

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

На правах рукописи

Одилов Акмалжон Адхамжонович

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

Специальность 3.3.2. – патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

доктор медицинских наук

Волков Алексей Вадимович

Москва – 2023

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Общие сведения о COVID-19.....	12
1.2. Строение генома, филогенез и классификация SARS-CoV-2.....	15
1.3. Патологические изменения в легких при COVID-19.....	20
1.4. Молекулярно-генетическое исследование COVID-19.....	24
1.5. Иммуногистохимическое исследование SARS-CoV-2 в тканях различных органов при COVID-19.....	29
1.6. Электронно-микроскопическое исследование тканей различных органов при COVID-19.....	32
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	35
2.1. Патологоанатомическое исследование.....	35
2.2. Забор и подготовка материала для гистологического исследования.....	36
2.3. Молекулярно-генетическое исследование.....	36
2.4. Иммуногистохимическое исследование.....	42
2.5. Электронно-микроскопическое исследование.....	44
2.6. Методы статистической обработки данных.....	44
Глава 3. Результаты исследования.....	45
3.1. Общая характеристика пациентов.....	45
3.2. Результаты патологоанатомических исследований легких.....	47
3.3. Результаты молекулярно-генетических исследований.....	57
3.4. Результаты иммуногистохимических исследований.....	64
3.5. Результаты электронно-микроскопических исследований.....	72
Глава 4. Обсуждение результатов исследования.....	77
Заключение.....	88
Практические рекомендации.....	89
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	89
Список сокращений и условных обозначений.....	90
Список литературы.....	92

Введение

Актуальность темы исследования

Пандемия COVID-19, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, стала причиной более 400 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 16 млн. случаев заболевания и более 350 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), зачастую сочетающегося с мультиорганной недостаточностью [Zayratyants O.V. et al., 2020].

В период с конца 2019 г по начало 2022 г в базе данных PubMed задокументировано более 11 тыс. публикаций, посвященных вопросам легочной патологии, и их число растет с каждым днем (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/coronavirus/docsum?text=pulmonary%20pathology>).

Неуклонный рост числа случаев смерти пациентов от COVID-19 и большой объем опубликованных данных, посвященных данной проблеме, отражает актуальность исследования патогенетических механизмов тяжелого течения и летального исхода COVID-19.

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.

Тем не менее, в данной проблеме 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 внелегочных диссеминаций и уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях жизненно важных органов пациентов с 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

К настоящему времени опубликовано множество работ с результатами молекулярно-генетической детекции РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с реакцией обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) [Lindner D. et al., 2020; Lagana S.M. et al., 2020; Remmelink M. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020]. Более того, появляются публикации не только качественного определения РНК SARS-CoV-2, но и о клинико-прогностических значениях количественной оценки ВН SARS-CoV-2 в различных биологических образцах пациентов с COVID-19, относительно пороговых циклов *Ct (cycle threshold)* ПЦР РВ [Yu F. et al., 2020]. Например, значения уровня ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки в начале болезни могут быть ассоциированы с тяжестью клинического течения и риском летального исхода COVID-19 [Yu X. et al., 2020; Pujadas E. et al., 2020; Trunfio M. et al., 2021]. 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 $VH \geq 4909$ характеризовались исключительно признаками экссудативной фазой ДАП. Диапазон VH SARS-CoV-2 в легких пациентов с мультиорганной диссеминацией составил 18-250281 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 ABL1. Диапазон VH 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.

Однако к значениям C_t 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 C_t при оценке VH SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 [Rhoads D. et al., 2020].

Таким образом, основной преградой для широкого применения метода ПЦР РВ для выявления РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов является не только техническая сложность соблюдения требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» при работе с SARS-CoV-2-инфицированными тканями различных органов, но и отсутствие в настоящее время высокоинформативных способов количественной оценки VH SARS-CoV-2 в различных тканях.

На наш взгляд, только разработка новых высокочувствительных и специфичных способов количественного измерения VH SARS-CoV-2 в тканях пораженных органов может позволить оценить возможную патогенетическую связь уровня VH с характером гистопатологических изменений в первичном очаге поражения - в легких и других, жизненно важных органах пациентов с COVID-19.

С начала пандемии COVID-19 опубликованы несколько работ по иммуногистохимической (ИГХ) визуализации частиц коронавируса с применением различных коммерческих моноклональных антител (мкАт) против Spike (S) Nucleocapsid (NC) белков SARS-CoV-2. Имеется несколько работ по иммуногистохимической визуализации антигенов SARS-CoV-2 с использованием

различных мкАТ в тканях легких [Remmelink 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, по данным некоторых исследований специфичность и чувствительность коммерческих мкАТ использованных в вышеперечисленных работах вызывает больших сомнений. Например, согласно Szabolcs и соавт., апробировавшим семь различных коммерческих антител на культуре инфицированных SARS-CoV-2 клеток и тканей пациентов с COVID-19, 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].

Несовершенства методов молекулярно-генетического выявления РНК коронавируса в тканях и отсутствия доступных высокоспецифичных мкАТ против белков SARS-CoV-2 способствовала увеличению числа работ посвященной электронно-микроскопической (ЭМ) визуализации и описания ультраструктурной морфологии коронавирусных частиц в тканях пациентов с COVID-19 [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].

Тем не менее, результаты некоторых вышеописанных работ по ЭМ в дальнейшем явились предметом широкой дискуссии среди специалистов, занимающихся электронно-микроскопической визуализацией SARS-CoV-2 [Goldsmith C.S. et al., 2020; Miller S.E. et al., 2020; Kniss D.A. et al., 2020]. Основной причиной разногласий стало сложность электронно-микроскопической идентификации частиц SARS-CoV-2 в аутопсийном материале, в котором наряду с вирус-ассоциированными субклеточными изменениями присутствуют также признаки посмертной аутолитической деструкции, вследствие чего получается

стертая ультраструктурная картина [Neil D. et al., 2020; Dolhnikoff M. et al., 2021], отличная от описанной в исследованиях с культурами клеток.

Таким образом, несовершенства методов молекулярно-генетического выявления РНК и оценки ВН SARS-CoV-2, низкая специфичность мкАт против белков коронавируса при ИГХ исследованиях, а также сложность электронно-микроскопической идентификации частиц SARS-CoV-2 в аутопсийном материале диктует необходимость их комплексного использования для решения вопроса этиологической причастности SARS-CoV-2 в развития фатальных гистоморфологических изменений легочной ткани, явившиеся 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 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 и фатального исхода тяжелого течения COVID-19. Электронно-микроскопическое доказательство возможности инфицирования лимфоидных клеток частицами SARS-CoV-2 позволит радикально пересмотреть патогенез тяжелых лимфопений, способствующих развитию тяжелых инфекционных осложнений.

Методология и методы исследования

При выполнении диссертационного исследования использована методология, построенная на системном и комплексном анализе данных. Методы, использованные в работе, представлены следующими: патологоанатомическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и трансмиссионное электронно-микроскопическое исследование, анализ клинической документации, статистическая обработка результатов.

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

Объект исследования: образцы фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей различных органов 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 олигодезоксирибонуклеотидов 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, посвященная 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 в практику

Разработанный способ количественной оценки ВН SARS-CoV-2 внедрен в лабораторную практику ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ для расширения арсенала молекулярно-генетических исследований. Полученные результаты диссертационной работы внедрены 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, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы, в которой изложены результаты собственных исследований, главы с обсуждением 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения о COVID-19

В конце 2019 года в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика) произошла вспышка тяжелой пневмонии с развитием острого респираторного дистресс синдрома, вызванная ранее неизвестным коронавирусом [Li Q. et al., 2020]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) обозначила возбудителя данного заболевания как новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV) [Zhu N. et al., 2020]. Одной из особенностей 2019-nCoV стала высокая скорость передачи инфекции от человека к человеку [Chan J.F.W. et al., 2020]. 5 января 2020 года была опубликована нуклеотидная последовательность генома нового коронавируса [Wu F. et al., 2020]. 11 февраля 2020 года Международный комитет по таксономии вирусов изменил старое название возбудителя 2019-nCoV на новое, обозначив его как SARS-CoV-2 [Hu B. et al., 2021], а вызываемое им заболевание получило официальное название COVID-19 («Coronavirus disease 2019») - коронавирусное заболевание 2019 года [Sun P. et al., 2020]. Согласно постановлению правительства Российской Федерации от 31 января 2020 г. № 66, COVID-19 был включен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих [Правительство РФ, 2020]. 11 марта 2020 года ВОЗ объявила, что распространение COVID-19 приобрело масштаб пандемии [ВОЗ, 2020]. Согласно рекомендациям Центра по контролю и профилактике заболеваний (ЦКЗ) США и ВОЗ, SARS-CoV-2 относится к биологическим агентам 3 группы риска [Kaufner A.M. et al., 2020]. В Российской Федерации, согласно постановлению главного санитарного врача №15 от 22.05.2020 г., SARS-CoV-2 был включен во II группу патогенности, наряду с SARS-CoV и MERS-CoV [Главсанврач РФ, 2020]. К настоящему времени COVID-19 насчитывает около 400 млн. случаев инфицирования, и более 6 млн. случаев летального исхода по всему миру [Dong E. et al., 2020], что делает пандемию одной из самых смертоносных в истории.

По литературным данным, основной причиной смерти пациентов с COVID-19 является острый респираторный дистресс синдром (ОРДС), развивающийся в

90% случаев [Zayratyants O.V. et al., 2020]. Второй наиболее частой причиной смерти от COVID-19 считается полиорганная недостаточность (ПОН), частота развития которой достигает 42,3% [Chen T. et al., 2020]. Другими менее частыми причинами летальности пациентов с COVID-19, по данным ряда исследований, являются сердечно-сосудистая недостаточность, тромбоэмболия легочной артерии и отек головного мозга, развивающиеся в 15,4%, 6% и 0,5% наблюдений, соответственно [Zayratyants O.V. et al., 2020; Chen T. et al., 2020].

Факторами риска летального исхода COVID-19 является наличие хронических сопутствующих заболеваний, таких как артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет (СД) II типа, ишемическая болезнь сердца (ИБС), цереброваскулярные болезни (ЦВБ) и опухоли, хронические обструктивные болезни легких (ХОБЛ), болезни печени, почек и др. [Zhou F. et al., 2020]. Так, АГ, как сопутствующая патология, выявлялась у 38,6-90% пациентов, умерших от COVID-19 [Liu M. et al., 2021; Romanova E.S. et al., 2021;]. СД II типа встречался в 18,3-38,8% случаев, ИБС – в 14-33,3%, ХОБЛ – в 3,1-14,7%, болезни печени – в 2,4-7,1%, болезни почек – в 2-11,4% [Zhang B. et al., 2020; Bahl A. et al., 2020; Xie J. et al., 2020; Ma X. et al., 2020; Liu M. et al., 2021] Онкологические заболевания характерны для 7-20% пациентов, умерших от COVID-19 [Li G. et al., 2020; Ma X. et al., 2020]. Частота ЦВБ среди пациентов, умерших от COVID-19, составляет 5,1-14,3% [Xie J. et al., 2020; Liu M. et al., 2021]. Кроме того, по данным статистических исследований, факторами риска смерти от COVID-19 являются пожилой возраст и мужской пол пациентов [Zhou F. et al., 2020; Li G. et al., 2020; Grasselli G. et al., 2021].

