-	11	-	-	13,3
	N	-	-	23	-	-	27,1

ДАП в стадии экссудации.

При исследовании случаев 2 и 3 волны вирусные белки обнаружены в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах 2 порядка и эндотелиоцитах (Рисунок 3В).

ДАП в стадии пролиферации.

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

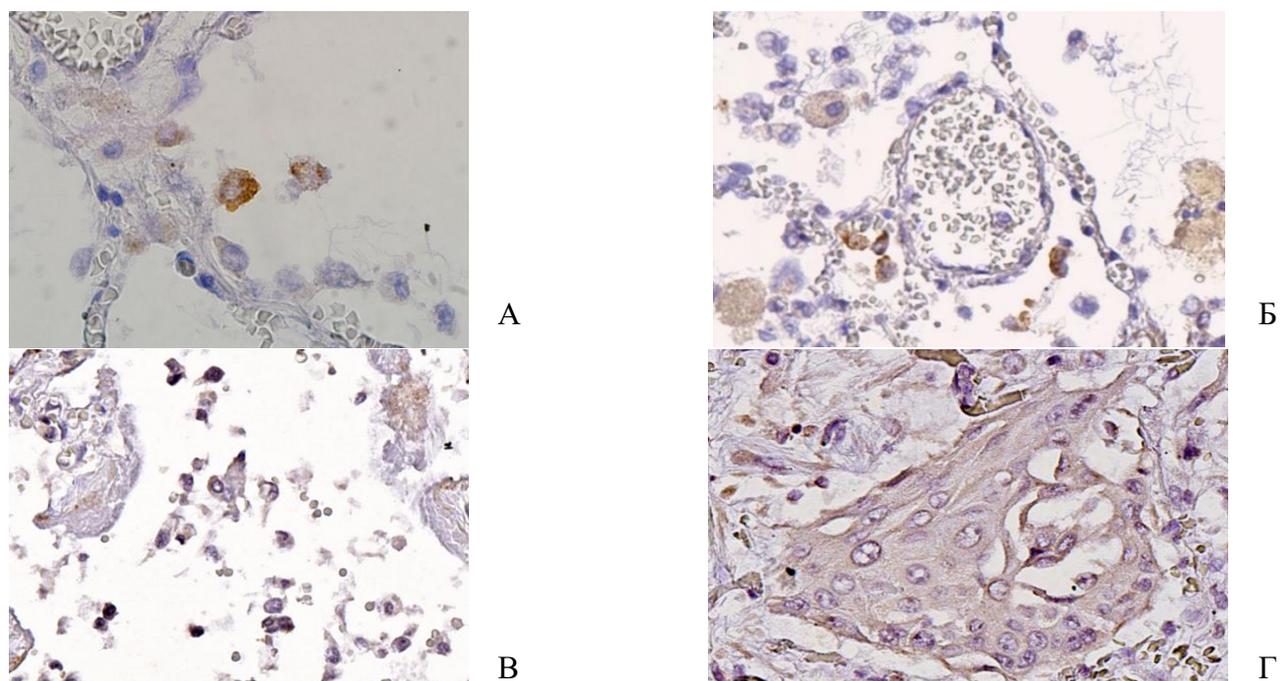


Рисунок 3 – ИГХ-реакция, антитела к Nucleocapsid (А, В, Г), к Spike-протеину (Б), окр. ДАБ, гематоксилином. А – Nucleocapsid в цитоплазме макрофагов и пневмоцитов 2 типа, х1000; Б - Spike в цитоплазме альвеолярных макрофагов и эндотелиоцитов в начале заболевания (2 сутки), х400; В - Nucleocapsid в цитоплазме альвеолярных макрофагов, пневмоцитов II типа и в гиалиновых мембранах во время экссудативной фазы ДАП, х400; Г - Nucleocapsid в цитоплазме пневмоцитов II типа в очагах плоскоклеточной метаплазии,

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 экспрессия S-белка была обнаружена в 94% макрофагов и в 30% эндотелиоцитов. Окрашивание нуклеокапсида определялось в 84,1% макрофагов и 36,6% эндотелиоцитов. В 3-ю волну окрашивание S-белком было выявлено в 83,3% макрофагов и 27,3% эндотелиоцитов.

Окрашивание нуклеокапсида обнаружено в 86,6% макрофагов и 31,1% эндотелиоцитов. Окрашивание цитоплазмы лимфоцитов не обнаружено.

Тромбоваскулит и COVID-ассоциированная коагулопатия

Экспрессия 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%.

Иммуногистохимическое исследование внеклеточных везикул

Наиболее яркое окрашивание везикул определялось в альвеолярных макрофагах, пневмоцитах 2 типа, эндотелиоцитах, лимфоцитах, лейкоцитах (Рисунок 4а). Также окрашивание определяли в мезотелии, бронхиальном эпителии, фибробластах, гладкомышечных клетках. Характер окрашивания – цитоплазматический, гранулярного вида, преимущественно в субапикальной области клеток. При большом увеличении определяли и зернистое окрашивание во внеклеточной области, близкое к поверхности мембраны. Клеточная локализация и характер иммуногистохимического окрашивания антителами против CD63, соответствовали клеточной локализации вирусных частиц.

