

Одилов Акмалжон Адхамжонович

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ,
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕГКИХ ПРИ COVID-19

Специальность 3.3.2. – патологическая анатомия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

Волков Алексей Вадимович - доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Черняев Андрей Львович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом фундаментальной пульмонологии ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России

Авдалян Ашот Меружанович - доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

Ведущая организация: «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" ("НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына" ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского")

Защита диссертации состоится «26» мая 2023 года в __:__ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.006 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте: <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан « ____ » апреля 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.006
кандидат медицинских наук

В.А. Горячев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Пандемия COVID-19, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, стала причиной более 600 млн. случаев инфицирования и более 6 млн. случаев летального исхода по всему миру [Dong E. et al., 2020]. В Российской Федерации к настоящему времени выявлено более 20 млн. случаев заболевания и более 370 тыс. случаев смерти пациентов от COVID-19. Одной из основных причин тяжелого течения и фатального исхода COVID-19 является развитие острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС) и мультиорганной недостаточности [Samsonova M.V. et al., 2020, Zayratyants O.V. et al., 2020]. К сегодняшнему дню накопилось много сведений о характере SARS-CoV-2 индуцированных гистопатологических изменений различных органов [Borczuk A.C. et al., 2020; Martines R.B. et al., 2020], особенностях молекулярно-генетического [Puelles V.G. et al., 2020, Adachi T. et al., 2020], иммуногистохимического (ИГХ) [von Stillfried S. et al., 2021] и электронно-микроскопического [Dolhnikoff M. et al., 2021] исследования SARS-CoV-2 в тканях различных органов при COVID-19.

На наш взгляд, только комплексное патологоанатомическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования позволят раскрыть патогенетические механизмы SARS-CoV-2-ассоциированных поражений ткани легких и других жизненно важных органов, являющихся причиной смерти пациентов с COVID-19.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время отсутствуют работы с комплексным использованием современных молекулярно-генетических, патоморфологических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических методов исследования аутопсийной ткани различных органов пациентов, умерших с COVID-19.

Во многих работах исследовательский арсенал ограничен только одним методом, например полимеразной цепной реакции в реальном времени с реакцией обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) [Lindner D. et al., 2020; Lagana S.M. et al., 2020; Rimmelink M. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020]. Некоторые из этих работ, посвящены количественной оценке вирусной нагрузки (ВН) относительно значений числа пороговых циклов (Ct) ПЦР РВ [Yu F. et al., 2020]. Однако к значениям Ct ПЦР РВ следует относиться очень осторожно, так как эти значения сильно зависят от качества и количества экстрагированной РНК, от эффективности работы праймеров и зондов, а также от прохождения реакции амплификации [Dahdouh E. et al., 2021; Schnuriger A. et al., 2021]. Коллегия американских патологов призывает также с осторожностью интерпретировать значения Ct при оценке ВН SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 [Rhoads D. et al., 2020].

В настоящее время, появились работы с применением различных коммерческих анти-SARS-CoV моноклональных антител (мкАт) в аутопсийной ткани легких [Rimmelink M. et al., 2020], почек [Su H. et al., 2020], сердца [Gauchotte G. et al., 2021], кожи [Colmenero I. et al., 2020], костного мозга, селезенки, желудочно-кишечного тракта [Schurink B. et al., 2020], печени [Zhao C.L. et al., 2020], поджелудочной железы [Steenblock C. et al., 2021], головного мозга

[Matschke J. et al., 2020] и плаценты [Hsu A.L. et al., 2021]. Однако, основными недостатками вышеперечисленных работ остаются низкая специфичность и чувствительность антител против белков SARS-CoV-2 в тканях с посмертными структурными разрушениями. Например, согласно Szabolcs и соавт., апробировавшими семь различных коммерческих антител, пригодными для ИГХ-исследования были лишь два антитела - анти-NC МкАТ (40143-R001, SinoBiological) и анти-S МкАТ (GTX632604-1A9, GeneTex) [Szabolcs M. et al., 2021].

Появились некоторые работы, посвященные электронно-микроскопической визуализации частиц коронавируса SARS-CoV-2 [Bradley B.T. et al., 2020; Grimes Z. et al., 2020; Carsana L. et al., 2020; Pesaresi M. et al., 2020; Falasca L. et al., 2020; Farkash E.A. et al., 2020; Su H. et al., 2020; Kissling S. et al., 2020; Tavazzi G. et al., 2020]. Однако, результаты некоторых вышеописанных работ в дальнейшем явились предметом широкой дискуссии [Goldsmith C.S. et al., 2020; Miller S.E. et al., 2020; Kniss D.A. et al., 2020] из-за стертости картины ультраструктурных изменений, связанных с аутолитической деструкцией тканей [Neil D. et al., 2020; Dolhnikoff M. et al., 2021].

Таким образом, до сих пор остается недостаточно исследованным ряд вопросов, связанных с несовершенством молекулярно-генетических методов выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и количественной оценки вирусной нагрузки (ВН) в тканях различных органов. Кроме того, не установлена связь между уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких и паттерном гистопатологических изменений легочной ткани при COVID-19. Не до конца раскрыто значение «легочных факторов», способствующих внелегочному распространению SARS-CoV-2, а также практически отсутствуют данные о частоте диссеминации и уровню ВН SARS-CoV-2 в тканях жизненно важных органов пациентов с COVID-19. Только комплексное патологоанатомическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования позволят раскрыть патогенетические механизмы SARS-CoV-2-ассоциированных поражений ткани легких и других жизненно важных органов, являющихся причиной смерти пациентов с COVID-19.

Цель исследования. Исследовать характер гистопатологических изменений и особенности молекулярно-генетической, иммуногистохимической и электронно-микроскопической детекции коронавируса SARS-CoV-2 в легких пациентов с COVID-19.

Задачи исследования:

1. Описать патологическую анатомию легких у умерших пациентов с COVID-19.
2. Разработать набор олигонуклеотидов и способ количественной оценки уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19.
3. Исследовать частоту выявления и значения уровня ВН коронавируса SARS-CoV-2 и ее патогенетическую связь с гистопатологическими изменениями ткани легких у умерших пациентов с COVID-19.

4. Определить возможные факторы способствующие мультиорганной диссеминации частиц SARS-CoV-2 у умерших пациентов с COVID-19.

5. Выявить клеточную и тканевую тропность коронавируса с использованием мкАт против S- и NC-белков SARS-CoV-2.

6. Описать электронно-микроскопические особенности ультраструктурного строения и клеточно-тканевой локализации частиц SARS-CoV-2

Научная новизна исследования.

Впервые:

- разработан набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидов и способ количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, защищенные патентом на изобретение RU 2761358 C1 от 07.12.2021 года;

- проведена количественная оценка уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов оригинальным способом, при котором истинная копия кДНК SARS-CoV-2 и ABL1 вычислялись относительно стандартной кривой, построенной на основе серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-T Easy со встроенным участком кДНК SARS-CoV-2 и участком кДНК ABL1, с корреляцией $R^2 \geq 0,99$, а вирусная нагрузка выражается числом копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена ABL1;

- установлена сильная прямая корреляционная связь между уровнем ВН SARS-CoV-2 и гистопатологическими изменениями в легких у умерших с COVID-19;

- выявлено отсутствие патогенетической связи между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях печени, сердца, почек и значениями биохимических маркеров их функциональной недостаточности;

- при электронно-микроскопическом исследовании обнаружены частицы коронавируса SARS-CoV-2 в лимфоидных клетках.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Разработанный способ молекулярно-генетического исследования SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19 значительно расширяет арсенал лабораторной диагностики, позволяя не только детектировать, но и давать количественную оценку ВН SARS-CoV-2. Уровень ВН SARS-CoV-2 в легких в совокупности с гистопатологической картиной легких может быть использован для прогнозирования масштабов мультиорганных поражений и фатального исхода тяжелого течения COVID-19. Электронно-микроскопическое выявление частиц SARS-CoV-2 в лимфоидных клетках позволяет радикально пересмотреть патогенез тяжелых лимфопений при новой коронавирусной инфекции и ее тяжелых осложнениях.

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационного исследования использованы патоморфологическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и трансмиссионное электронно-микроскопическое исследование, анализ клинической документации и методы статистической обработки результатов. В качестве материала использованы образцы фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей легких, головного

мозга, сердце, печени, селезенки, почек и трахеобронхиальных лимфатических узлов пациентов, умерших от COVID-19 и подвергшихся обязательному аутопсийному исследованию в отделении патологической анатомии ГБУЗ «ГКБ им. Е.О. Мухина ДЗМ» в период с мая по ноябрь 2020 года. Объем выборки составил 110 пациентов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что у всех умерших с COVID-19 в ткани легких РНК коронавируса SARS-CoV-2 была выявлена только в 94,4% наблюдений, несмотря на прижизненный положительный результат ПЦР РВ на SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки у всех обследованных.

2. Показана высокая чувствительность и специфичность набора синтетических олигонуклеотидов и способа количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов (патент RU 2761358 С1 от 07.12.2021 года).

3. Доказано, что высокая вирусная нагрузка и экссудативная фаза ДАП способствуют внелегочному распространению коронавируса SARS-CoV-2 у умерших пациентов с COVID-19.

4. Установлено отсутствие патогенетической связи между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях печени, сердца, почек и значениями биохимических маркеров их функциональной недостаточности;

5. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружены частицы коронавируса SARS-CoV-2 в лимфоидных клетках в капиллярах легких у пациентов, умерших с COVID-19.