Наиболее частыми смертельными осложнениями COVID-19 являются ОРДС, сепсис и септический шок, сердечно-легочная недостаточность, а также острое повреждение тканей жизненно важных органов (миокарда, печени, почек и т.д.) [Zhou F. et al., 2020; Yang X. et al., 2020]. Острые COVID-19-ассоциированные мультиорганные поражения характеризуются повышением уровней биохимических маркеров (лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, тропонина I, аланин- и аспартат-аминотрансферазы) в сыворотке крови пациентов с COVID-19

[Shoar S. et al., 2020; Wu Z.H. et al., 2020]. Возможными механизмами мультиорганных поражений являются внелегочная диссеминация и прямое воздействие коронавируса SARS-CoV-2 на ткани жизненно важных органов [Puelles V.G. et al., 2020; Wong D.W.L. et al., 2021]. Доказательством этому служит следующее: выявление РНК SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) в ткани сердца, печени, селезенки, лимфатических узлов, головного мозга и других органов [Remmelink M. et al., 2020; Sekulic M. et al., 2020]; детекция белков SARS-CoV-2 иммуногистохимическим (ИГХ) методом в легких, печени, почках, сердце, головном мозге и лимфатических узлах [Martines R.B. et al., 2020; Schurink B. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020]; электронно-микроскопическая (ЭМ) визуализация SARS-CoV-2 в цитоплазме альвеолоцитов, альвеолярных макрофагов и эндотелиальных клеток сосудов легких [Grimes Z. et al., 2020], кардиомиоцитах и интерстициальных клетках сердца [Dolhnikoff M. et al., 2020; Tavazzi G. et al., 2020], эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек [Farkash E.A. et al., 2020] и гистиоцитах печени [Wang Y. et al., 2020].

Также необходимо отметить большой вклад гиперкоагуляции и сосудистых поражений в патогенез тяжелого течения и летального исхода COVID-19 [Helms J. et al., 2020]. Частота тромботических осложнений у пациентов с COVID-19, поступающих в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), составляет 16–69% [Helms J. et al., 2020; Klok F.A. et al., 2020; Llitjos J.F. et al., 2020].

Другим частым осложнением COVID-19 является лимфопения. Согласно данным литературы, лимфопения ($<1,0 \times 10^9/\text{л}$) выявляется у 35–75% пациентов с COVID-19 [Huang C. et al., 2020; Lippi G. et al., 2020], а уровень лимфоцитов в крови ниже $0,6 \times 10^9/\text{л}$ является прогностическим маркером необходимости перевода пациентов в ОРИТ [Fan B.E. et al., 2020]. Патогенез COVID-19-ассоциированной лимфопении полиэтиологичен и состоит из более 10 предполагаемых механизмов [Jafarzadeh A. et al., 2021], важнейшими из которых являются внелегочная диссеминация и прямое действие SARS-CoV-2 на ткани вторичных лимфоидных органов, таких как трахеобронхиальные лимфатические узлы, осуществляющие фильтрацию лимфы из легких, и селезенка [Xiang Q. et al., 2021].

Таким образом, основными факторами риска смерти пациентов с COVID-19 являются пожилой возраст, мужской пол и наличие хронических сопутствующих патологий, таких как АГ, СД II типа, ИБС, ЦВБ, опухоли, ХОБЛ, болезни печени, почек и др. Наиболее частыми смертельными осложнениями COVID-19 являются ОРДС, сепсис и септический шок, сердечно-легочная недостаточность, а также острые мультиорганные поражения. Фатальными гематологическими осложнениями COVID-19 считаются гиперкоагуляция и тромботические нарушения гемодинамики, а также лимфопения. Возможными механизмами мультиорганных поражений и гематологических осложнений COVID-19 являются внелегочная диссеминация и прямое воздействие SARS-CoV-2 на ткани жизненно важных органов.

Тем не менее, генетическая эволюция коронавируса SARS-CoV-2 продолжается. Появляются новые штаммы с иными биологическими свойствами, а COVID-19 становится мультисистемной патологией, характеризующейся фатальными поражениями не только легких, но и других жизненно важных органов.

На наш взгляд, только комплекс, состоящий из патологоанатомического, молекулярно-генетического, иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследований, позволит раскрыть патогенетические механизмы SARS-CoV-2-ассоциированных поражений ткани легких и других жизненно важных органов, являющихся причиной смерти пациентов с COVID-19.

1.2. Строение генома, филогенез и классификация SARS-CoV-2

3 февраля 2020 года в базе данных эталонных последовательностей Национального центра биотехнологической информации США (RefSeq: NCBI Reference Sequence Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) Wu F. et al. была опубликована первая полная нуклеотидная последовательность генома Уханьского изолята SARS-CoV-2, состоящая из 29903 нуклеотидов (NC_045512.2) [Wu F. et al., 2020]. Подобно другим коронавирусам, геном SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечную РНК с положительным смыслом [(+) оцРНК] с 5'-кэпом, 3'-UTR

поли-А хвостом. Геном SARS-CoV-2 содержит 14 открытых рамок считывания (ORF, *open reading frame*), кодирующих неструктурные белки (NSP, *non-structural proteins*) для процессов репликации и сборки вируса, и структурные белки, которые включают шиповатый (S, *spike*), оболочечный (E, *envelope*), мембранный/матричный (M, *membrane*) и нуклеокапсидный (N, *nucleoprotein*) [Naqvi A.A.T. et al., 2020; Arya R. et al., 2021]. Белок N прикрепляется к вирусному геному и участвует в репликации РНК, формировании вирионов и уклонении от иммунитета [Mu J. et al., 2020]. Белок М - один из наиболее распространенных и хорошо законсервированных белков в структуре вириона. Этот белок способствует сборке и почкованию вирусных частиц посредством взаимодействия с N и дополнительными белками 3а и 7а [Astuti I. et al., 2020]. Белок E — это наименьший компонент в структуре SARS-CoV-2, который способствует производству, созреванию и высвобождению вирионов [Naqvi A.A.T. et al., 2020].

Белок S представляет собой трансмембранный белок, состоящий из следующих функциональных элементов: субъединицы связывания (S1) и слияния (S2) с клеточной мембраной, а также наиболее сложного компонента — рецептор-связывающего домена (RBD, *receptor binding domain*), которые посредством взаимодействия с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) обеспечивают проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени [Lu R. et al., 2020; Kang S. et al., 2020]. Рецепторы АПФ2 экспрессируются клетками различных органов человека, прежде всего тканями легких, почек, желудочно-кишечного тракта, сердца, печени и кровеносных сосудов [Devaux C.A. et al., 2020].

Филогенетический анализ показал, что SARS-CoV-2 принадлежит к семейству Coronaviridae, роду Betacoronavirus, подроду Sarbecovirus (рисунок 1) [Chan J.F. et al., 2020].

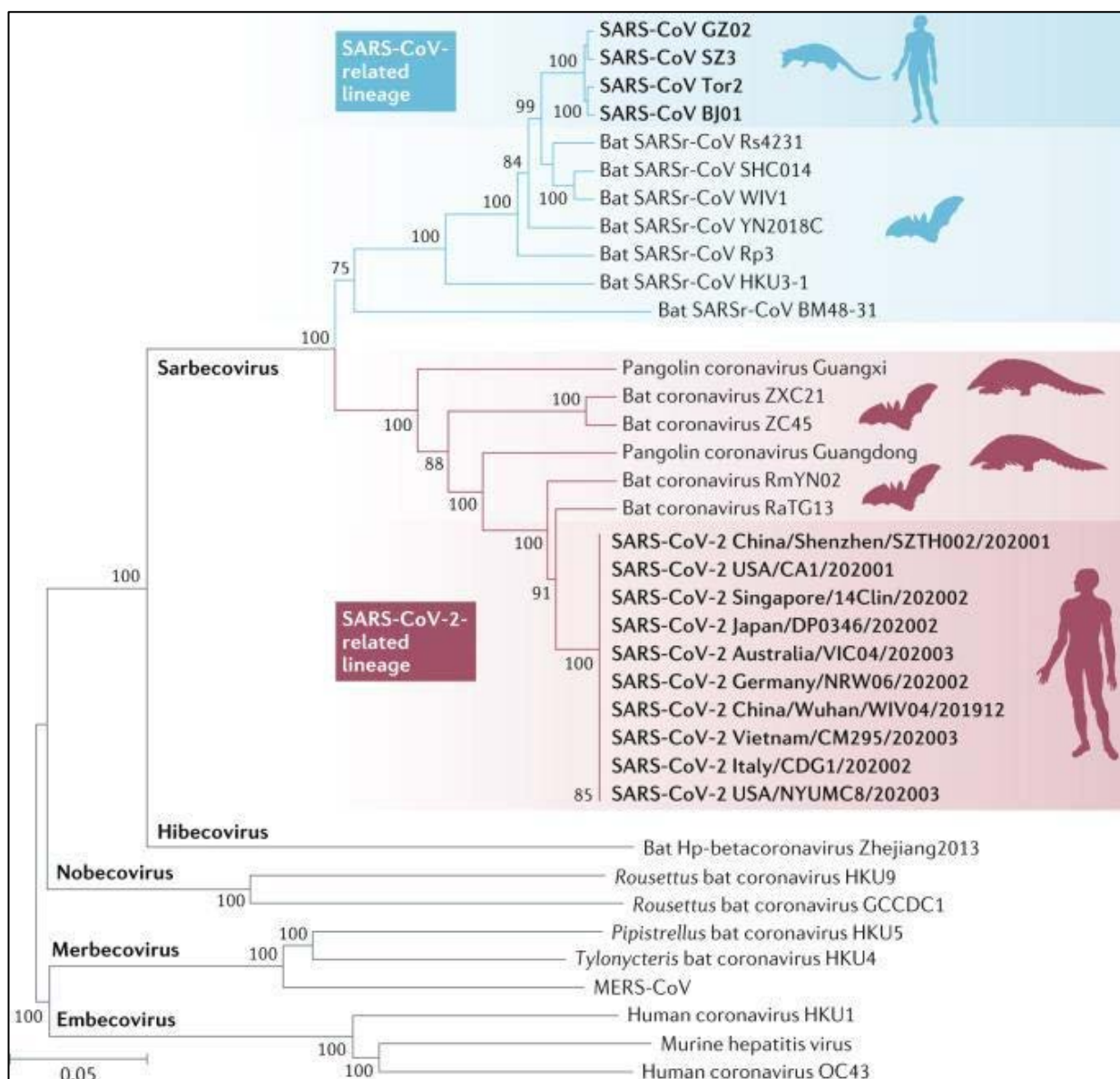


Рисунок 1. Филогенетическое дерево полноразмерных последовательностей генома SARS-CoV-2, SARS-CoV и других бета-коронавирусов.