Диффузное альвеолярное повреждение и аденоматоз.

В наблюдениях с экссудативной фазой ДАП наиболее яркое окрашивание везикул определялось в макрофагах, пневмоцитах 2 типа и эндотелиоцитах (Рисунок 4Б). Средняя доля окрашенных макрофагов составила 94,4%, пневмоцитов 2 типа – 86,4%, эндотелиоцитов – 59,3%. В пролиферативную фазу ДАП клеточный состав был идентичен (Рисунок 4В). Средняя доля окрашенных макрофагов антителами против CD63 составила 95%, пневмоцитов 2 типа – 91,9%, эндотелиоцитов – 62,2%.

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, а также снижение интенсивности окрашивания до единичных гранул или до тотального отсутствия окраски в очагах плоскоклеточной метаплазии пневмоцитов 2 типа (Рисунок 4В).

Альвеолит.

При исследовании наблюдений с альвеолитом чаще всего окрашивание антителами против CD63 было обнаружено в макрофагах, лимфоцитах, эндотелиоцитах прилежащих мелких сосудов (Рисунок 4Г). 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.

Тромбоваскулит и COVID-ассоциированная коагулопатия.

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%).

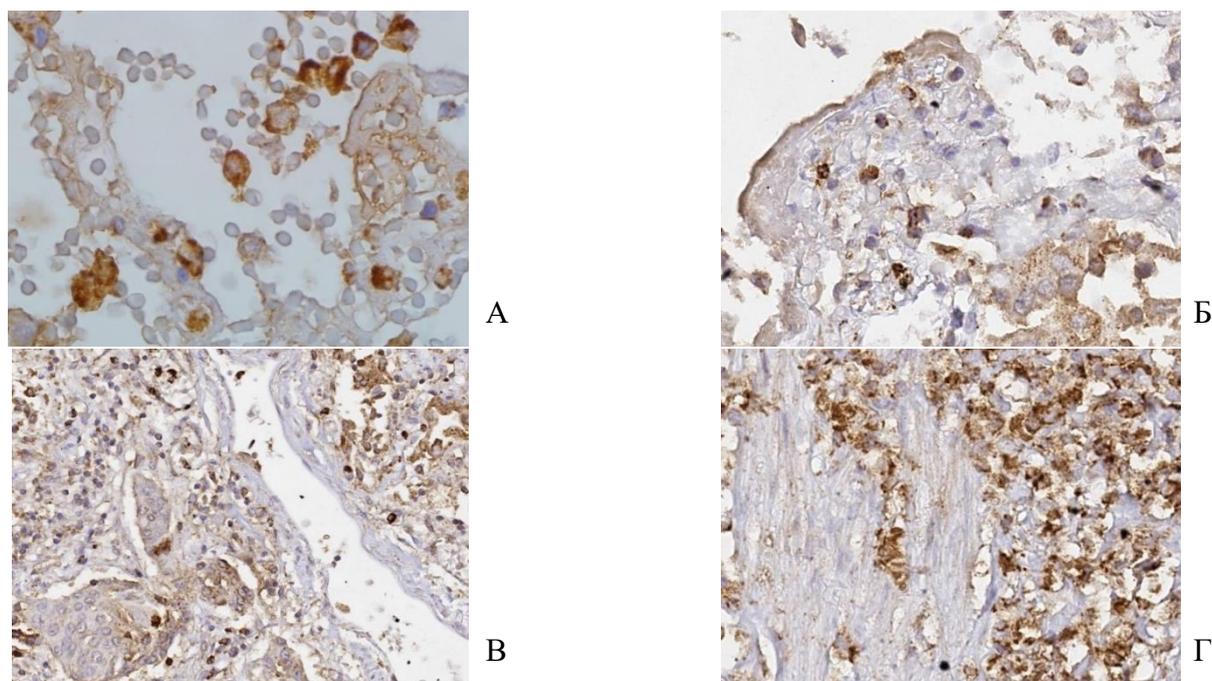


Рисунок 4 – ИГХ-реакция, антитела против CD63, окр. ДАБ, гематоксилином; А - окрашивание макрофагов и пневмоцитов 2 типа, x1000; Б - ДАП в фазе экссудации, x400; В - очаги аденоматоза и плоскоклеточной метаплазии при ДАП в фазе пролиферации, x400; Г – участки воспалительной инфильтрации интерстиция, x400;

Статистический анализ

При проведении корреляционного статистического анализа полученных результатов были обнаружены несколько заметных, сильных и очень сильных взаимосвязей. Было рассмотрено 2 варианта проведения корреляционного анализа: группировка данных по клеткам и общий корреляционный анализ.

Наиболее важными результатами явилось обнаружение связи между локализацией:

- CD63 в макрофагах при ДАП в фазе экссудации и Spike-протеина в макрофагах в участках аденоматоза (коэффициент корреляции 0,6);
- CD63 в пневмоцитах 2 типа при ДАП в фазе пролиферации и Spike-протеина в пневмоцитах 2 типа в участках аденоматоза (коэффициент корреляции 0,7); в пневмоцитах 2 типа при ДАП в фазе экссудации и Nucleocapsid в пневмоцитах 2 типа при ДАП в фазе пролиферации (коэффициент корреляции 0,8).