Степень достоверности. Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством исследованного материала и использованием современных высокотехнологичных методов исследований, применением методов статистической обработки полученных результатов и их сопоставлением с данными других авторов, а также получением патента на изобретение и одобрением ведущих специалистов мира в данной области к публикации наших результатов в рецензируемых журналах из первого квартиля (Q1) МБД Scopus и WoS.

Апробация результатов работы. Результаты работы доложены и обсуждены в XXIV Российском онкологическом конгрессе (г. Москва, 11-14 ноября 2020 г.); на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 12-23 апреля 2021 г.); в онлайн-конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2021. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика» (г. Москва, 28-29 апреля 2021 г.); на Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института — 60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына (г. Москва, 18-19 ноября 2021 г.); на заседании кафедры патологической анатомии медицинского института РУДН, 2021 г.

Публикации по теме работы. По материалам диссертационного исследования опубликовано 10 работ, в том числе 1 статья в издании из Перечня,

рекомендованного Ученым советом РУДН, 4 публикации в журналах, индексируемых в МЦБ WoS и Scopus, 1 патент на изобретение (RU 2761358 С1 07 декабря 2021 г.), 4 публикации в сборниках работ научных конференций.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в лабораторную практику лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ, в учебный процесс кафедры патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка литературы. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 8 таблиц и 39 рисунков. Библиография содержит 194 источника, из них 12 отечественных и 182 иностранных источника литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для патоморфологических, молекулярно-генетических и иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований явилось нативные и обработанные формалином и заключенные в парафиновые блоки тканей легких, головного мозга, сердце, печени, селезенки, почек и трахеобронхиальных лимфатических узлов взятых на аутопсии 110 умерших пациентов при патологоанатомическом исследовании в отделении ГБУЗ «ГКБ им. Е.О. Мухина ДЗМ» в период с мая по ноябрь 2020 года. Длительность пребывания пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии с момента госпитализации до летального исхода составила от 1 до 27 дней (среднее значение 9,5 койко-дней, $M = 9$ койко-дней). Забор аутопсийного материала для гистологических исследований осуществляли согласно Временным методическим рекомендациям Минздрава России (версия 9 от 26.10.2020). Из фиксированных в 10%-ном забуференном формалине и заключенных в парафин тканей головного мозга, двух зон обоих легких, сердца, обеих почек, печени и селезенки, правых и левых перибронхиальных лимфатических узлов приготавливали 8-10 срезов толщиной 3-5 мкм для молекулярно-генетического исследования коронавируса SARS-CoV-2. Экстракция РНК проводилась с использованием набора Pure Link™ FFPE («Thermo Fisher Scientific», США) и innuPREP FFPE total RNA Kit («Analytik Jena GmbH», Германия). Для получения кДНК в объеме 20 мкл, проводилась реакция обратной транскрипции с использованием 10 мкл раствора РНК и набора реагентов «Реверта-Л» («Интерлабсервис», Россия). Для амплификации участков гена *ORF1ab*, кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена *ABL1* разработаны и синтезированы олигодезоксирибонуклеотидные праймеры с оригинальной нуклеотидной последовательностью. Полученные ампликоны гена *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена *ABL1* путем генно-

инженерной технологии вставлены в плазмидный вектор pGEM®-T Easy (“Promega”, США). После трансфекции и культивирования компетентных клеток, была выделена плазмидная ДНК. Из плазмид *pGEM®-T Easy* со вставкой участков гена *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена *ABL1* были изготовлены серийные разведения с различной концентрацией копий кДНК SARS-CoV-2 и *ABL1* в 10 мкл. Для проведения количественной ПЦР РВ был разработан и синтезирован оригинальный набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов, комплементарных к гену *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческому гену *ABL1*.

Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 в различных тканях пациентов с COVID-19 рассчитывается отношением числа истинных копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена *ABL1*, по формуле:

$$N^{\text{SARS-CoV-2}}/N^{\text{ABL1}} \times 100$$

где $N^{\text{SARS-CoV-2}}$ - число копий кДНК SARS-CoV-2, N^{ABL1} - число копий кДНК человеческой *ABL1*, с чувствительностью не ниже 50 копий кДНК SARS-CoV-2 в исследуемом образце тканей различных органов. Результат анализа интерпретируется как число копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий мРНК человеческой *ABL1*.

Для выявления возможных мутаций RBD и идентификации штамма SARS-CoV-2 мы провели секвенирования гена Spike по Сэнгеру. Определение штаммовой принадлежности SARS-CoV-2 осуществлены путем сверки данных секвенирования по Сэнгеру с эталонной последовательностью генома SARS-CoV-2 на платформе Nextclade v1.13.1 (<https://clades.nextstrain.org/>).

Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием коммерческих первичных МкАТ против S-белка коронавируса SARS-CoV-2 компании «GeneTex» (клон 1A9, кат. №GTX632604), и кроличьих ПкАТ производства «Abcam» (кат. №ab272504).

Для ТЭМ исследования нативные образцы легких, лимфатических узлов и почек фиксировали при +4°C в 4% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2-7,4), и дофиксировали при +4°C в 1% растворе тетраоксида осмия в течение 2-3 часов. После стандартной проводки в спиртах, на стадии 70% этанола образцы тканей контрастировали в уранилацетате в течение ночи, обезвоживали в ацетоне и заключали в Эпон. Из заключенных в Эпон тканевых блоков получали ультратонкие срезы, которые переносили на сеточки и подвергали дополнительному контрастированию уранилацетатом и цитратом свинца по Reynolds (1963). Срезы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 1400 («JEOL», Япония).

Статистический анализ осуществляли при помощи бесплатной и открытой статистической платформы jamovi (версия 1.6, <https://www.jamovi.org>) в среде Microsoft Windows 10. Статистическую обработку результатов проводили с оценкой вида распределения, определением среднего M , стандартной ошибки se (на диаграммах доверительный интервал). Достоверность различий между независимыми выборками с нормальным распределением определяли по t -

критерию Стьюдента. Для обработки непараметрических данных использовали U-критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости принимали равным 0,05. Корреляционные взаимоотношения между различными группами оценивали с помощью коэффициентов Пирсона и Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наша группа пациентов состояла из 56 мужчин, в возрасте 37-97 лет (среднее значение 69,3 лет, М = 67 лет), и 54 женщин, в возрасте 41-95 лет (среднее значение 73,3 лет, М = 74,5 лет).

Макроскопическое исследование легких выявило различной степени выраженности участки уплотнения легочной паренхимы: в 8,2% наблюдений имели место очаговые изменения в одном легком и тотальное уплотнение второго, в 47,3% двустороннее субтотальное уплотнение, в 37,3% - двустороннее тотальное уплотнение. В 67,3% наблюдений были выявлены обширные сливные очаги кровоизлияний. В 29,1% наблюдений в просветах ветвей легочных артерий были обнаружены множественные темно-красными обтурирующие тромбы, местами плотно спаянные с интимой, в 19,1% - тромбоемболы. В 33,6% наблюдений было выявлено значительное увеличение (до 4,5 см в диаметре) размеров трахеобронхиальных лимфатических узлов. Аналогичные макроскопические признаки были описаны и в работах других авторов [Odilov A.A. et al., 2020; Odilov A.A. et al., 2021; ДЗМ, 2020; Worczuk A.C., 2021] с различием в частоте выявления описываемого признака. Так, частота тромбозов легочных артерий, по данным литературы, может достигать 40-58%, а ТЭЛА - 25-33% наблюдений [Edler C. et al., 2020; Wichmann D. et al., 2020]. В настоящее время COVID-19-ассоциированную коагулопатию считают одним из гематологических проявлений SARS-CoV-2 инфекции [Samsonova M.V. et al., 2020, Tang N. et al., 2020; Bikdeli B. et al., 2020; Connors J.M. et al., 2020]. Высокая частота увеличенных внутригрудных лимфатических узлов при COVID-19, выявляемая при аутопсиях, была отмечена и другими исследователями [Prilutskiy A. et al., 2020; Yan L. et al., 2020].

При гистологическом исследовании легких в 84,5% наблюдений выявилась внутриальвеолярная и интерстициальная клеточная инфильтрация, состоящая из лимфоцитов, макрофагов, плазмочитов, а также полиморфноядерных лейкоцитов, в 79,1% - десквамация альвеолярного и бронхиолярного эпителия, в 77,3% - гиалиновые мембраны, в 73,6% - полнокровие сосудов легких, капиллярный стаз со сладжем эритроцитов, в 68,1% - внутриальвеолярный отек, в 54,5% - внутриальвеолярные кровоизлияния, в 51,8% - тромбозы легочных артерий и вен различного калибра, в 39,1% - утолщение межальвеолярных перегородок за счет пролиферации фибробластов и интерстициального фиброза, и в 12,7% - перибронхиальный и периваскулярный фиброз. Согласно литературе, частота выявления внутриальвеолярной и интерстициальной клеточной инфильтрации составляет 54,2%, гиалиновых мембран - 64,6%, гиперемий и капиллярных стазов - 14,4%, внутриальвеолярного и интерстициального отека - 54,3%, интраальвеолярных кровоизлияний - 24,6%, микротромбозов - 28% наблюдений [Samsonova M.V. et al., 2020, ДЗМ, 2020]. Однако, по данным отдельных

исследований частота кровоизлияний в паренхиму легких (от единичных очагов до масштабных диффузных участков) может достигать 84,2% [Carsana L. et al., 2020], а микротромбозов - 72% случаев [Grosse C. et al., 2020; Hanley B. et al., 2020; Rapkiewicz A.V. et al., 2020]. Утолщение межальвеолярных перегородок и плоскоклеточная метаплазия описывались в 65,3% и 37,3% наблюдений, соответственно [ДЗМ, 2020; Odilov A.A. et al., 2020; Odilov A.A. et al., 2021]. Плоскоклеточная метаплазия эпителия дистальных отделов дыхательных путей и альвеол, в основном, ассоциируется с более длительным течением болезни [Borczyk A.C. et al., 2020; Carsana L. et al., 2020; Grosse C. et al., 2020; Kommoss F.K.F. et al., 2020].