Представленное на рисунке 1 филогенетическое дерево на основе секвенирования геномов коронавирусов указывает на самую близкую связь SARS-CoV-2 со штаммом SARS-подобного коронавируса летучих мышей - BatCov RaTG13, с 96%-ой идентичностью нуклеотидных последовательностей. Это послужило поводом для предположений о происхождении SARS-CoV-2 естественным образом от коронавируса летучих мышей RaTG13 [Zhang C. et al., 2020].

Созданная в 2006 году база данных «Глобальной инициативы по обмену данными о птичьей гриппе» (GISAID, *A global initiative on sharing avian flu data*),

стала также репозиторием коронавируса. В настоящее время в базе данных GISAID (<https://www.gisaid.org/>) депонировано более 8 млн последовательностей генома коронавируса, выделенных от пациентов с COVID-19. Хотя SARS-CoV-2 представляет собой РНК-вирус, депонированные последовательности по соглашению имеют формат ДНК. Увеличение числа геномов новых изолятов SARS-CoV-2 в базе данных GISAID дает возможность для более точного анализа филогении и эволюции SARS-CoV-2 [Paraskevis D. et al., 2020]. Тем не менее, происхождение SARS-CoV-2 и его эволюционная связь с другими коронавирусами до сих пор не до конца изучены [Li T. et al., 2020].

Для визуализации эволюции и геномной эпидемиологии SARS-CoV-2 в режиме реального времени была создана платформа Nextstrain (<https://nextstrain.org/>), представляющая собой набор биоинформатических инструментов с открытым доступом (рисунок 2).

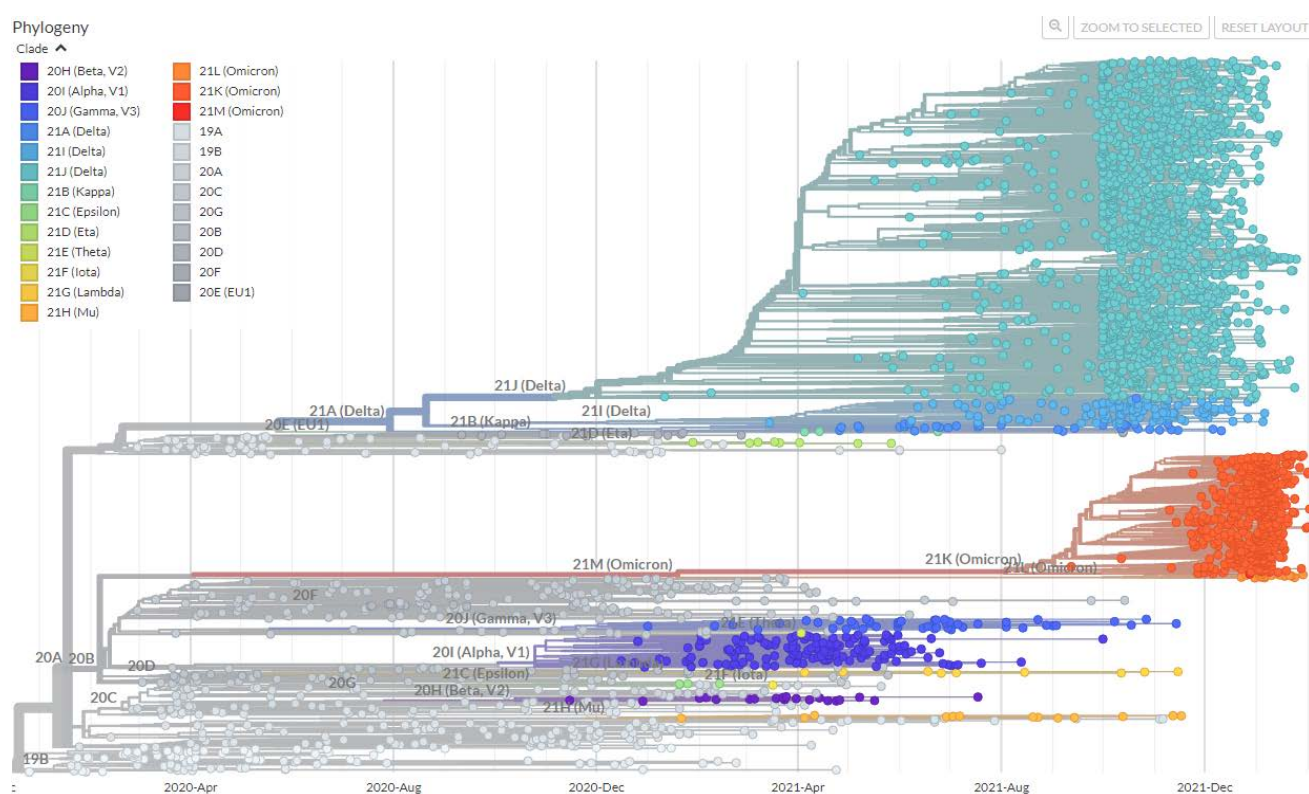


Рисунок 2. Эволюция и геномная эпидемиология нового коронавируса SARS-CoV-2 (Источник: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global>).

Однако, многие из представленных здесь изолятов к 25.11.2021 году прекратили свое существование, наглядной демонстрацией которого является рисунок 3.

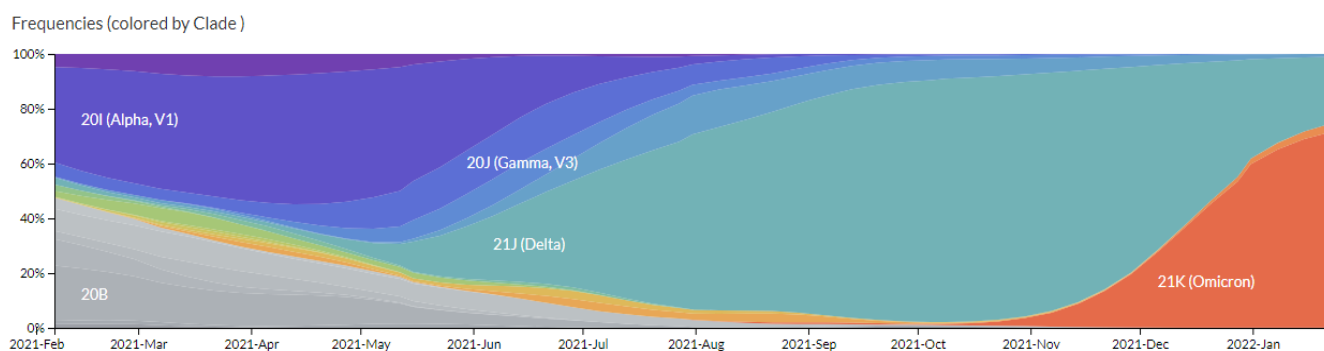


Рисунок 3. Частота встречаемости различных изолятов нового коронавируса SARS-CoV-2 в период с февраля 2021 г. по январь 2022 г. (Источник: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global>).

Как представлено на рисунке 3, если в начале 2021 года в мире в основном доминировали 2 изолята (20А и 20В), то к концу года они практически исчезли и доминирующими стали изоляты, берущие свое начало от 21К (Omicron).

Неуклонный рост числа вариантов генома коронавируса с новыми нуклеотидными последовательностями, депонируемых в базе данных GISAID, свидетельствует о высокой мутационной активности в геноме SARS-CoV-2, в особенности в его участке, кодирующем S-белок. Мутации в гене *Spike* влияют на биологические характеристики коронавируса SARS-CoV-2, включая трансмиссивность и антигенность, делая его более вирулентным и устойчивым к вируснейтрализующему эффекту различных антител [Weisblum Y. et al., 2020; Chen J. et al., 2020; Greaney A.J. et al., 2020]. Молекулярно-генетическое выявление мутаций в гене *Spike* позволит не только отслеживать эпидемиологию различных штаммов SARS-CoV-2, но и своевременно выявит наиболее вирулентные и устойчивые к воздействию постковидных и поствакционных антител изоляты коронавируса в тканях различных органов пациентов, умерших от COVID-19.

Золотым стандартом идентификации различных штаммов коронавируса SARS-CoV-2 является дорогостоящее полногеномное секвенирование с помощью секвенаторов следующего поколения (NGS, *next-generation sequencing*) [Mahmood

T.B. et al., 2021]. Учитывая, что все варианты штаммов, вызывающие озабоченность (VOC, *variants of concern*) имеют штамм-специфические мутации в гене Spike, то идентификация различных штаммов путем прямого секвенирования по Сэнгеру может значительно облегчить задачу по выявлению типа штамма SARS-CoV-2.

Определение штаммовой принадлежности SARS-CoV-2 может быть осуществлено путем сверки данных секвенирования по Сэнгеру с эталонной последовательностью генома SARS-CoV-2 на платформе Nextclade v1.13.1 (<https://clades.nextstrain.org/>) [Colson P. et al., 2021].

Таким образом, геном Уханьского варианта нового коронавируса SARS-CoV-2, принятый в качестве референсного, состоит из 29903 нуклеотидов РНК. Однако, с момента появления геном SARS-CoV-2 подвергся сильным эволюционным изменениям и сегодня имеет более 8 млн. зарегистрированных разновидностей, представленных в базе данных GISAID. Мутации в генах, кодирующих первичную структуру белков SARS-CoV-2, особенно S-белка, привели к сильному изменению его структуры и функциональной активности и, соответственно, биологии коронавируса, делая его более вирулентным. Эволюционные изменения в белках SARS-CoV-2 привели к появлению новых штаммов с более высокой скоростью передачи и явились причиной новых волн пандемии, в дальнейшем ставших причиной изменения эпидемиологического ландшафта COVID-19 в различных странах.

1.3. Патологические изменения в легких при COVID-19

По данным литературы, посвященной результатам аутопсийных исследований тел пациентов, умерших от COVID-19, наиболее частыми макроскопическими изменениями, найденными в легких, было увеличение массы органа, синюшно-красный цвет паренхимы, тотальное или очаговые уплотнения легочной ткани, а также застой и отек в легких [Menter T. et al., 2020; Edler C. et al., 2020; Worczuk A.C. et al., 2020; ДЗМ, 2020]. У части пациентов описывалась выраженная эмфизема [Martines R.B. et al., 2020; Schaller T. et al., 2020].