- CD63 в эндотелиоцитах: в участках аденоматоза и Nucleocapsid в эндотелиоцитах при ДАП в фазе пролиферации (коэффициент корреляции 0,6); в эндотелиоцитах в участках аденоматоза и Spik-протеина в эндотелиоцитах при ДАП в фазе пролиферации (коэффициент корреляции 0,6).

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.

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 значение. 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.

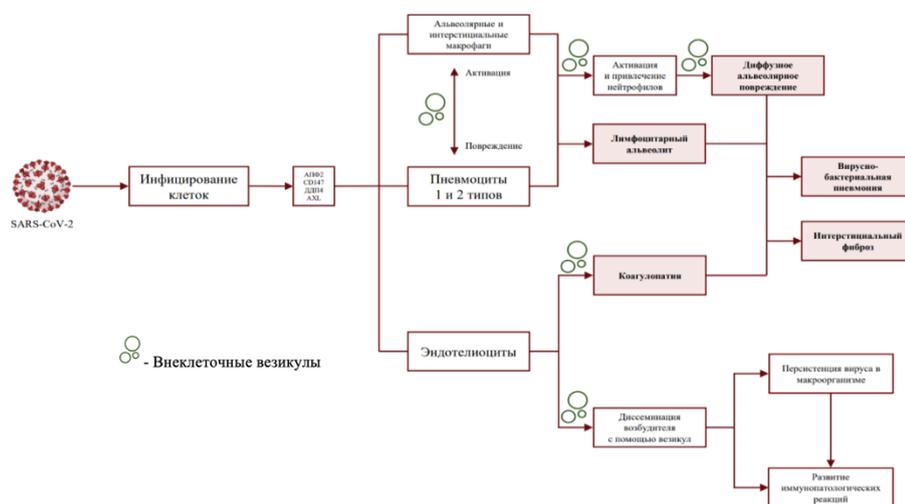


Рисунок 5 – Схема патогенеза поражения легких при COVID-19

Особую роль в межклеточных взаимодействиях при всех COVID-ассоциированных поражениях легких играют внеклеточные везикулы. 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, межклеточные коммуникации которых обуславливают развитие той или иной формы поражения легких. Обнаружение вирусных частиц в этих клетках при всех формах поражения может свидетельствовать о перекрестных механизмах патогенеза и широкой тропности вируса. Помимо этого, межклеточные взаимодействия клеток, содержащих частицы вируса SARS-CoV-2, с помощью внеклеточных везикул может являться потенциальной причиной развития постковидного синдрома, вторичных иммунопатологических процессов и приводит к диссеминации вирусных частиц в макроорганизме, что требует дальнейшего изучения.

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 патогенезе поражения легких COVID-19 (Рисунок 5).

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 межклеточных взаимодействиях 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Патогенез и морфологические изменения в легких при COVID-19 / **Зарубин Е.А.**, Коган Е.А. // **Архив патологии.** 2021. Т. 83. № 6. С. 54-59. [Scopus]
2. Клинико-морфологический анализ поражения легких с определением клеточной локализации белков вируса SARS-CoV-2 в летальных случаях COVID-19 / **Зарубин Е.А.**, Коган Е.А., Жарков Н.В., Авдалян А.М., Проценко Д.Н. // **Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского.** 2023. Т. 11. № 1 (39). С. 54-63. [Scopus]
3. Клеточная локализация белков вируса SARS-CoV-2 при различных вариантах поражения легких при COVID-19 / **Зарубин Е.А.**, Коган Е.А., Жарков Н.В., Авдалян А.М., Проценко Д.Н. // **Абрикосовские чтения. Материалы научно-практической конференции.** Москва, 2023. С. 44-46.
4. Диффузное альвеолярное повреждение легких при COVID-19 в сочетании с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и инфарктом миокарда. Клинико-морфологическое наблюдение. / **Зарубин Е.А.**, Коган Е.А., Авдалян А.М., Мосин С.В. // **Вестник Новгородского государственного университета.** 2024. № 2 (136). С. 202-208.
5. Роль экзосом в межклеточных взаимодействиях при различных вариантах поражения легких в летальных случаях COVID-19 / **Зарубин Е.А.**, Коган Е.А., Жарков Н.В., Авдалян А.М., Проценко Д.Н. // **Архив патологии.** 2024. Т. 86. № 2. С. 22-29. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПФ-2 – ангиотензинпревращающий фермент 2

ВКВ – внеклеточные везикулы

ДАБ – диаминобензидин

ДАП – диффузное альвеолярное повреждение

ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПП-4 - дипептидилпептидаза-4

ИГХ – иммуногистохимия

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ACE-2 – angiotensin-converting enzyme 2

AXL - рецептор тирозин-протеинкиназы UFO

CD - cluster of differentiation

COVID-19 – Coronavirus disease 2019

DAMP – damage associated molecular protein

И-6 – интерлейкин 6

PAMP – pathogen associated molecular protein

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

TLR – toll-like receptor