В совокупности большинство обнаруженных в легочной ткани гистопатологических изменений были характерны для различных фаз диффузного альвеолярного повреждения (ДАП) и/или бронхопневмонии в сочетании с очагами кровоизлияний, некротических и фиброзных изменений. Наиболее часто выявленными гистопатологическими признаками, характерными для экссудативной фазы ДАП были внутриальвеолярный и интерстициальный отек, с различной степенью кровоизлияний и отложениями фибрина, гиалиновые мембраны, выстилающие контуры альвеол, мононуклеарная инфильтрация межальвеолярных перегородок, полнокровие мелких сосудов легких, капиллярный стаз и фибриновые тромбы (рисунок 1).

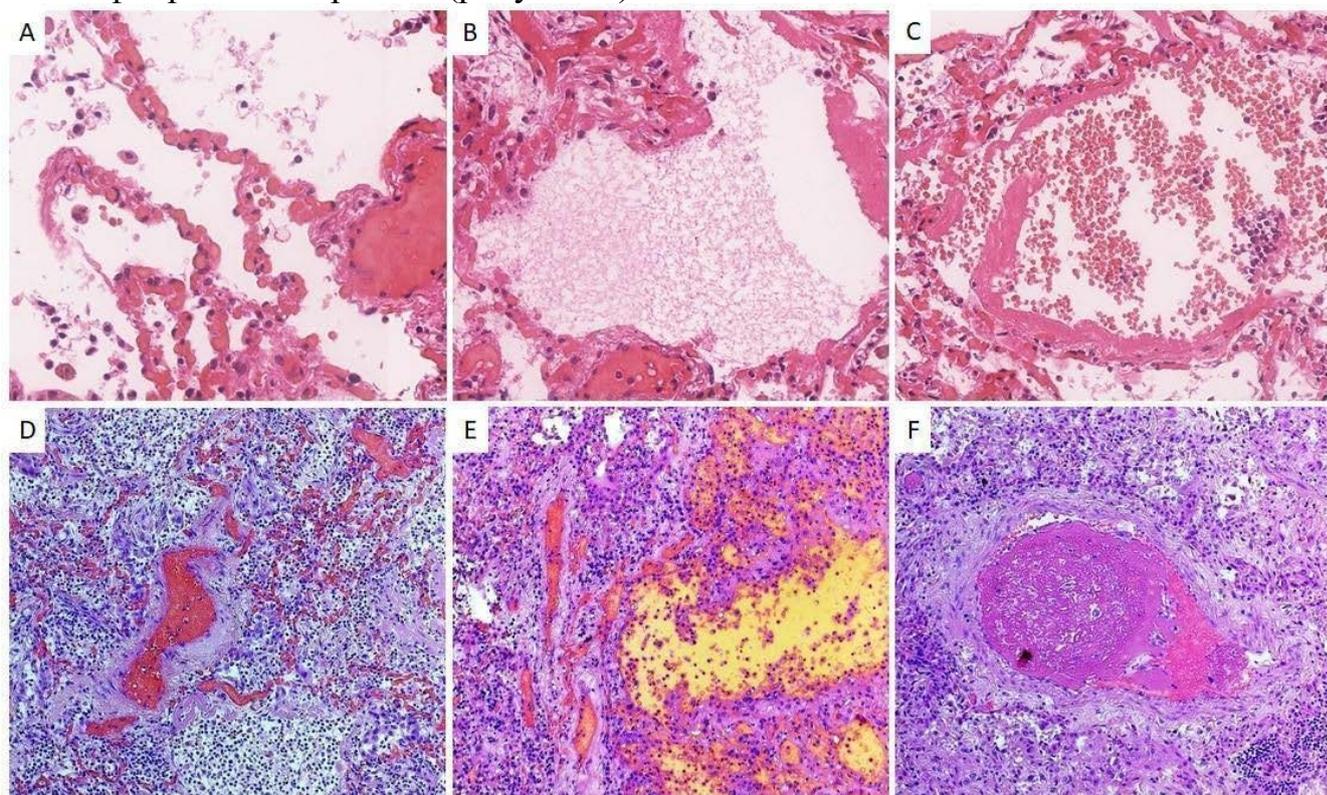


Рисунок 1. Гистопатологические признаки экссудативной фазы ДАП. А. Полнокровие сосудов легких и стаз капилляров межальвеолярных перегородок, х300; В. Внутриальвеолярный отек и гиалиновые мембраны по контуру альвеол, х300; С. Гиалиновая мембрана по контуру альвеолы, х200; D. Полнокровие и стазы в сосудах легких с мононуклеарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, х100. Е. Очаги кровоизлияния с гемолизом эритроцитов, х100. F. Обтурирующий фибриновый тромб в просвете сосуда легкого, х100. Окраска гематоксилином и эозином.

Гистопатологическая картина пролиферативной фазы ДАП включала остаточные гиалиновые мембраны, утолщение межальвеолярных перегородок за счет пролиферации фибробластов, и гиперплазию альвеолоцитов II типа. Могут встречаться единичные реактивные альвеолоциты II типа с выраженной ядерной атипией, множественными митотическими фигурами, а также многоядерные клетки (рисунок 2А-С). При бронхопневмонии отмечалась заполнение полости альвеол и просвета бронхов полиморфноядерной клеточной инфильтрацией (рисунок 2D, E). В отдельных участках легких выявлялись очаги эмфизематозные расширения альвеолярных ходов (рисунок 2F).

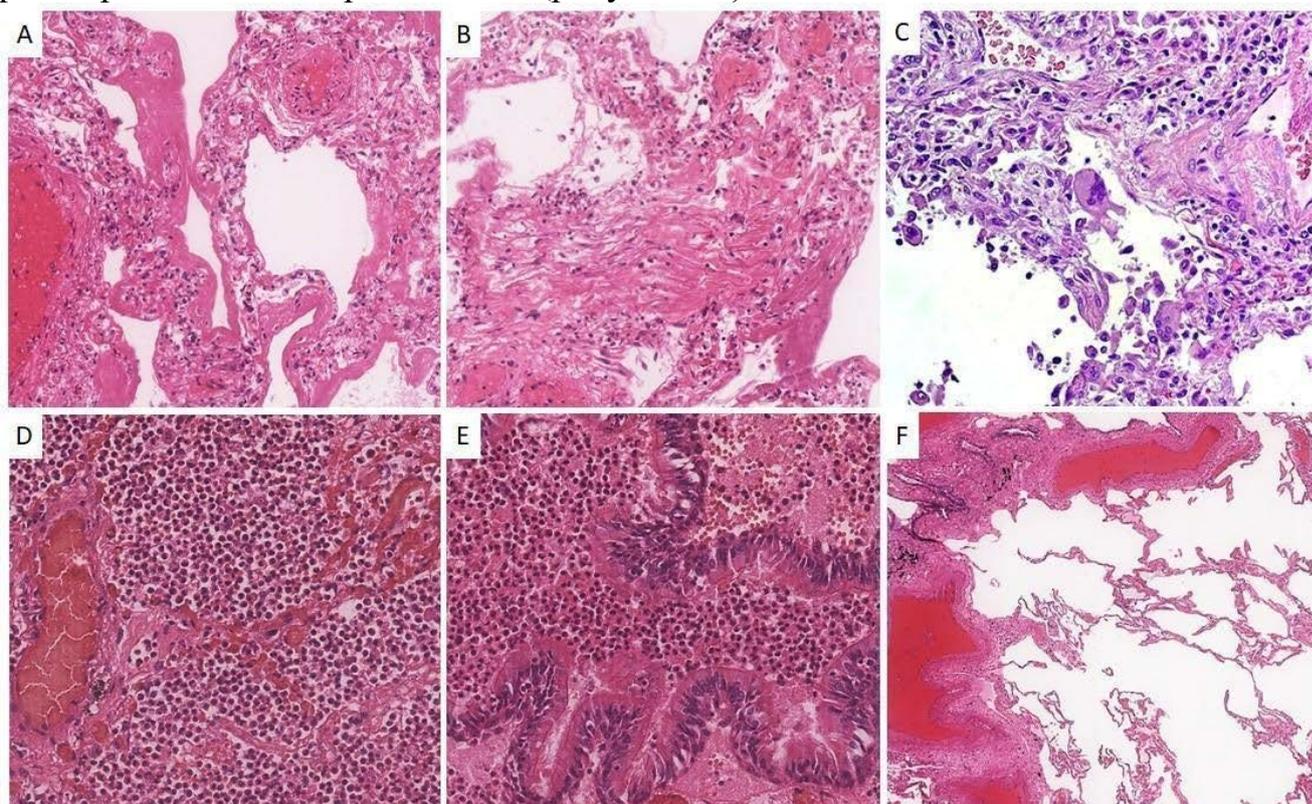


Рисунок 2. Гистопатологические признаки пролиферативной фазы ДАП и бронхопневмонии с эмфизематозно расширенными альвеолами. А, В. Утолщенные за счет пролиферации фибробластов межальвеолярные перегородки, x100; С. В просвете альвеол встречаются единичные крупные атипичные многоядерные клетки, x200; D, E. Скопления нейтрофилов в просветах альвеол и терминальной бронхиолы, x200; F. Расширение альвеолярного хода без обмеления альвеол, x40. Окраска гематоксилином и эозином.