Патологические изменения плевры чаще всего были представлены фиброзными спайками [Menter T. et al., 2020], реже отмечались небольшое количество серозного выпота в плевральной полости [Barton L.M. et al., 2020] и слабовыраженные воспалительные изменения [Wichmann D. et al., 2020], и только в одном наблюдении была обнаружена эмпиема плевры [Vuja L.M. et al., 2020]. Патологические изменения в паренхиме легких у части пациентов ассоциировались с выраженным тромбозом и тромбоземболиями кровеносных сосудов легких. Тромбоземболии ветвей легочных артерий во многих наблюдениях сочеталась с тромбозами глубоких вен нижних конечностей [Wichmann D. et al., 2020; Lax S.F. et al., 2020; Ackermann M. et al., 2020].

Наиболее частыми гистопатологическими изменениями при посмертном исследовании легких были появление гиалиновых мембран, выстилающих контуры альвеол, пролиферация альвеолоцитов II типа, интерстициальный отек и мононуклеарная, преимущественно лимфоцитарная, инфильтрация межальвеолярных перегородок [Menter T. et al., 2020; Edler C. et al., 2020; Borczuk A.C. et al., 2020; ДЗМ, 2020]. Также, было выявлено наличие атипичных синцитиальных клеток, происходивших из альвеолоцитов II типа, что подтверждалось экспрессией ими маркера TTF1, выявленной методом ИГХ [Menter T. et al., 2020; Adachi T. et al., 2020].

По утверждению ряда авторов, наблюдается высокая частота микротромбозов и тромбоземболий ветвей легочной артерии и вен, нередко сочетающихся с очаговыми внутриальвеолярными кровоизлияниями и инфарктами легочной паренхимы [Wichmann D. et al., 2020; Lax S.F. et al., 2020; Martines R.B. et al., 2020; Nunes Duarte-Neto A. et al., 2020]. В очагах кровоизлияний обнаруживаются сидерофаги и наблюдается явление аутоцитотфагии [Craver R. et al., 2020; Adachi T. et al., 2020]. Феномен аутоцитотфагии, по мнению российских исследователей, более характерен для SARS-CoV-2- инфекции и не выявляется при других коронавирусных инфекциях [ДЗМ, 2020].

Специфическая группировка и выраженность вышеперечисленных гистопатологических изменений в легких определяет фазы диффузного

альвеолярного повреждения (ДАП), которое является морфологическим субстратом ОРДС. ДАП, как правило, состоит из двух последовательных фаз - экссудативной (первые 7-10 суток) и пролиферативной (после 7-10 суток), каждая из которых имеет характерную гистопатологическую картину (рисунок 4). Различные фазы ДАП в ткани легких пациентов, умерших от COVID-19, выявляются в 80-87,5% случаев [Martines R.V. et al., 2020; Sadegh Beigee F. et al., 2020].

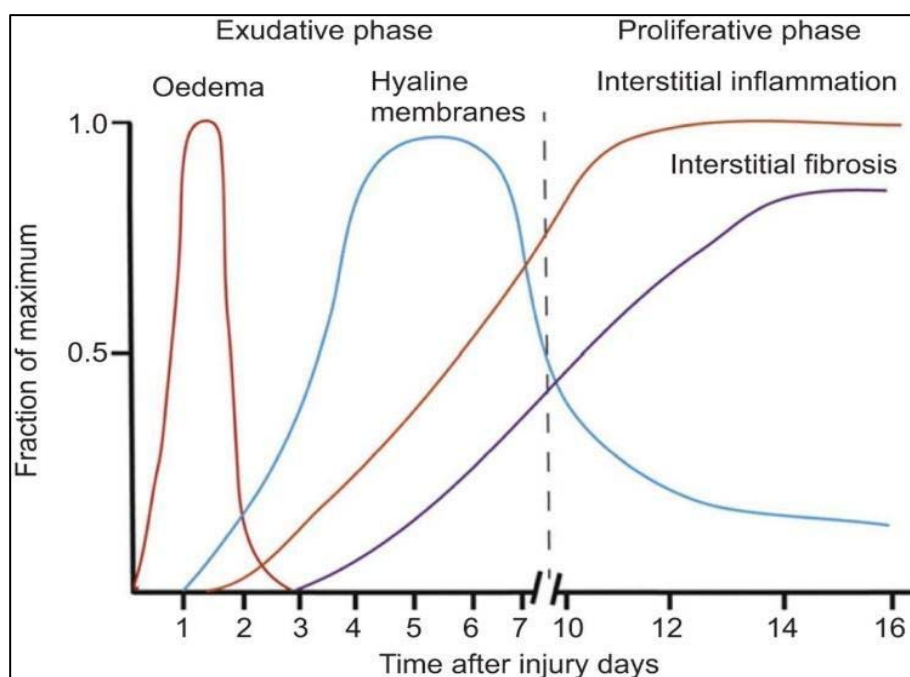


Рисунок 4. Схематическое изображение динамики ДАП по Katzenstein A.A. et al., 1990. Во время ранней (или экссудативной) фазы поражение характеризуется отеком легких с высокой проницаемостью, за которым следует образование гиалиновых мембран. Через семь-десять дней может развиваться пролиферативная фаза с выраженным интерстициальным воспалением, фиброзом и нарушением заживления.

По данным многочисленных исследований, в первые 7-10 дней от момента инфицирования в легких доминируют гистопатологические признаки экссудативной фазы ДАП, такие как десквамация альвеолярного эпителия, интерстициальный и внутриальвеолярный отек, образование гиалиновых мембран за счет полимеризации фибрина, содержащегося в составе внутриальвеолярного экссудата, инфильтрация альвеолярных и интерстициальных воспалительных

клеток (макрофагов, нейтрофильных моноцитов и лимфоцитов). Кроме того, отмечаются очаги внутриальвеолярных кровоизлияний, гиперплазия альвеолоцитов с единичными многоядерными клетками и вирусные цитопатические изменения альвеолоцитов, характеризующиеся крупными ядрами, выступающими ядрышками и амфотильной гранулярной цитоплазмой [Barton L.M. et al., 2020; Wichmann D. et al., 2020; Xu Z. et al., 2020; Конопка К.Е. et al., 2020; Fox S.E. et al., 2020].

Гистопатологические изменения в легких на 7-10 сутки дебюта инфекции соответствуют преимущественно пролиферативной фазе ДАП и характеризуются такими явлениями, как продолжающийся репаративный процесс с гиперплазией альвеолоцитов и пролиферацией фибробластов, утолщение межальвеолярных перегородок, организация внутриальвеолярных фибриновых масс, рыхлый интерстициальный фиброз и плоскоклеточная метаплазия альвеолярного эпителия [Barton L.M. et al., 2020; Wichmann D. et al., 2020; Fox S.E. et al., 2020; Zhang H. et al., 2020]. Процессы организации и интерстициальный фиброз у выживших пациентов могут быть морфологическими подтверждениями исхода ДАП при COVID-19 [Schwensen H.F. et al., 2020].

Тем не менее, согласно результатам исследований, проведенных Забозлаевым и соавт. [Zabozlaev F.G. et al., 2020], ОРДС при COVID-19 отличается от классической схемы развития ДАП, а имеет 3 стадии, которые сопровождают развитие соответствующих клинико-морфологических фаз COVID-19-интерстициальной пневмонии: экссудативная стадия с развитием фульминантной фазы COVID-19-интерстициальной пневмонии, пролиферативная стадия с развитием персистирующей фазы COVID-19-интерстициальной пневмонии, и фибротическая стадия с развитием фибротической фазы COVID-19-интерстициальной пневмонии. Каждая стадия соответствует определенному времени развития заболевания и представлена характерными макро- и микроскопическими признаками.

Более того, стоит отметить, что в некоторых случаях в легочной ткани одного и того же пациента с COVID-19 обнаруживаются гистопатологические признаки

обеих фаз ДАП. Наличие гистопатологических изменений, не соответствующих хронологической последовательности ДАП, может объясняться персистирующим течением COVID-19, особенно у пожилых пациентов с ослабленным иммунитетом [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; Zabozaev 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 атипическом течении ОРДС при новой коронавирусной инфекции (COVID-19) [Zabozaev F.G. et al., 2020].

Помимо ДАП, у пациентов, умерших от COVID-19, в особенности у тех, кто получал механическую вентиляцию легких, выявляются гистопатологические признаки бронхопневмонии [Menter T. et al., 2020; Barton L.M. et al., 2020; Wichmann D. et al., 2020; Martines R.B. et al., 2020]. По данным российского исследования, гистологически бронхопневмония обнаруживается в 37% случаев летального исхода COVID-19 [ДЗМ, 2020].

Таким образом, проведенный анализ литературных данных показал, что патологические изменения в легких пациентов, умерших от COVID-19, имеет ряд наиболее часто выявляемых макроскопических признаков, таких как увеличение массы легких, изменение цвета паренхимы легких в темно-красный, очаговое или тотальное уплотнение ткани легких, признаки застойных явлений и эмфизематозных изменений. Наиболее частые гистопатологические изменения в легких характеризовались появлением гиалиновых мембран, выстилающих контуры альвеол, пролиферацией альвеолоцитов II типа, интерстициальным и внутриальвеолярным отеком, мононуклеарной с преимущественно лимфоцитарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок.

Несмотря на многочисленные литературные данные о макро- и микроскопических изменениях в легочной ткани, остаются открытыми вопросы, касающиеся этиологической роли нового коронавируса SARS-CoV-2 в инициировании вышеописанных изменений.

1.4. Молекулярно-генетическое исследование COVID-19

Согласно рекомендациям ВОЗ и Временным рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции Минздрава РФ молекулярно-генетическая диагностика COVID-19 основана на выявлении (есть или нет) РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) с реакцией обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) [WHO, 2020; Минздрав РФ, 2020]. Это стало возможным благодаря полногеномному секвенированию РНК нового коронавируса SARS-CoV-2, нуклеотидная последовательность которой была загружена китайскими учеными в базу данных GISAID 5 января 2020 года [Wu F. et al., 2020], а также первой опубликованной работе по ПЦР-тестированию COVID-19 [Li Q. et al., 2020].

В настоящее время метод ОТ ПЦР РВ стал золотым стандартом лабораторной диагностики COVID-19 по всему миру [Figueroa S. et al., 2021]. Выявление РНК SARS-CoV-2 методом ОТ ПЦР РВ схематически представлено ниже на рисунке 5.



Рисунок 5. Схема диагностики COVID-19 методом ОТ ПЦР РВ, состоящая из следующих этапов: взятие мазка из носо- и ротоглотки пациента, экстракция РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) путем реакции обратной транскрипции, амплификация участка генома коронавируса SARS-CoV-2 полимеразной цепной реакцией и последующая детекция его в режиме реального времени. Результат ОТ

ПЦР РВ интерпретируется как положительный (+), или отрицательный (-) — есть или нет РНК SARS-CoV-2, соответственно.