Однако, стоит отметить, что в некоторых случаях гистопатологические изменения в образцах ткани взятой из разных участках одного и того же легкого имели гистопатологические признаки, характерные для разных фаз ДАП.

По утверждениям ряда авторов наиболее характерным признаком SARS CoV-2-ассоциированных ДАП легких является образование многоядерных уродливых клеток [Grosse C. et al., 2020; Kommos F.K.F. et al., 2020]. Однако, по данным других исследований, ДАП при COVID-19 неразличимо от ДАП, вызванных другими причинами, за исключением более высокой частоты выявления микротромбозов и тромбоемболий [Конорка К.Е. et al., 2020]. Наличие гистопатологических изменений, не соответствующих хронологической последовательности ДАП, может объясняться персистирующим течением COVID-

19, особенно у пожилых пациентов с ослабленным иммунитетом [Samsonova M.V. et al., 2020; Borczuk A.C. et al., 2020]. Подобное сочетание комплексов гистопатологических изменений, характерных для двух фаз ДАП в различных участках одних и тех же легких, описано в работах как отечественных [Samsonova M.V. et al., 2020; Zabozyaev F.G. et al., 2020], так и зарубежных авторов [Nunes Duarte-Neto A. et al., 2020; Sauter J.L. et al., 2020]. По мнению Самсоновой и соавт., такое явление объясняется волнообразным характером процесса репликации коронавируса SARS-CoV-2 или длительной персистенцией вируса, вызывающего повторное повреждение легких [Samsonova M.V. et al., 2020]. Постоянное сочетание персистирующих признаков экссудативной фазы в период пролиферативной фазы ДАП позволяют говорить об атипичском течении ОРДС при новой коронавирусной инфекции (COVID-19) [Zabozyaev F.G. et al., 2020].

Результаты молекулярно-генетических исследований

РНК коронавируса SARS-CoV-2 выявлялась в 94,4% (34/36) случаев. Частота выявления РНК SARS-CoV-2 по органам составила: в легких – 91,67% (33/36), в трахеобронхиальных лимфатических узлах – 58,8% (20/34), в сердце – 40% (14/35), в селезенке – 35,3% (12/34), в печени – 31,4% (11/35), в почках – 20,7% (6/29) и в головном мозге – 9% (3/33). Для сравнения, по данным литературы, внелегочная диссеминация SARS-CoV-2 в лимфатические узлы составляет 70%, в сердце – 61,5%- 82%, в печень – 55-82%, в селезенку – 64,7%, в почки – 58,8-77%, в головной мозг – 53-64,7% [Puelles V.G. et al., 2020; Haslbauer J.D. et al., 2021; Lindner D. et al., 2020; Remmelink M. et al., 2020; Lagana S.M. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020].

В таблице 1 представлены результаты количественной оценки уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов 36 пациентов с COVID-19. Значения ВН SARS-CoV-2 были дополнены данными о гендерной принадлежности, возрасте, времени пребывания пациентов в ОРИТ, а также результатами гистологических исследований легочной ткани.

Все пациенты по числу органов, где была выявлена РНК SARS-CoV-2, были распределены на 3 группы: пациенты, у которых РНК SARS-CoV-2 не была выявлена ни в одном образце органов (группа 1), пациенты с моно- (группа 2) и мультиорганной (группа 3) диссеминацией коронавируса SARS-CoV-2 (таблица 1).

Таблица 1. Общая характеристика, основные гистопатологические изменения в легких и уровень ВН SARS-CoV-2 в различных органах 36 пациентов с COVID-19

№	Пол	Возраст	Время*	Фаза ДАП/другие гистопатологические изменения легких	Уровень ВН SARS-CoV-2 по органам						
					ЛЕГ.	Л/У	СЕР.	СЕЛ.	ПЕЧ.	ПОЧ.	Г/М
Группа 1. РНК SARS-CoV-2 не обнаружено (n=2)											
7	М	62	2	Пролиферативная	0	0	0	0	0	-	0
17	Ж	77	15	Пролиферативная	0	0	0	0	0	0	0
Группа 2. Моноорганная диссеминация SARS-CoV-2 (n=11)											
23	М	90	9	Бронхопневмония	0	0	1238	0	0	0	0
34	Ж	73	23	Бронхопневмония	27	0	0	0	0	0	0
29	Ж	79	24	Бронхопневмония	38	0	0	0	0	0	0
22	М	90	10	Пролиферативная	63	0	0	0	0	0	0
15	М	68	19	Бронхопневмония	190	0	0	0	0	0	0
31	Ж	78	10	Пролиферативная	208	0	0	0	0	0	0
20	Ж	85	23	Бронхопневмония	270	0	0	0	0	0	0
8	М	64	19	Пролиферативная	677	0	0	0	0	-	0
32	М	85	10	Пролиферативная	694	0	0	0	0	0	0
11	М	84	17	Пролиферативная	706	-	0	-	0	-	0
14	М	80	10	Пролиферативная	1952	0	-	0	-	-	0
Группа 3. Мультиорганная диссеминация SARS-CoV-2 (n=23)											
5	Ж	73	18	Пролиферативная / Бронхопневмония	18	0	0	0	70	0	0
6	М	66	27	Бронхопневмония	313	0	0	0	7	0	0
33	Ж	86	3	Пролиферативная	810	96	0	0	0	0	0
13	Ж	71	1	Экссудативная	834	1318	974	629	602	-	718
35	Ж	73	2	Пролиферативная	910	215	197	0	0	0	0
21	М	67	13	Пролиферативная	982	180	0	0	0	0	0
30	М	61	5	Пролиферативная / Бронхопневмония	1002	237	0	0	0	0	0
1	М	52	1	Пролиферативная	1016	112	0	0	0	0	0
25	М	74	22	Пролиферативная	1032	825	0	0	0	0	-
16	М	67	9	Пролиферативная / Бронхопневмония	2657	1110	0	0	0	0	0
4	М	76	5	Экссудативно-пролиферативная	4909	195	1267	71	47	52	0
19	М	84	24	Экссудативная	7476	1807	0	0	0	0	0
9	Ж	72	12	Экссудативная / Бронхопневмония	12116	3801	2223	-	0	0	0
28	Ж	95	7	Экссудативная	14522	839	392	34	425	0	0
3	М	84	11	Экссудативная / Бронхопневмония	14937	162	3733	9	160	0	0
27	М	84	16	Экссудативная	16867	1180	0	1320	522	0	-
18	М	85	16	Экссудативная	17817	-	270	218	0	-	0
36	М	73	2	Экссудативная	18219	2691	409	181	0	83	0
26	Ж	93	7	Экссудативная	27349	1629	1222	213	256	878	0
2	Ж	86	25	Экссудативная	73214	789	761	72	40	126	782
12	Ж	85	7	Экссудативная	151183	513	538	1891	980	-	0
24	Ж	76	11	Экссудативная	159217	11586	2418	551	0	1291	-
10	М	61	6	Экссудативная	250281	5958	6930	2899	9770	3029	2573

Примечание: Время* - время пребывания в ОРИТ до летального исхода; ЛЕГ. - легкие; Л/У - трахеобронхиальные лимфатические узлы; СЕР. - сердце; ПЕЧ. - печень; ПОЧ. - почки; Г/М - головной мозг; “-” - ПЦР РВ не прошла.

В первую группу вошли 2 пациента (мужчина 62 лет и женщина 77 лет) у которых, несмотря на прижизненный клинический диагноз COVID-19, ни в одной из исследованных тканей не была выявлена РНК SARS-CoV-2. Время пребывания пациентов в ОРИТ составило 2 и 15 койко-дней, соответственно. Гистопатологические изменения в легких обоих пациентов соответствовали пролиферативной фазе ДАП.

Вторую группу составили 11 пациентов (7 мужчин и 4 женщины) в возрасте от 64 до 90 лет, у которых РНК SARS-CoV-2 была выявлена только в одном из исследованных органов (моноорганная диссеминация). У 10 из них РНК SARS-CoV-2 была выявлена только в образцах ткани легких, а у пациента №23 только в сердечной ткани. Среднее время пребывания в ОРИТ составило 16 (диапазон 9-24) дней. Гистопатологические изменения в легких у данной группы пациентов соответствовали бронхопневмонии (n=5) и пролиферативной фазе ДАП (n=6). Медиана ВН легкие^{SARS-CoV-2+} в группе 2 с моноорганной диссеминацией составила 481 (27-1952) копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 ABL1.

В третью группу вошли 22 пациента (13 мужчин и 9 женщин) в возрасте 52-95 лет (медиана – 77 лет), у которых РНК SARS-CoV-2 была выявлена в двух и более исследованных органов (мультиорганная диссеминация). У пациентов данной группы медиана времени пребывания в ОРИТ составила 11 (диапазон 1-27) дней. Гистопатологические изменения в легких у более половины пациентов, особенно с ВН \geq 4909 характеризовались исключительно признаками экссудативной фазой ДАП. Диапазон ВН SARS-CoV-2 в легких пациентов с мультиорганной диссеминацией составил 18-250281 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 ABL1. Диапазон ВН SARS-CoV-2 в лимфатических узлах составил 112-11586, в сердце – 270-6930, в печени – 7-9770, в селезенке – 9-2899, в почках – 52-2899, и в головном мозге – 718-2573 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК ABL1.