К настоящему времени опубликовано множество данных с результатами молекулярно-генетической детекции РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19 методом ОТ ПЦР РВ. Так, РНК SARS-CoV-2 выявляется в образцах нативной ткани сердца [Lindner D. et al., 2020], печени [Lagana S.M. et al., 2020], селезенки и лимфатических узлов [Remmelink M. et al., 2020], головного мозга [Matschke J. et al., 2020] и других органов [Casagrande M. et al., 2020]. Также известны исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 в образцах тканей различных органов, фиксированных в формалине и заключенных в парафин [Puelles V.G. et al., 2020, Adachi T. et al., 2020].

Тем не менее, появляются публикации о клинико-прогностическом значении не только качественного определения РНК SARS-CoV-2, но и количественной оценки вирусной нагрузки (ВН) в различных биологических образцах пациентов с COVID-19 [Yu F. et al., 2020]. В частности, значения уровня ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки в начале болезни могут быть ассоциированы с тяжестью клинического течения и риском летального исхода COVID-19 [Yu X. et al., 2020; Pujadas E. et al., 2020; Trunfio M. et al., 2021]. Согласно одним исследованиям, частота внутрибольничной летальности у пациентов с высокой ВН SARS-CoV-2, характеризующейся значением порогового цикла кривых ПЦР РВ (*Ct*, *cycle threshold*) - <25 , средней ВН - $Ct=25-30$, и низкой ВН - $Ct>30$; в мазках из носоглотки на момент поступления в стационар составляет 35, 17,6 и 6,2%, соответственно [Magleby R. et al., 2020]. Однако по данным другого исследования, уровень ВН SARS-CoV-2 в мазках из верхних дыхательных путей имеет слабую корреляцию с тяжестью течения и исходом COVID-19, за исключением симптомов одышки и аносмии, которые ассоциированы с более низкой ВН SARS-CoV-2 [Biguenet A. et al., 2021]. Также не было отмечено какой-либо корреляции между значениями *Ct* ПЦР РВ в начале болезни и риском тяжелого течения COVID-19 с необходимостью проведения оксигенотерапии [Abdulrahman A. et al., 2021]. Machado et al. сообщают, что несмотря на то, что уровень ВН SARS-CoV-2 в мазках

из носоглотки, выражающийся в Ct ПЦР РВ не связан с клиническими критериями тяжести заболевания и необходимостью искусственной вентиляции легких, он ассоциирован с показателями 30-дневной смертности пациентов с COVID-19 в стационаре [Machado A. et al., 2021].

Как видно, клинико-прогностическое значения уровня ВН SARS-CoV-2 преимущественно оценивались в мазках из носоглотки, в слюне и мокроте пациентов с COVID-19. Однако если учитывать, что среди умерших от COVID-19 преобладают пожилые пациенты со слабой аэрацией легких и нарушением мукоцилиарного клиренса в силу возрастных изменений, то уровень ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки, слюне и мокроте вряд ли будет корректно отражать тяжесть и масштаб поражений в очаге инфекции - легочной ткани. Более того, в большинстве перечисленных работ оценка уровня ВН SARS-CoV-2 проводилась относительно значения Ct ПЦР РВ [Bradley B.T. et al., 2020], и только в единичных работах исходное количество анализируемого материала нормировали относительно контрольных генов человека, таких как β -глобин [Puelles V.G. et al., 2020], *GUSB* [Tian S. et al., 2020] и *GAPDH* [Adachi T. et al., 2020].

Ни в одной из указанных работ определение уровня ВН SARS-CoV-2 не проводилось путем оценки количества истинных копий РНК коронавируса и человеческого контрольного гена относительно кривых серийного разведения плазмид, содержащих участки вирусного генома и контрольного гена человека. К значениям уровня ВН SARS-CoV-2, выражающимся в числе порогового цикла 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]. Поэтому значения Ct ПЦР РВ не могут быть напрямую интерпретированы как ВН SARS-CoV-2 [Aquino-Jarquín G., 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].

По данным анализа базы данных Федерального института промышленной собственности (ФИПС), в 2020 году в РФ было выдано несколько патентов на изобретение набора реагентов, способов и тест-систем для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 (<https://www.fips.ru/doc-virus/doc-1-2.php>). Среди них имеются следующие патенты: №2731390 от 02.09.2020 г. "Тест-система и способ для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вируса-возбудителя коронавирусного заболевания 2019 COVID-19, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Варианты)"; №2733665 от 06.10.2020 г. «Набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК коронавирусов человека SARS и 2019-nCoV методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени»; №2734300 от 14.10.2020 г. «Набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК коронавируса человека 2019-nCoV методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени».

Однако вышеперечисленные запатентованные в РФ способы и тест-системы имеют свои ограничения в техническом использовании, заключающиеся в аналитических характеристиках предлагаемых способов, т.е. все они являются только "качественными" и не позволяют оценить ВН SARS-CoV-2 в исследуемых образцах. Кроме того, совмещение реакции ОТ с ПЦР в одной пробирке способствует накоплению димеров используемых праймеров и снижению эффективности прохождения ПЦР [Vandesompele J. et al., 2002; Bustin S.A., 2002; Wong M.L. et al., 2005]. Более того, предложенные праймеры на матричную РНК (мРНК) генов GAPDH и АСТВ выбраны не совсем удачно, так как они перекрывают и последовательности ДНК, которая всегда присутствует в качестве примеси в растворах РНК.

Также имеется запатентованный в КНР (№ CN111057797 от 24.04.2020 года) способ детекции и количественной оценки РНК коронавируса 2019-nCoV в смывах альвеолярной жидкости, в мазках из носоглотки, в крови, сыворотке, фекалиях и тканях пациентов с COVID-19

(https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=CN&NR=111057797A&KC=A&date=20200424&FT=D&locale=en_EP). Недостатком данного способа можно считать использованные в качестве внутреннего контроля и количественной оценки ВН SARS-CoV-2 относительно копии мРНК гена человеческой рибонуклеазы RPP30, экспрессия которой в тканях различных органов варьирует от полного отсутствия до высоких значений (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000148688-RPP30/tissue>).

Таким образом, основной преградой для широкого применения метода ПЦР РВ для выявления РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов является не только техническая сложность соблюдения требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» при работе с SARS-CoV-2-инфицированными тканями различных органов, но и отсутствие адекватных способов количественной оценки ВН SARS-CoV-2 в различных тканях.

На наш взгляд, только разработка новых высокочувствительных и специфичных способов количественного измерения ВН SARS-CoV-2 в тканях пораженных органов может позволить оценить возможную патогенетическую связь уровня ВН с характером гистопатологических изменений в первичном очаге поражения - в легких и других жизненно важных органах пациентов с COVID-19.

1.5. Иммуногистохимическое исследование SARS-CoV-2 в тканях различных органов при COVID-19

Иммуногистохимическая (ИГХ) детекция коронавируса SARS-CoV-2 в клетках и тканях различных органов является эффективным методом для установления этиологической роли в патогенезе гистопатологических изменений легких и других органах пациентов с COVID-19 [von Stillfried S. et al., 2021]. ИГХ-исследование, основанное на выявлении антигенов возбудителей является проверенным методом диагностики многих вирусных инфекционных заболеваний, включая SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 инфекции [Hsiao C.H. et al., 2005; Ng D.L. et al., 2014; von Stillfried S. et al., 2021]. Преимуществом ИГХ-исследования SARS-CoV-2 над молекулярно-генетическими методами детекции является

возможность определения не только присутствия коронавируса, но и его клеточной и тканевой локализации в структуре гистоморфологических изменений тканей легких и других жизненно важных органов пациентов с COVID-19 [von Stillfried S. et al., 2021].

К настоящему времени опубликовано большое число работ с результатами ИГХ-детекции SARS-CoV-2 в ткани легких, прикорневых лимфатических узлов и респираторного тракта с применением коммерческих и экспериментальных первичных антител против NC- и S-белка коронавируса (таблица 1).

Таблица 1. Клеточный тропизм коронавируса SARS-CoV-2 в ткани легких, дыхательных путей и трахеобронхиальных лимфатических узлов по данным ИГХ-исследований с использованием анти-SARS-CoV-2 антител.

ИСТОЧНИКИ ЛИТЕРАТУРЫ	ТРОПНОСТЬ SARS-CoV-2																					
	Schaefer I.M. et al., 2020	Sauter J.L. et al., 2020	Martines R.B. et al., 2020	Massoth L.R. et al., 2021	Adachi T. et al., 2020	Barisione E. et al., 2021	Szabolcs M. et al., 2021	Schurink B. et al., 2020	Bradley B.T. et al., 2020	Wang C. et al., 2020	Hirschbuhl K. et al., 2021	Felix J.C. et al., 2021	Roden A.C. et al., 2021	Borczuk A.C. et al., 2020	Zhang H. et al., 2020	Bussani R. et al., 2020	Magro C. et al., 2020	Skok K. et al., 2021	Ray A. et al., 2021	Best Rocha A. et al., 2020	Haslbauer J.D. et al., 2021	
Легкие																						
Альвеолоциты	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Альвеолярные макрофаги	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гиалиновые мембраны	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Эндотелиоциты сосудов легких		+						+							+	+	+					
Внутриальвеолярные клетки	+											+	+		+							
Синцитиальные клетки					+											+						
Трахея и бронхи																						
Эпителиальные клетки слизистой оболочки	+	+	+	+		+		+	+				+	+			+	+				
Клетки подслизистых желез	+	+							+								+					
Трахеобронхиальные лимфатические узлы																						
Синусовые гистиоциты			+							+												+

Как видно из таблицы 1, иммунореактивность к анти-SARS-CoV-2 антителам в ткани легких выявлена в цитоплазме альвеолоцитов и альвеолярных макрофагов, в гиалиновых мембранах, эндотелиальных клетках сосудов легких, во внутриальвеолярном клеточном детрите и в цитоплазме синцитиальных клеток. В трахее и бронхах положительная реакция была характерна для эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей, а также для клеток подслизистых

желез. В трахеобронхиальных лимфатических узлах положительное окрашивание выявляется в цитоплазме синусовых гистиоцитов.

Помимо органов дыхания, антигены SARS-CoV-2 выявляются в клетках канальцевого эпителия почек [Su H. et al., 2020; Diao B. et al., 2021], кардиомиоцитах сердца [Gauchotte G. et al., 2021], эндотелиальных клетках кожи [Colmenero I. et al., 2020], макрофагах костного мозга и селезенки, клетках слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [Schurink B. et al., 2020], в гистиоцитах портальных трактов и холангиоцитах печени [Zhao C.L. et al., 2020], бета-клетках поджелудочной железы [Steenblock C. et al., 2021], в клетках головного мозга [Matschke J. et al., 2020] и плаценты [Hsu A.L. et al., 2021].