Накопилось большое число данных о мультисистемных проявлениях инфекции COVID-19, зачастую обусловленные внелегочной диссеминацией и тропизмом коронавируса SARS-CoV-2 к тканям жизненно важных органов, в частности, сердца, почек, печени и головного мозга пациентов с COVID-19 [Puelles V.G. et al., 2020; Wong D.W.L. et al., 2021]. Частота выявления РНК SARS-CoV-2 в легких нашей когорты исследованных пациентов с COVID-19 составила 91,66% (33/36), что сравнимо с результатами других исследований, где РНК SARS-CoV-2 выявляли в 94-100% случаев [Tian S. et al., 2020; Hanley B. et al., 2020]. Диапазон уровня ВН SARS COV-2 в легких наших пациентов с COVID-19 составил от нуля до 250281 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 ABL1. При этом средний уровень ВН SARS-CoV-2 в легких с преобладанием гистопатологических изменений, характерных для пролиферативной и экссудативной фаз ДАП, отличался в 60 раз. Возможно поэтому именно экссудативная фаза ДАП легких считается наиболее благоприятным «временным окном», в котором вероятность обнаружения SARS-CoV-2 в легких наиболее высокая [Schaefer I.M. et al., 2020].

Мы предполагаем, что высокая частота диссеминаций и уровень ВН SARS-CoV-2 в лимфатические узлы, свидетельствует о лимфогематогенным пути распространения SARS-CoV-2 при нарушении кровообращения. Подтверждением

наших предположений служат результаты других исследований, где самая высокая ВН SARS-CoV-2 вне легких также была детектирована в прикорневых лимфатических узлах. Тем не менее, авторы связывают данное явление только с топологической близостью их к первичному очагу в легком [Deinhardt-Emmer S. et al., 2021].

При статистическом анализе данных была выявлена сильная прямая корреляционная связь гистопатологической фазы ДАП в легких с уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких (Spearman's $\rho=0.846$, $p<0.001$), и частотой диссеминации SARS-CoV-2 в органах (Spearman's $\rho=0.777$, $p<0.001$) – более высокие значения уровня ВН SARS-CoV-2 и более высокая частота внелегочной диссеминации были характерны для экссудативной фазы ДАП. Выявленная взаимосвязь более высокого значения уровня ВН SARS-CoV-2 с экссудативной фазой ДАП легких отмечена и другими авторами [Sauter J.L. et al., 2020; Schaller T. et al., 2020]. Таким образом экссудативная фаза ДАП и высокая ВН SARS-CoV-2 являются “легочными факторами” мультиорганной диссеминации SARS-CoV-2. Кроме того, была выявлена отрицательная корреляционная связь между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в легких и временем пребывания пациентов в ОПИТ до летального исхода ($r_s=-0.348$, $p=0.037$) – пациенты с меньшим временем пребывания в ОПИТ имели более высокие значения уровня ВН SARS-CoV-2 в легких, и наоборот.

Прямое секвенирование по Сэнгеру показало, что все выявленные нами изоляты принадлежат к корневому штамму 19A. Тем не менее, в хроматограммах сиквенса пациента №13 была выявлена коинфекция двумя мутантными вариантами коронавируса: SARS-CoV-2 с.23191C и SARS-CoV-2 с.23191T. Аминокислотная последовательность в структуре S-белка в выявленном нами случае коинфекции SARS-CoV-2 является идентичной, так как мутация с.23191C/T является синонимичной. В данном случае перекрестная контаминация исключается, так как это был единственный случай выявления изолята SARS-CoV-2 с.23191T в лаборатории, где проводилось наше исследование. Подобные явления коинфекции, по мнению некоторых авторов, может объясняться тем, что коронавирусу SARS-CoV-2 характерна высокая частота мутаций с образованием квазивидов (субпопуляций) в организме одного хозяина [Ko S.H. et al., 2021; Kuipers J. et al., 2020; Liu S. et al., 2020].

Результаты иммуногистохимических исследований

ИГХ-исследование тканей легких с использованием MkAT против S-белка SARS-CoV-2 выявило диффузное положительное окрашивание цитоплазмы альвеолоцитов (рисунок 3А), в зонах внутриальвеолярного отека и гиалиновых мембранах, а также в виде яркой положительной реакции в цитоплазме единичных крупных клеток (рисунок 3В), в альвеолярных макрофагов и многоядерных уродливых клеток (рисунок 3С,Д), в части интерстициальных клеток в участках ткани легкого с расширенной и утолщенной альвеолярной перегородкой (рисунок 3Е), а также в единичных клетках частично десквамированного призматического эпителия бронхиол (рисунок 3F).

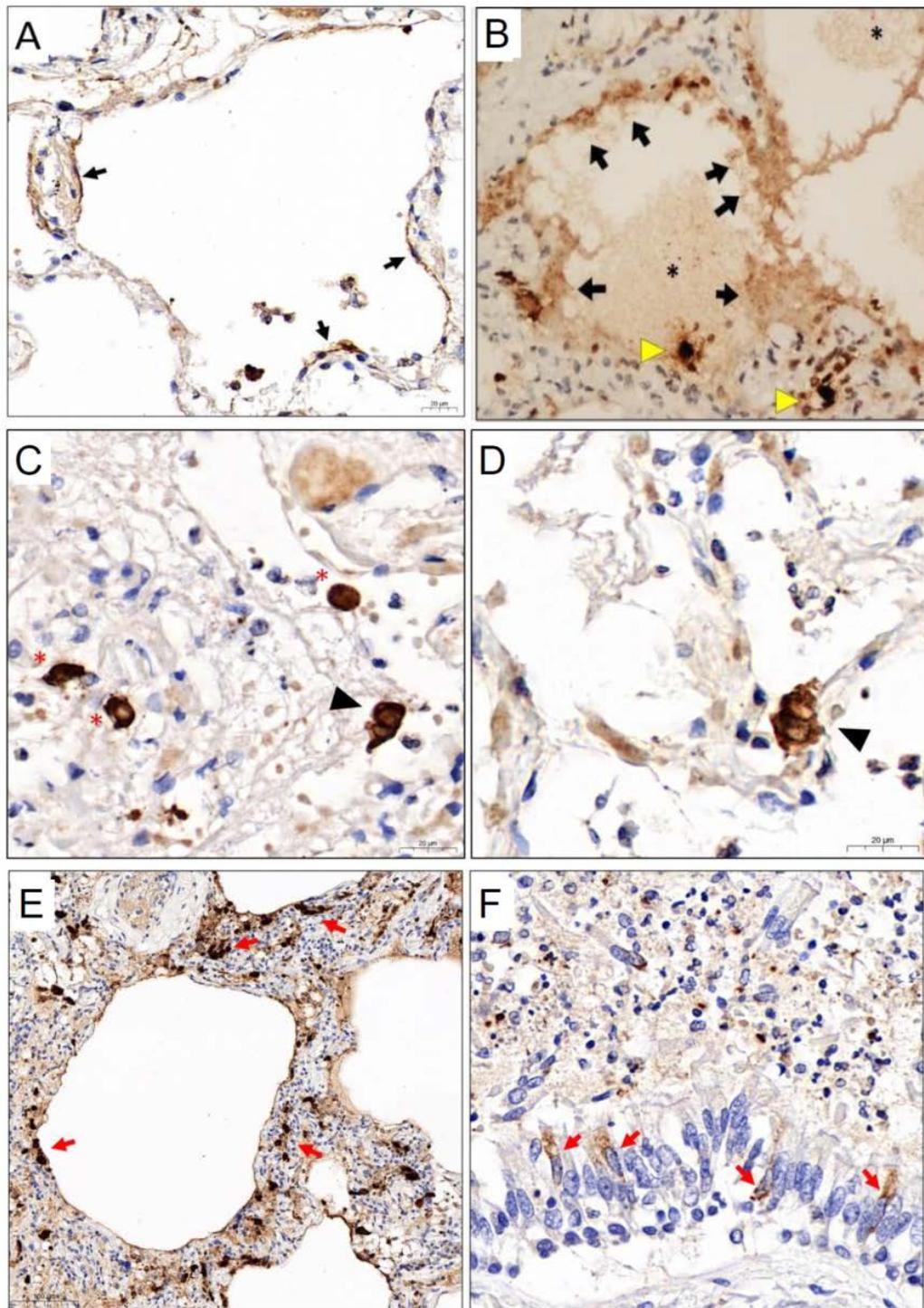


Рисунок 3. Экспрессия S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в легком. А. Яркая положительная реакция в альвеолоцитах, выстилающих полость альвеол (черные стрелки), $\times 400$; В. Положительное окрашивание в фокусах внутриальвеолярного отека (звездочка) и гиалиновых мембранах (стрелки), а также яркая положительная реакция в цитоплазме единичных крупных клеток (желтая стрелочная головка), $\times 200$; С. Яркая положительная реакция в цитоплазме альвеолярных макрофагов (красные звездочки) и мультаядерной синцитиальной клетки (стрелочная головка), $\times 400$; D. Яркая положительная реакция в цитоплазме мультаядерной синцитиальной клетки (стрелочная головка), $\times 400$; E. Яркая положительная реакция в цитоплазме части клеток (красные стрелки) утолщенных межальвеолярных перегородок, $\times 200$; F. Слабая положительная реакция в цитоплазме единичных клеток цилиндрического эпителия бронхов (красные стрелки), а также отдельных элементов клеточного детрита, заполнившего просвет бронхов, $\times 400$. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера.

Наши результаты ИГХ исследований легких созвучны с данными других авторов [Massoth L.R. et al., 2021; Adachi T., et al., 2020; Roden A.C. et al., 2021; Hirschbühl K. et al., 2021; Barisione E. et al., 2021]. Выявленная нами мультиядерная синцитиальная клетка с яркой положительной реакцией цитоплазмы на анти-Spike антитела имеет эпителиальное происхождение [Adachi T., et al., 2020] и образуются в результате слияния инфицированных SARS-CoV-2 близлежащих клеток [Buchrieser J. et al., 2020]. Образование синцитиев является отличительным цитопатическим признаком SARS-CoV-2 инфекции [Bussani R. et al., 2020].

При ИГХ-исследовании в ткани лимфатических узлов положительная реакция к анти-SARS-CoV-2 антителам была выявлена исключительно в клетках расширенных лимфоидных синусов (рисунок 4А), что подтверждается данными ранее опубликованных работ [Martines R.B. et al., 2020; Wang C. et al., 2020; Haslbauer J.D. et al., 2021; Xiang Q. et al., 2021]. В селезенке иммунореактивность была выявлена преимущественно в клетках красной пульпы и единичных клетках капсулы селезенки (рисунок 4В). Однако, нам не удалось найти в доступной литературе сведений о результатах ИГХ детекции SARS-CoV-2 в селезенке.

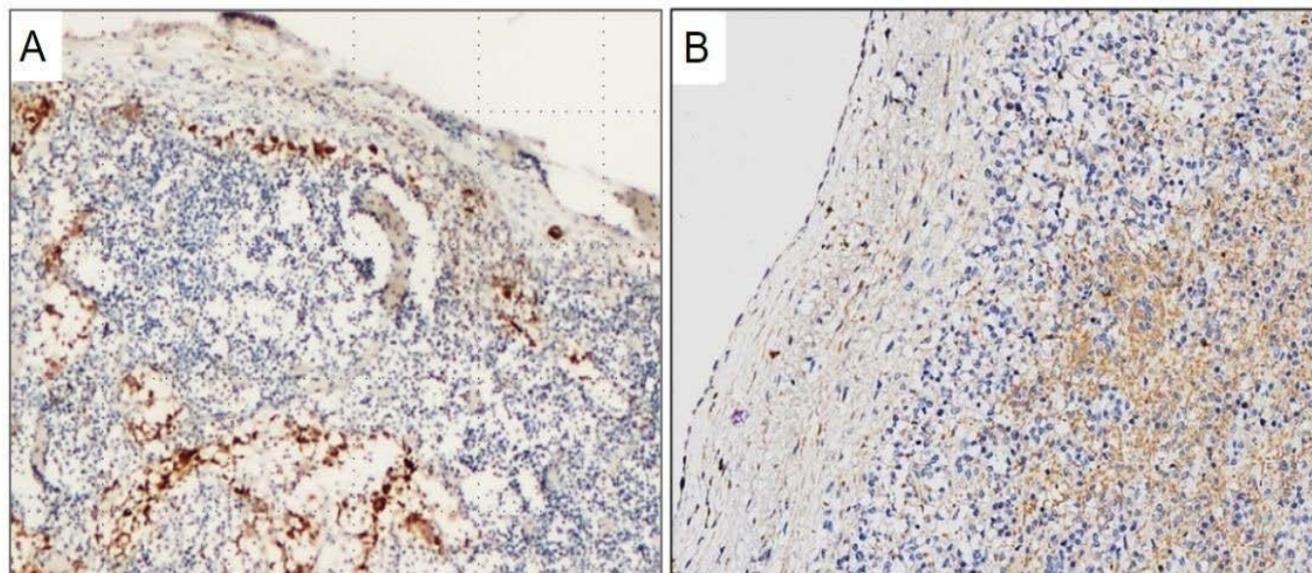


Рисунок 4. Экспрессия S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в лимфатических узлах и селезенке. А. Положительная реакция в цитоплазме синусовых гистиоцитов лимфатических узлов; В. Положительная реакция в единичных клетках капсулы селезенки и клетках пульпарных тяжей Бильрота. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, x200.

Иммунореактивность к анти-S SARS-CoV-2 МкАТ (GeneTex) была также выявлена в эндотелиальных клетках капиллярной сети и клетках париетального эпителия капсулы почечных клубочков (рисунок 5А), в гладкомышечных клетках стенки сосудов почек (рисунок 5В), в клетках частично некротизированного канальцевого эпителия почек (рисунок 5С,Д). При использовании ПкАТ против S-белка SARS-CoV-2 (Abcam) положительное окрашивание отмечалось в единичных клетках капиллярной сети почечных клубочков (рисунок 5Е). Наши данные существенно дополняют результаты ИГХ исследований почек других исследователей [Bradley B.T. et al., 2020; Su H. et al., 2020; Pérez A. et al., 2021].

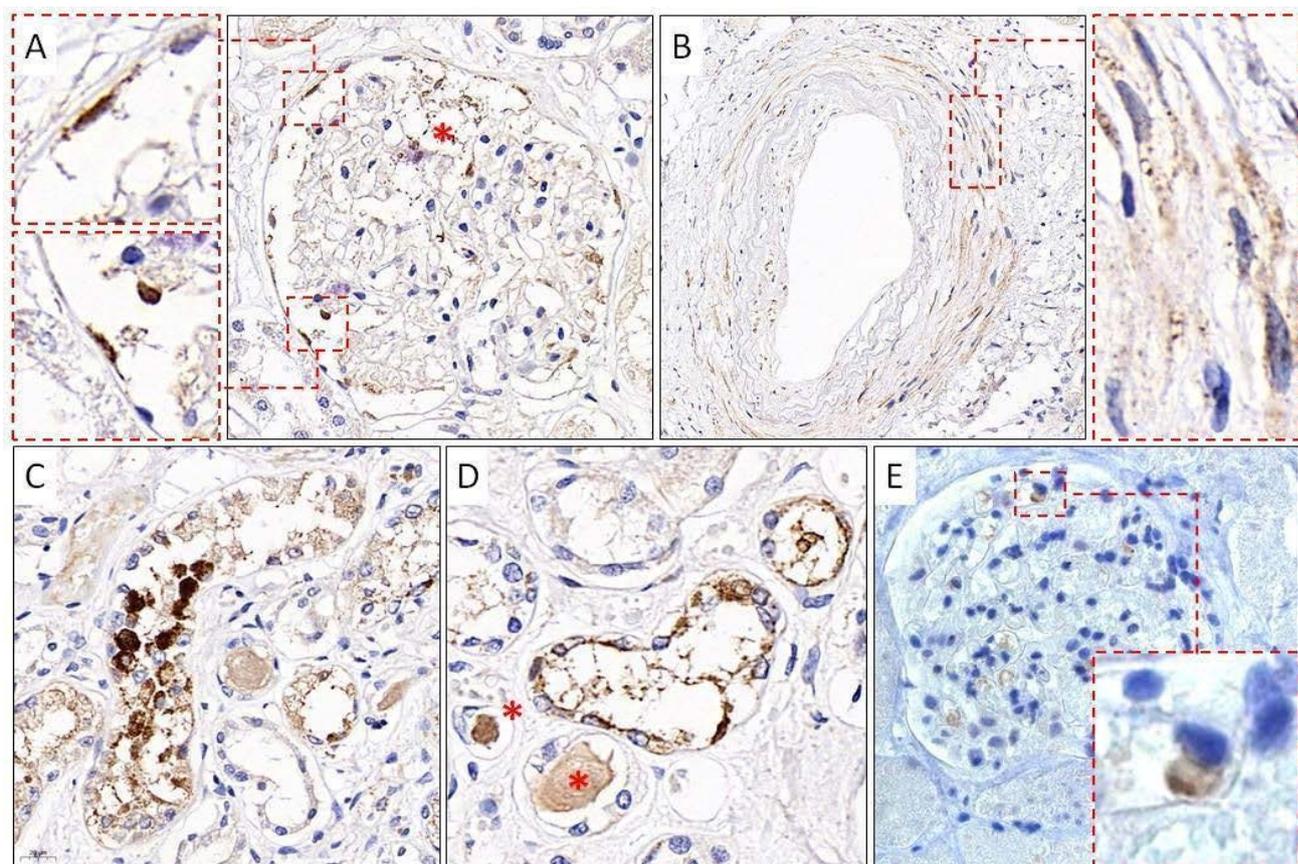


Рисунок 5. Экспрессия S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в почке. А. SARS-CoV-2-положительное окрашивание эндотелиальных клеток капиллярной сети (*красная звездочка*) и клеток париетального эпителия (*красные рамки*) капсулы почечных клубочков, GTX632604, x400; В. Иммунореактивные гладкомышечные клетки стенки сосудов почек, GTX632604, x400; С-Д. Положительное окрашивание клеток извитых канальцев почек и гомогенного белкового содержимого в просвете канальцев (*красные звездочки*), GTX632604, x400; Е. Положительное окрашивание клеток капиллярной сети почечных клубочков, ab272504, x400.

Результаты электронно-микроскопических исследований

При ТЭМ-исследовании частицы коронавируса SARS-CoV-2 имели сферическую форму и размер от 80 до 130 нм. Коронавирусные частицы снаружи имели мембрану с электронно-плотными выростами S-белка, а внутри были заполнены электронно-плотной зернистой структурой – нуклеокапсидом. Частицы SARS-CoV-2 в тканях встречались как по отдельности, так и в виде кластеров внутри цитоплазматических везикул с электронно-светлым, почти прозрачным гомогенным содержимым. Описанная нами морфология коронавирусных частиц соответствует данным других исследователей [Dittmayer C. et al., 2020; Turoňová B. et al., 2020; Wang Y. et al., 2020].