Согласно литературным данным, наиболее часто используемыми первичными антителами являются МкАТ против S-белка SARS-CoV/SARS-CoV-2 (клон 1A9, кат. №GTX632604) компании «GeneTex» (США) [Sauter J.L. et al., 2020; Szabolcs M. et al., 2021; Bradley B.T. et al., 2020; Roden A.C., 2021; Borczuk A.C. et al., 2020; Bussani R. et al., 2020; Colmenero I. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020] и поликлональные антитела (ПкАТ) против NC-белка SARS-CoV/SARS-CoV-2 (кат. №NB100-56576) компании «Novus Biologicals» (США) [Schaefer I.M. et al., 2020; Martines R.B. et al., 2020; Massoth L.R. et al., 2021; Gauchotte G. et al., 2021]. Также в некоторых работах использовались МкАТ против NC-белка SARS-CoV (кат. №40143-R001) [Barisione E. et al., 2021; Hsu A.L. et al., 2021] и SARS-CoV-2 (клон 019) [Diao B. et al., 2021] производства компании «SinoBiological» (КНР). Реже применялись МкАТ против NC-белка SARS-CoV (кат. №MA1-7404) производства «Thermo Fisher» (США) [Ray A. et al., 2021].

Тем не менее, использованные в вышеперечисленных работах первичные антитела против SARS-CoV-2 имели различную специфичность и чувствительность. Например, согласно Szabolcs и соавт., апробировавшим семь различных коммерческих антител на культуре инфицированных SARS-CoV-2 клеток и тканей пациентов с COVID-19, 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]. Специфичность связывания и

пригодность для ИГХ-исследований клона 1A9 были подтверждены также в работах Carrossino и соавт. [Carrossino M. et al., 2020]. Более того, согласно Roden и соавторам, клон 1A9 обладает 100% чувствительностью и дает наиболее чистую реакцию без фонового шума [Roden A.C. et al., 2021].

Таким образом, результаты ИГХ-исследований с применением мкАТ против белков SARS-CoV-2 не всегда является убедительной, из-за возможной не специфической иммунореактивностью антител, особенно в условиях деструктивных изменений аутопсийной ткани. Исходя из обзора литературы, мы считаем, что результаты ИГХ исследований с применением мкАТ против белков SARS-CoV-2 нуждается в подтверждение с электронно-микроскопической визуализации вирионов SARS-CoV-2 в исследованных образцах тканей.

1.6. Электронно-микроскопическое исследование тканей различных органов при COVID-19

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) широко используется при изучении морфологии различных вирусов и инициированных ими ультраструктурных нарушений тканей различных органов [Roingeard P. et al., 2019; Curry A. et al., 2006]. Более того, классификация вирусов зачастую строится именно на основе изучения ультраструктурной морфологии вирусов при помощи ТЭМ [Almeida J.D. et al., 1963]. Также ТЭМ как метод исследования показала свою эффективность во время эпидемий SARS-CoV и MERS-CoV инфекций [Goldsmith C.S. et al., 2004; Park W.B. et al., 2015].

Коронавирусы впервые были визуализированы с помощью ТЭМ June D. Almeida J.D. et al. в 1967 году [Almeida J.D. et al., 1967], а название свое получили благодаря S-белкам, имеющимся на поверхности вируса, которые в электронных микрофотографиях напоминают солнечную корону [Bullock H.A. et al., 2021].

Многочисленные ТЭМ-исследования, проведенные на культурах клеток инфицированных SARS-CoV-2, позволили описать морфологию нового коронавируса. Согласно этим исследованиям, SARS-CoV-2 представляет собой частицу со сферической формой диаметром 60-140 нм. Наружная поверхность

вирусной оболочки покрыта «шипами» длиной до 23 нм, представляющими собой S-белок, необходимый для взаимодействия с рецептором АПФ2. Внутри коронавирусной частицы в виде множественных мелкогранулярных структур диаметром 12 нм определяется электронно-плотный NC белок [Barreto-Vieira D.F. et al., 2021; Hopfer H. et al., 2021; Laue M. et al., 2021].

В настоящее время опубликовано большое число работ, посвященных электронно-микроскопической визуализации частиц коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких [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], почек [Farkash E.A. et al., 2020; Su H. et al., 2020; Kissling S. et al., 2020], сердца [Tavazzi G. et al., 2020], печени [Zhao C.L. et al., 2020], кожи [Colmenero I. et al., 2020], кишечника [Bradley B.T. et al., 2020], плаценты [Schoenmakers S. et al., 2020; Algarroba G.N. et al., 2020] и других органов [Achua J.K. et al., 2021] пациентов с COVID-19. SARS-CoV-2 также удалось визуализировать в мазках из верхних дыхательных путей пациентов с COVID-19 [Prasad S. et al., 2020]. SARS-CoV-2 по данным ТЭМ обладает тропизмом к следующим клеткам: эпителиоцитам слизистой оболочки трахеи, альвеолоцитам I и II типа, энтероцитам кишечника [Bradley B.T. et al., 2020], эпителиальным клеткам канальцев [Farkash E.A. et al., 2020; Su H. et al., 2020] и подоцитам почек [Su H. et al., 2020; Kissling S. et al., 2020], кардиомиоцитам [Tavazzi G. et al., 2020], а также к эндотелиоцитам кровеносных сосудов различных органов [Stahl K. et al., 2020; Fox S.E. et al., 2020; Zhang L. et al., 2021].

Тем не менее, результаты некоторых вышеописанных работ [Su H. et al., 2020; Kissling S. et al., 2020; Algarroba G.N. et al., 2020] в дальнейшем явились предметом широкой дискуссии среди специалистов, занимающихся электронно-микроскопической визуализацией SARS-CoV-2 [Goldsmith C.S. et al., 2020; Miller S.E. et al., 2020; Kniss D.A. et al., 2020]. Причиной разногласий, вероятно, могла быть сложность электронно-микроскопической идентификации частиц SARS-CoV-2 в аутопсийном материале, в котором наряду с вирус-ассоциированными субклеточными изменениями присутствуют также признаки посмертной аутолитической деструкции, вследствие чего получается стертая

ультраструктурная картина [Neil D. et al., 2020; Dolhnikoff M. et al., 2021], отличная от описанной в исследованиях с культурами клеток.

Таким образом, интерпретации полученных при ТЭМ электронных микрофотографий требует достаточного знания не только ультраструктурной патологии тканей, но и вирусологии, в частности, ультраструктурной морфологии частиц коронавируса SARS-CoV-2 [Goldsmith C.S. et al., 2020].

Настоящий анализ литературных данных был представлен для того, чтобы показать важность проблемы комплексного патологоанатомического, молекулярно-генетического, иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования ткани легких и других органов пациентов с COVID-19.

Хотя в настоящее время формируется определенное воззрение в патогенезе гистопатологических изменений, обнаруженных при посмертном исследовании тканей легких и других жизненно важных органов при COVID-19, этиологическое значение SARS-CoV-2 в развитии этих изменений требует дальнейших исследований с использованием современных методов визуализации частиц SARS-CoV-2.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Работа основана на анализе данных патологоанатомических, молекулярно-генетических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований легких и других органов 110 случаев аутопсий, проведенных в патологоанатомическом отделении ГБУЗ «ГКБ им. Е.О. Мухина ДЗМ» в период с мая по ноябрь 2020 года, с лабораторным подтверждением диагноза COVID-19.

2.1. Патологоанатомическое исследование

Согласно Временным методическим рекомендациям «Новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Организация работы патологоанатомической службы» (Версия 3 от 15.11.2020 года), в случае смерти в стационаре больного с установленным при жизни диагнозом COVID-19 или отнесенного к категории «подозрительный и вероятный случай COVID-19» патологоанатомическое вскрытие проводится в соответствии с Федеральным законом № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 года, приказом Минздрава России № 354н от 6 июня 2013 года, Временными методическими рекомендациями Минздрава России (версия 9 от 26.10.2020), Предписаниями Главного государственного санитарного врача по городу Москве Е.Е. Андреевой от 2020 г., приказами ДЗМ и другими нормативно-правовыми документами и рекомендациями.

Патологоанатомическое вскрытие умерших с COVID-19 относится к пятой категории сложности (Приложение № 1 к Приказу Минздрава России № 354н от 6 июня 2013 года, Временные методические рекомендации Минздрава России, версия 9 от 26.10.2020 г.).

Вскрытие умерших должно проводиться, по возможности, в первые сутки после наступления смерти, в специально перепрофилированных для подобных вскрытий патологоанатомических отделениях, с соблюдением требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и другими нормативными и методическими документами в отдельной секционной.

Медицинские отходы, образующиеся в результате патологоанатомического вскрытия тел пациентов, умерших от COVID-19, подлежат обеззараживанию и/или обезвреживанию в соответствии с требованиями к медицинским отходам класса В (СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»).

2.2. Забор и подготовка материала для гистологического исследования

Забор аутопсийного материала для гистологических исследований осуществляли согласно Временным методическим рекомендациям Минздрава России (версия 9 от 26.10.2020). Для соблюдения эпидемиологической безопасности, исследуемый биоматериал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24-48 часов. Гистологическую проводку тканей осуществляли с помощью гистопроцессора Leica ASP 300S (Германия), после чего образцы заключали в парафин с температурой плавления +54°C на заливочной станции EC-350 ThermoScientific (UK). Далее, из парафиновых блоков изготавливали срезы тканей толщиной 4-5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином на автоматическом гистостейнере 740 ThermoScientific, и впоследствии заключали в среду Bio-Mount (Bio Optica Milano S.P.A., Италия). Готовые гистологические препараты исследовали под световым микроскопом с возможностью фотофиксации.

2.3. Молекулярно-генетическое исследование

2.3.1. Экстракция РНК и получение кДНК

Из фиксированных в 10%-ном забуференном формалине и заключенных в парафиновые блоки тканей головного мозга, двух зон обоих легких, сердца, обеих почек, печени и селезенки, а также от правых и левых перибронхиальных лимфатических узлов были сделаны 8-10 срезов толщиной 3 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), согласно

инструкциям производителей. В зависимости от размеров осадка, РНК была разведена в 15-30 мкл очищенной от РНКаз и ДНКаз воде. Для получения кДНК в объеме 20 мкл, проводилась реакция обратной транскрипции с использованием 10 мкл раствора РНК и набора реагентов «Реверта-Л» (компания «Интерлабсервис», Россия), в соответствие с инструкцией производителя.

2.3.2. Полимеразная цепная реакция для получения амплификатов участков гена *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена *ABL1*

Для амплификации участков гена *ORF1ab*, кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена *ABL1* разработаны и синтезированы олигодезоксирибонуклеотидные праймеры с оригинальной нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 2.