Ниже на электронной микрофотографии легочной ткани представлен участок аэрогематического барьера (рисунок 6А), разделяющего внутриальвеолярную полость (IAS) и просвет капилляра базальной мембраной (BM) и эндотелиальной клеткой (EC), в цитоплазме которой были обнаружены везикулы, заполненные коронавирусными частицами (рисунок 6В-С).

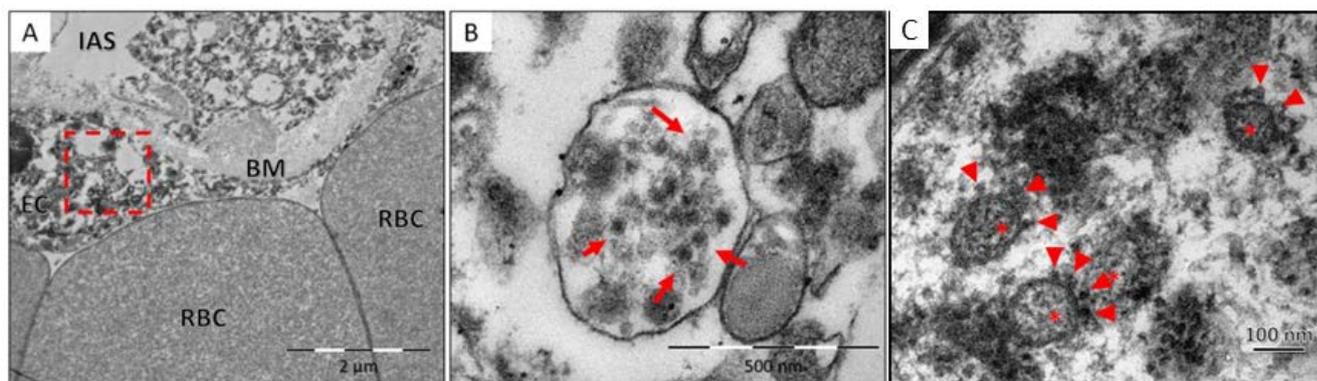


Рисунок 6. Легкое. А. Трансмиссионная электронная микрофотография легкого. А. Участок аэрогематического барьера, в котором можно различить часть эндотелиальной клетки (EC) и эритроциты (RBC); в цитоплазме эндотелиальной клетки (красная рамка) была обнаружена везикула, содержащая коронавирусные частицы; В. Везикула была заполнена сферическими коронавирусными частицами (красные стрелки); С. Внутри везикул отмечались коронавирусные частицы сферической формы, средним размером 100 нм, окруженные мембраной с электронно-плотные выростами S-белка (острие стрелки) на поверхности. В просвете частиц визуализируются зернистые структуры нуклеокапсида (звездочки).

Кроме того, в ткани легкого SARS-CoV-2 был выявлен в цитоплазме лимфоцита, обнаруженного в просвете капилляра в окружении эритроцитов (рисунок 7А). Частицы SARS-CoV-2 находились внутри везикулы, которая локализовалась вблизи ядра (N) и была связана комплексом шероховатой эндоплазматической сети и аппарата Гольджи (ER/G) (рисунок 7В). По периметру везикулы отмечались инвагинации, направленные в просвет везикулы – процесс сборки коронавирусных частиц (рисунок 7С).

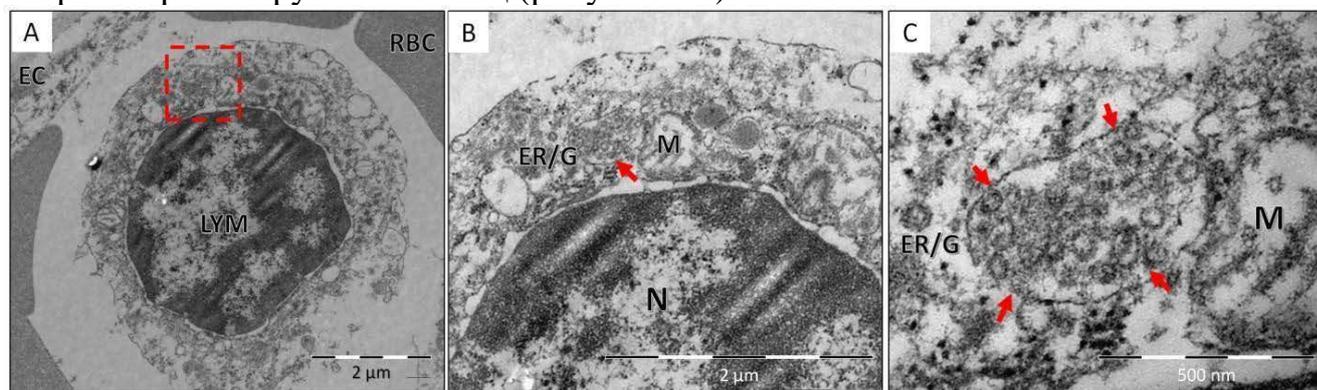


Рисунок 7. Трансмиссионная электронная микрофотография легкого. А. Участок капилляра межальвеолярной перегородки с эндотелиальной выстилкой (EC) и эритроцитами (RBC) и лимфоцитарной клеткой (LYM) в просвете. В цитоплазме лимфоцита выявлена везикула с коронавирусными частицами (красная рамка); В. Везикула локализовалась юкстануклеарно (N), рядом с митохондрией (M), и была связана с мембранным комплексом шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (ER/G); С. При большем увеличении везикула заполнена частицами SARS-CoV-2, и видно отпочковывание коронавирусных частиц от мембраны везикулы – идет сборка вируса (красные стрелки).

При ТЭМ ткани лимфатических узлов частицы SARS-CoV-2 были обнаружены в цитоплазме макрофага, расположенного в непосредственной близости к гемокапилляру. Выявление коронавирусных частиц в клетках трахеобронхиальных лимфатических узлов было описано и другими исследователями [Xiang Q. et al., 2021], тем не менее, в отличие от них, нам удалось

идентифицировать тип инфицированной клетки, что существенно дополняет знания о клеточном тропизме SARS-CoV-2.

При исследовании ткани почек коронавирусные частицы были также выявлены в цитоплазме эндотелиальной клетки капиллярной сети почечного клубочка, что дополняет данные более ранних исследований, где коронавирусные частицы в почках были выявлены в цитоплазме клеток канальцевого эпителия и подоцитах [Farkash E.A. et al., 2020; Su H. et al., 2020; Kissling S. et al., 2020].

Ультраструктурный анализ методом ТЭМ показало внутриклеточную локализацию коронавируса SARS-CoV-2 в цитоплазме эндотелиальных клеток различных органов, что подтверждается результатами других авторов [Askermann M. et al., 2020; Stahl K. et al., 2020; Varga Z. et al., 2020]. Данный факт может косвенно подтвердить гипотезу о ключевом значении эндотелиальных дисфункций в развитии мультиорганных поражений, являющихся причиной летального исхода COVID-19 [Fodor A. et al., 2021; Noris M. et al., 2020]. Патогенетический механизм развития глубоких лимфопений, обусловленной путем прямого инфицирования и последующего массивного апоптоза Т-лимфоцитов ранее были описаны при SARS-CoV и MERS-CoV инфекциях [Gu J. et al., 2005; Chu H. et al., 2016]. Тем не менее, нам впервые удалось представить ТЭМ доказательства возможности прямого инфицирования лимфоцита коронавирусом SARS-CoV-2 при COVID-19 [Abdullaev A. et al., 2021], что может пролить свет на патогенез лимфопений при COVID-19.

Таким образом, ТЭМ позволяет не только визуализировать сами частицы коронавируса SARS-CoV-2, но и указывать на её морфологическую локализацию в тканях различных органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящей диссертационной работе, позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Увеличения массы, уплотнение, кровоизлияния в ткани легких и патогистологические изменения свойственные ДАП в легких являются наиболее частыми изменениями, выявленными у пациентов, умерших с COVID-19, что подтверждается обнаружением в ткани легких РНК коронавируса SARS-CoV-2.
2. Разработанный набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидов и способ количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, являются высокочувствительным и информативным способом оценки ВН SARS-CoV-2.
3. Выявлена прямая достоверная корреляционная взаимосвязь между высокой ВН SARS-CoV-2 (≥ 4909 копий) и показателями экссудативной фазой ДАП ($r_s=0,846$, $p<0,001$), что свидетельствует о важнейшей роли ВН для острой патологии легких. В то же время обнаружено отсутствие патогенетической взаимосвязи между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях печени, сердца, почек и значениями биохимических маркеров их функциональной недостаточности.
4. Иммуногистохимическое исследование тканей различных органов с использованием мКАТ против Spike белка коронавируса SARS-CoV-2 существенно

дополняет результаты молекулярно-генетических исследований по верификации диагноза COVID-19.

5. При трансмиссионной электронной микроскопии была обнаружена внутриклеточная локализация коронавируса SARS-CoV-2 в цитоплазме эндотелиальных клеток, что свидетельствует о важном значении эндотелиальной дисфункции при развитии мультиорганных поражений при COVID-19, а наличие частиц коронавируса в цитоплазме лимфоцитов имеет важное значение в патогенезе лимфопений при COVID-19.