Таблица 2. Название и нуклеотидная последовательность использованных праймеров

SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, NCBI Reference Seq. NC_045512.2 (3044-3449)	
ORF1ab_F	5'- CCAGATGAGGATGAAGAAGAAGGT -3'
ORF1ab_R	5'- TGGCTGCATTAACAACCACTG -3'
Homo sapiens ABL proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6 (647-843)	
ABL1_F	5'- CGTGAGAGTGAGAGCAGTCC -3'
ABL1_R	5'- GCTGGATAATGGAGCGTGGT -3'

Нуклеотидная последовательность участка гена *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 длиной в 406 нуклеотидов, расположенная между позициями 3044-3449 (NCBI Reference Seq. NC_045512.2):

CCAGATGAGGATGAAGAAGAAGGTGATTGTGAAGAAGAAGAGTTTGAGCC
 ATCAACTCAATATGAGTATGGTACTGAAGATGATTACCAAGGTAAACSTTT
 GGAATTTGGTGCCACTTCTGCTGCTCTTCAACCTGAAGAAGAGCAAGAAGA
 AGATTGGTTAGATGATGATAGTCAACAACCTGTTGGTCAACAAGACGGCAG
 TGAGGACAATCAGACAACТАCTATTCAAACAATTGTTGAGGTTCAACSTCA
 ATTAGAGATGGAACCTTACACCAGTTGTTTCAGACTATTGAAGTGAATAGTTTT
 AGTGGTTATTTAAAACCTTACTGACAATGTATACATTA AAAAATGCAGACATTG
 TGGAAGAAGCTAAAAAGGTAAAACCAACAGTGGTTGTTAATGCAGCCA

Нуклеотидная последовательность участка мРНК ABL1 длиной в 197 нуклеотидов, расположенная между позициями 647-843 (Homo sapiens ABL proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6):

CGTGAGAGTGAGAGCAGTCCTGGCCAGAGGTCCATCTCGCTGAGATACGAA
GGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTAC
GTCTCCTCCGAGAGCCGCTTCAACACCCTGGCCGAGTTGGTTCATCATCATT
CAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCACGCTCCATTATCCAGC

2.3.3. Создание генно-инженерной конструкции на основе плазмидного вектора pGEM®-T Easy и создание калибровочных серийных разведений

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, согласно инструкции производителя. Схематическая конструкция плазмидного вектора pGEM®-T Easy представлена на рисунке 6.

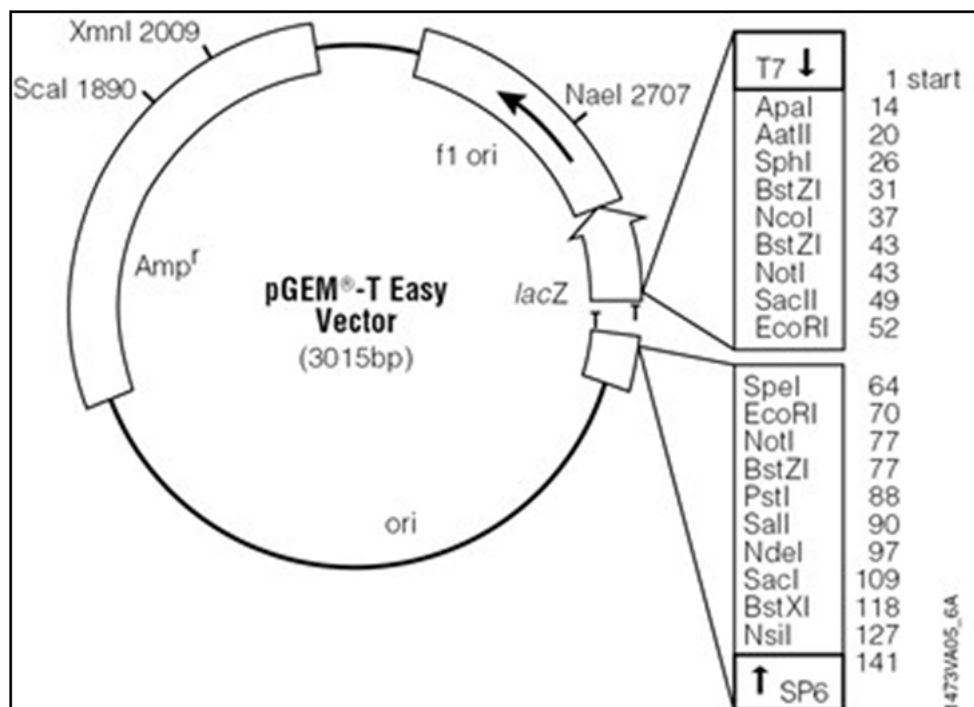


Рисунок 6. Схематическое изображение плазмиды pGEM®-T Easy

Далее, 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.

2.3.4. Количественная мультимплексная ПЦР РВ

Для проведения количественной ПЦР РВ нами 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, с нуклеотидной последовательностью представленной в таблице 3.

Таблица 3. Нуклеотидная последовательность олигодезоксирибонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов, комплементарных к гену *ORF1ab* коронавируса SARS-CoV-2 и человеческому гену ABL1.

SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, NCBI Reference Seq. NC_045512.2 (3160-3410)	
F1	5'- ATGATAGTCAACAAACTGTTGGTCA -3'
R1	5'- CAACTGGTGTAAGTTCCATCTCT -3'
Pr1	ROX 5' - GGCAGTGAGGACAATCAGACAAC - 3' BQH1
Homo sapiens ABL proto-oncogene 1. NCBI Reference Seq. NM_005157.6 (647-843)	
ABL1_F	5'- CGTGAGAGTGAGAGCAGTCC -3'
ABL1_R	R2 5'- GCTGGATAATGGAGCGTGGT -3'
ABL1_Pr	R6G 5' - AGCCGCTTCAACACCCTGGC -3' BQH1

Количественную ПЦР РВ проводили с использованием смеси реагентов общим объемом 25 мкл, из них: реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами 2,5x («Синтол» Россия) -10 мкл, MgCl₂ 25 mM -1 мкл, смесь олигонуклеотидов (F1, R1, ABL1_F, ABL1_R по 10 пкмоль/мкл) – 1 мкл, смесь меченых зондов (Pr1 и ABL1_Pr) по 5 пкмоль/мкл – 1 мкл, вода очищенная - 2 мкл. В качестве матрицы использованы кДНК в объеме 10 мкл.

Количественную ПЦР РВ проводили в амплификаторе "Rotor-Gene Q" («Qiagen», USA) в температурном режиме: 95 °С – 600 с, 50 циклов 95 °С – 15 с, 60 °С – 60 с. Результаты флуоресцентной гибридизации кДНК отражается в

оранжевом (SARS-CoV-2) и желтом (ABL1) канале амплификатора. Измерение истинной копии ДНК плазмиды со вставкой SARS-CoV-2 и ABL1 осуществляется специальной программой для количественных исследований, установленной в амплификатор.

Стандартная кривая ПЦР РВ серийных разведений плазмиды pGEM®-T Easy со вставкой участка гена ORF1ab коронавируса SARS-CoV-2 с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 копий кДНК SARS-CoV-2 и гена ABL1 с концентрацией 40, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 копий в 10 мкл, представлены на рисунке 7 и 8, соответственно.

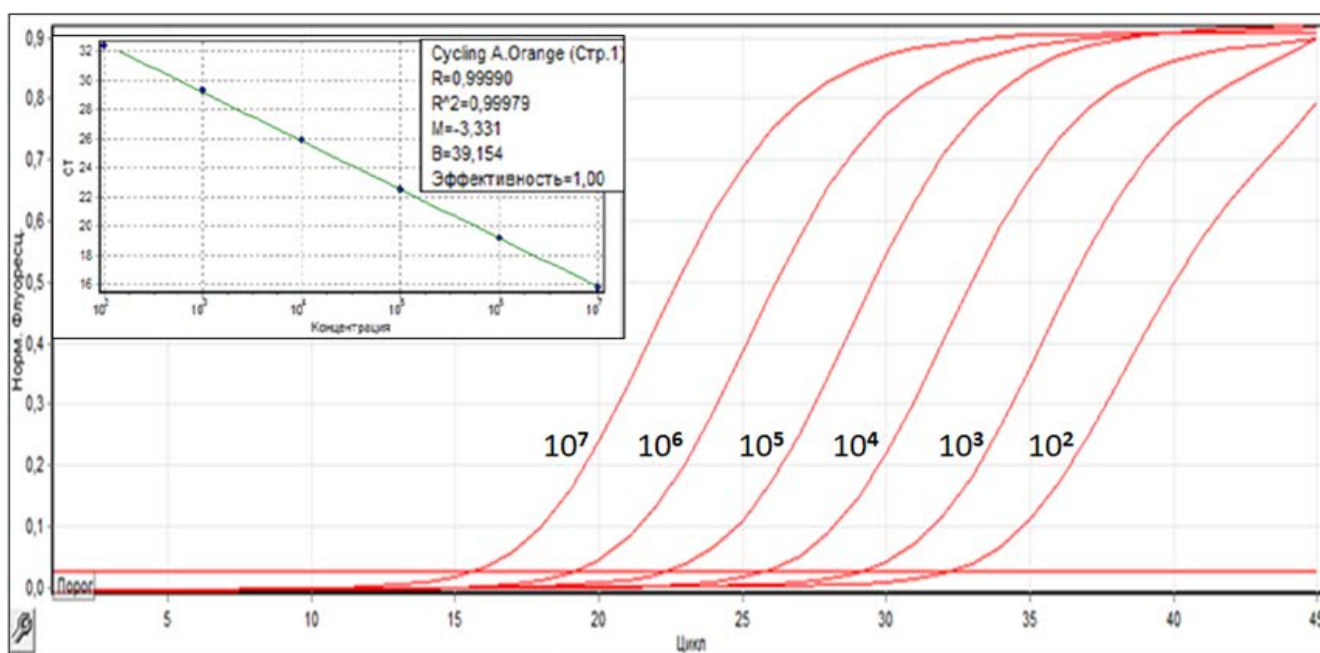


Рисунок 7. Кривая ПЦР РВ серийных разведений плазмиды pGEM®-T Easy со вставкой участка гена ORF1ab коронавируса SARS-CoV-2 с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 копий в 10 мкл.