Практические рекомендации

Разработанный способ молекулярно-генетического исследования SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19 значительно расширяет диагностический арсенал лабораторий, позволяя не только детектировать, но и давать количественную оценку ВН SARS-CoV-2. Уровень ВН SARS-CoV-2 в легких в совокупности с гистопатологической картиной легких может быть использован для прогнозирования масштабов мультиорганных поражений при COVID-19. ИГХ и ТЭМ-исследования являются эффективными инструментами визуализации вирусных частиц, позволяющими определить клеточную и тканевую локализацию SARS-CoV-2.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Определение штаммовой принадлежности изолятов коронавируса SARS-CoV-2 в следующие волны пандемии путем секвенирования RBD домена гена *Spike* и сравнение полученных данных с характером патоморфологических изменений в различных органах даст возможность лучшего понимания патогенеза коронавирусной инфекции и, следовательно, позволит разработать более специфические подходы к терапии COVID-19. Перспективным направлением дальнейших исследований также является исследование причин и механизмов развития COVID-19-ассоциированных тромбозов и тромбоэмболий, предупреждение которых может значительно снизить смертность пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Odilov, A. A.** COVID-19: Multiorgan Dissemination of SARS-CoV-2 Is Driven by Pulmonary Factors / A. A. Odilov, A. V. Volkov, A. O. Abdullaev, T. V. Gasanova, T. V. Lipina, I. I. Babichenko // *Viruses*. - 2022. - Vol. 14. - Issue 1. - 39.
2. Abdullaev, A. O. Viral Load and Patterns of SARS-CoV-2 Dissemination to the Lungs, Mediastinal Lymph Nodes, and Spleen of Patients with COVID-19 Associated Lymphopenia / A. O. Abdullaev, **A. A. Odilov**, M. A. Ershler, A. V. Volkov, T. V. Lipina, Y. S. Lebedin, I. I. Babichenko, A. B. Sudarikov // *Viruses*. - 2021. - Vol. 13. - Issue 7. - 1410.
3. **Одилов, А.А.** Количественный анализ уровня вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких умерших пациентов с COVID-19 / А. А. Одилов, А. В. Волков, А. О. Абдуллаев, А. Б. Судариков, И. И. Бабиченко // *Туберкулез и болезни легких*. - 2021. - Том 99. - № 11. - С. 7-15.
4. **Одилов, А.А.** Изменения органов, выявленные при посмертном исследовании пациентов с COVID-19 / А. А. Одилов, Н. С. Цимбалист, А. В. Волков, И. И. Бабиченко // *Архив патологии*. - 2020. - Том 82. - № 6. - С. 63-69.
5. **Одилов, А.А.** Гистопатологическая характеристика мультиорганных поражений у пациентов с COVID-19 / А. А. Одилов, Н. С. Цимбалист, А. В. Волков, И. И. Бабиченко // *Медицинская наука и образование Урала*. - 2021. - Том 22. - № 1. - С. 53-60.
6. Abdullaev, A. O. Thrombotic events and the profile of hereditary thrombophilia factors in COVID-19 patients / A. O. Abdullaev, I. S. Fevrileva, **A. A. Odilov**, A. V. Volkov, I. I. Babichenko, A. B. Sudarikov // *HemaSphere*, Vol. 5 (Suppl. 2) (2021), Abstract number EP1325, P. 641.
7. Антипова, Н. В. Применение моноклональных антител для изучения внутриклеточной локализации SARS-CoV-2 / Н. В. Антипова, А. В. Волков, **А. А. Одилов**, И. И. Бабиченко, М. С. Павлюков, М. И. Шахпаронов // Сборник тезисов онлайн-конгресса с международным участием “Молекулярная диагностика и биобезопасность-2021. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика” под ред. акад. РАН В. Г. Акимкина. - г. Москва, 28-29 апреля 2021 г. - С. 59.
8. **Одилов, А. А.** Способ количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени для измерения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов у пациентов с COVID-19 / А. А. Одилов, А. А. Одилов // *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021»*. - г. Москва, 12-23 апреля 2021 г.
9. **Одилов, А.А.** Частота онкологических заболеваний среди 397 пациентов, умерших от COVID-19 / А. А. Одилов, А. В. Волков, Н. С. Цимбалист, И. И. Бабиченко // *Злокачественные опухоли*. - 2020. - Том 10. - № 3S1. - С. 129-130.
10. Патент № 2761358 Российская Федерация, МПК C12Q 1/6806 (2018.01), C12N 15/11 (2006.01). Набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидов и способ количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени : № 2021102762 : заявлен 05.02.2021 : опубликован 07.12.2021 / Одилов А. А., Волков А. В., Бабиченко И. И.; заявитель ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов” (РУДН).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	артериальная гипертензия
АПФ2	ангиотензинпревращающий фермент 2
ВН	вирусная нагрузка
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ДАП	диффузное альвеолярное повреждение
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИВЛ	искусственная вентиляция легких
ИГХ	иммуногистохимия
кДНК	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
кПЦР РВ	количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени
МкАТ	моноклональные антитела
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
ОГМ	отек головного мозга
ОРДС	острый респираторный дистресс синдром
ОРИТ	отделение реанимации и интенсивной терапии
ОТ	обратная транскрипция
ПкАТ	поликлональные антитела
ПОН	полиорганная недостаточность
РНК	рибонуклеиновая кислота
СД	сахарный диабет
ССН	сердечно-сосудистая недостаточность
ТЭЛА	тромбоэмболия легочной артерии
ТЭМ	трансмиссионная электронная микроскопия
ХОБЛ	хронические обструктивные болезни легких
ЦВБ	цереброваскулярные болезни
ЦНС	центральная нервная система
ABL1	Abelson interactor 1
COVID-19	coronavirus disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года
Ct	cycle threshold, порогового цикла кривых ПЦР РВ
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, Глобальная инициатива по обмену данными о птичьей гриппе
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
NSP	nonstructural protein, неструктурный белок
ORF	open reading frame, открытая рамка считывания
RBD	receptor binding domain, рецептор-связывающий домен
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus, коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2

АННОТАЦИЯ

кандидатской диссертации Одилова Акмалжона Адхамжоновича (Республика Узбекистан) «Патоморфологическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование легких при COVID-19»

Настоящая работа является результатом комплексного молекулярно-генетического, патоморфологического, иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования тканей легких и других органов пациентов, умерших с COVID-19. Количественная оценка уровня вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 проведена с использованием оригинального способа количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени и рассчитана по формуле: число копий SARS-CoV-2/число копий *ABL1* × 100, и выражена отношением истинного числа копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК гена *ABL1*. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием анти-S SARS-CoV-2 моноклональных антител (GeneTex и Abcam). Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) осуществлена на приборе JEM 1400 (JEOL, Япония), а в качестве материала использованы нативные образцы тканей различных органов с высокой ВН SARS-CoV-2. Было установлено, что сочетание экссудативной фазы диффузного альвеолярного повреждения с высокой ВН SARS-CoV-2 в легких способствует внелегочному распространению частиц коронавируса в жизненно важные органы. Уровень ВН SARS-CoV-2 в первичном очаге, в легких, оказался определяющим фактором масштаба (моно- или мульти-) органных диссеминаций. При ТЭМ-исследовании частицы коронавируса SARS-CoV-2 имели сферическую форму с размером 80-130 нм, снаружи имели мембрану с электронно-плотными выростами S-белка, а внутри были заполнены электронно-плотной зернистой структурой – нуклеокапсидом. Частицы SARS-CoV-2 в клетках встречались как по отдельности, так и в виде кластеров внутри цитоплазматических везикул с электронно-светлым, почти прозрачным гомогенным содержимым в эндотелиальных клетках, макрофагах и в цитоплазме лимфоцита.

ABSTRACT

of the PhD thesis «Pathomorphological, molecular genetic, immunohistochemical and electron microscopy study of the lungs in COVID-19» by Akmaljon A. Odilov (Republic of Uzbekistan)

This work is the result of a comprehensive molecular genetic, pathomorphological, immunohistochemical, and electron microscopy study of lung tissues and other organs of patients who died with COVID-19. SARS-CoV-2 viral load (VL) was quantified using an original quantitative real-time polymerase chain reaction method and calculated by the formula: SARS-CoV-2 copy number / ABL1 copy number × 100, expressed as the ratio of true copy number SARS-CoV-2 cDNA per 100 copies of the ABL1 gene cDNA. Immunohistochemical study was performed using anti-S SARS-CoV-2 monoclonal antibodies (GeneTex and Abcam). Transmission electron microscopy (TEM) was performed on a JEM 1400 microscope (JEOL, Japan), and native tissue samples of various organs with high SARS-CoV-2 VL were used as material. The combination of an exudative phase of diffuse alveolar damage with a high VL of SARS-CoV-2 in the lungs has been found to promote extrapulmonary spread of coronavirus particles to vital organs. The level of SARS-CoV-2 VL in the primary focus, in the lungs, turned out to be a determining factor in the scale of (mono- or multi-) organ dissemination. In a TEM study, SARS-CoV-2 coronavirus particles had a spherical shape with a size of 80-130 nm, outside they had a membrane with electron-dense outgrowths of the S-protein, and inside they were filled with an electron-dense granular structure - nucleocapsid. SARS-CoV-2 particles in cells were found both individually and in the form of clusters inside cytoplasmic vesicles with electron-light, almost transparent homogeneous contents in endothelial cells, macrophages, and in the lymphocyte cytoplasm.