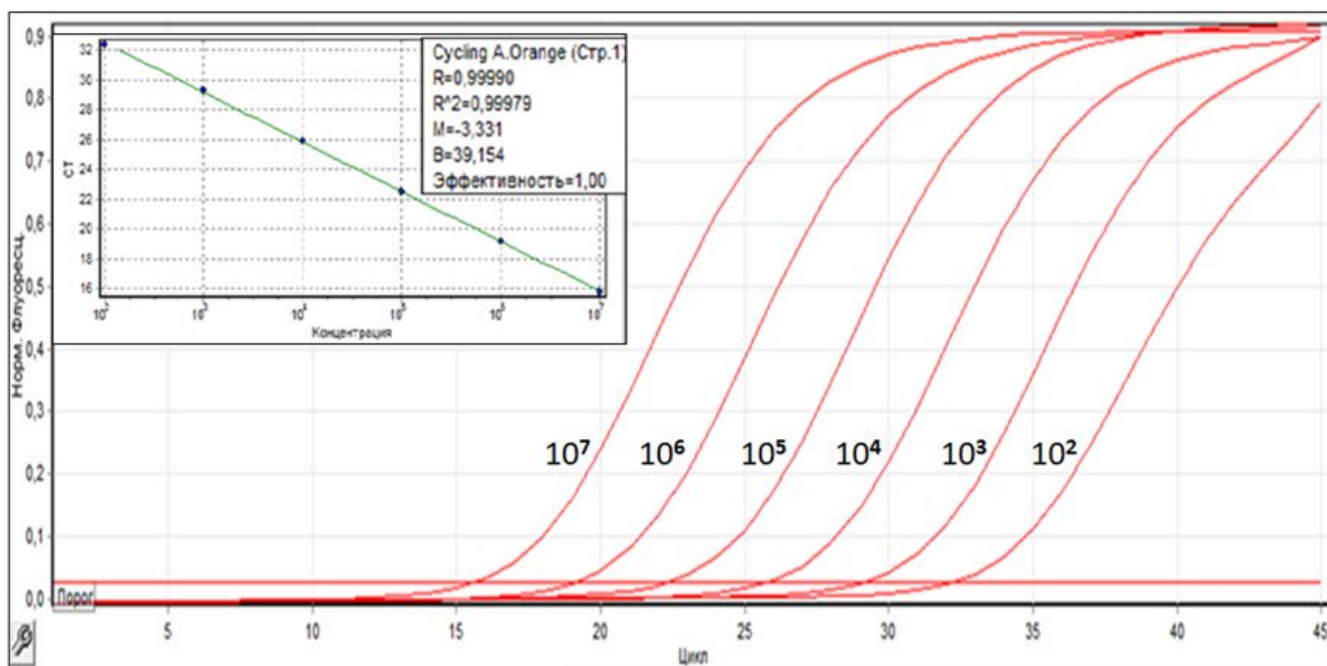


Рисунок 8. Кривая ПЦР РВ серийных разведений плазмиды pGEM®-T Easy со вставкой участка гена ABL1 с концентрацией 40, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ копий в 10 мкл.

Как видно, из рисунков, коэффициент корреляции серийных разведений ДНК плазмиды со вставкой SARS-CoV-2 (оранжевый канал) и ABL1 (желтый канал) была равной $R^2 = 0,99906$ и $R^2 = 0,99976$, а эффективность показала 1,00 (100%). Предлагаемый способ обладает чувствительностью выявлять не менее 50 копий SARS-CoV-2 в исследуемом образце.

2.3.5. Количественная оценка ВН SARS-CoV-2

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.

2.3.6. Прямое секвенирование по Сэнгеру гена *Spike SARS-CoV-2*

Для выявления возможных мутаций RBD и идентификации штамма SARS-CoV-2 мы провели секвенирование гена *Spike* по Сэнгеру с использованием праймеров со следующей нуклеотидной последовательностью:

5'-CAACAGAGTTGTTATTTCTAGTGATGT-3' и 5'-TCTGAACTCACTTTCCATCCA-3';

5'-TGATCCATTTTTGGGTGTTT-3' и 5'-CAGTGAAGGATTTCAACGTACA-3';

5'-TGTGCACTTGACCCTCTCTC-3' и 5'-TCAAAAGGTTTGAGATTAGACTTCC-3';

5'-TCTTGATTCTAAGGTTGGTGGT-3' и 5'-AACAGGGACTTCTGTGCAGTT-3';

5'-TCTTTTGGTGGTGTGTCAGTGTT-3' и 5'-CTGCCATATTGCAACAAAAGA-3';

5'-GTACATTTGTGGTGATTCAACTG-3' и 5'-CATTAAACCTATAAGCCATTTGC-3';

5'-GCAGGTGCTGCATTACAAAT-3' и 5'-ACCATGAGGTGCTGACTGAG-3';

5'-CAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGA-3' и 5'-ATTGAGGCGGTCAATTTCTT-3';

5'-ATGATCSTTTGCAACCTGAA-3' и 5'-TGAAGATTCTCATAAACAATCCA-3'.

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/>).

2.4. Иммуногистохимическое исследование

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), в соответствии с протоколом производителя.

Для ИГХ-исследования из парафиновых блоков, приготовленных для гистологического исследования на микротоме, изготавливали серийные срезы,

толщиной не более 5 мкм, которые затем монтировали на положительно заряженные стекла, покрытые поли-L-лизином. На каждое предметное стекло клеился соответствующий маркировочный стикер, включающий номер стекла, название используемого маркера, дату исследования и индивидуальный штрих-код для считывания аппаратом автоматического ИГХ-окрашивания Autostainer 360 Thermo Scientific (UK).

После предварительной депарафинизации в ксилоле в течение 15 минут, срезы помещали в РТ-модуль (ThermoScientific, UK) на 20 минут при температуре +98°C для полной депарафинизации и высокотемпературного восстановления эпитопа (демаскировки) антигенов. Для демаскировки ядерных антигенов использовался буфер с рН 6,0, а для демаскировки цитоплазматических – буфер с рН 9,0.

ИГХ-реакция осуществлялась на аппарате автоматического ИГХ-окрашивания Autostainer 360 Thermo Scientific (UK) посредством усиления сигнала через полимерную систему детекции QUANTO (ThermoFisher).

Протокол ИГХ-окрашивания для автоматического стейнера включал:

1. Нанесение H_2O_2 в течение 10 минут для блокирования эндогенной пероксидазы;
2. Протеиновый блок Рblk в течение 10 минут для исключения неспецифического фонового окрашивания;
3. Нанесение первичных антител и инкубация в течение 30 минут;
4. Нанесение амплификатора Amp в течение 10 минут для усиления сигнала первичных антител;
5. Нанесение полимера HRP в течение 20 минут;
6. Нанесение 3,3-диаминобензидина (DAB) в течение 5 минут для получения на срезах специфического коричневого окрашивания;

При осуществлении протокола ИГХ-окрашивания, перед нанесением следующего реагента, предыдущий промывали с поверхности срезов TRIS буфером (рН 7,6) с Tween 20.

После ИГХ-реакции срезы отмывали в дистиллированной воде, затем для контр-окрашивания выдерживали в гематоксилине Майера в течение 3 минут. После приобретения срезами голубого оттенка, стекла погружали на минуту в дистиллированную воду с добавлением нескольких капель нашатырного спирта для ощелачивания среды. Срезы затем обезвоживали в батарее этилового спирта с восходящей концентрацией и заключали в Bio-Mount (Bio Optica Milano S.P.A., Италия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом с возможностью фотофиксации.

2.5. Электронно-микроскопическое исследование

Для ТЭМ-исследования нативные образцы легких, лимфатических узлов и почек рассекали на отдельные фрагменты размерами 1-2 мм³ и фиксировали при +4°C в 4% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2-7,4) в течение 4-5 часов. Затем фрагменты тканей промывали фосфатным буфером 2 раза по 10 минут и проводили постфиксацию при +4°C в 1% растворе OsO₄ на 0,1М фосфатном буфере в течение 2-3 часов. После, образцы снова промывали фосфатным буфером в течение 15 минут и проводили дегидратацию в спиртах восходящей концентрации. На стадии 70% этанола образцы тканей контрастировали в уранилацетате в течение ночи. Далее фрагменты обезвоживали в ацетоне и пропитывали заливочной средой (Эпон) при комнатной температуре при постоянном помешивании. Предварительно разливали Эпон по капсулам, затем помещали объекты на поверхность смолы и оставляли на 1,5 часа при комнатной температуре, после чего материал помещали в термостат для полимеризации смолы. После заточки заключенных в Эпон тканевых блоков, получали ультратонкие срезы, которые монтировали на сеточки и подвергали контрастированию в уранилацетате и цитрате свинца по Рейнолдсу. Срезы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония).

2.6. Методы статистической обработки данных и оформление

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.

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Общая характеристика пациентов

В данной главе приведены результаты посмертных патологоанатомических, молекулярно-генетических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований легких и других органов 110 пациентов, умерших с COVID-19.

Наша группа пациентов состояла из 56 мужчин и 54 женщин, в процентном соотношении 50,9% к 49,1%, соответственно. Медиана возраста пациентов-мужчин составила 67 лет (диапазон 37-97 лет), женщин – 74,5 лет (диапазон 41-95 лет), что представлено на диаграмме ниже (рисунок 9).

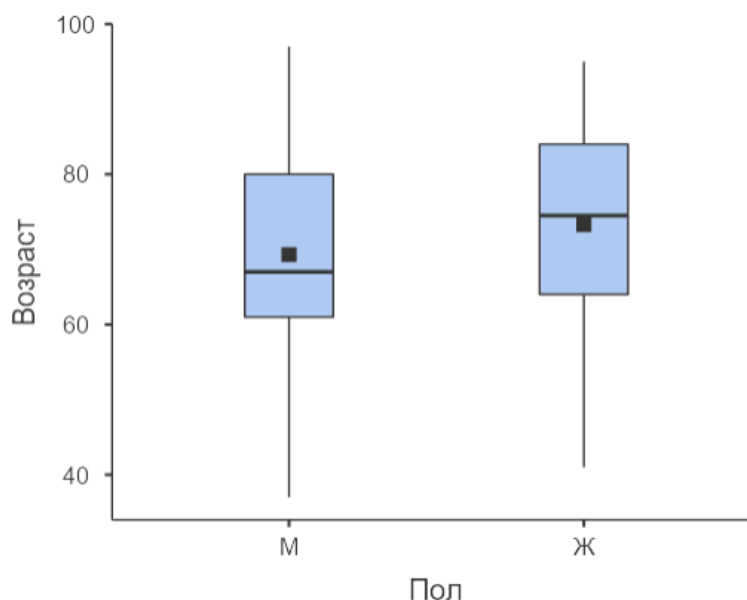


Рисунок 9. Возраст наших пациентов в зависимости от пола

По данным историй болезни, все пациенты с COVID-19 имели ряд сопутствующих заболеваний, частота встречаемости которых представлена в таблице 4.

Таблица 4. Частота встречаемости сопутствующих заболеваний у пациентов, умерших с COVID-19

№	Сопутствующие болезни	Общая частота, % (n)	Мужчины, % (n)	Женщины, % (n)
1.	Артериальная гипертензия	69,1 (76/110)	52,6 (40/76)	47,4 (36/76)
2.	Ишемическая болезнь сердца	27,3 (30/110)	53,3 (16/30)	46,7 (14/30)
3.	Болезни ЦНС	23,6 (26/110)	53,8 (14/26)	46,2 (12/26)
4.	Сахарный диабет II типа	16,4 (18/110)	44,4 (8/18)	55,6 (10/18)
5.	Хронические болезни почек	16,4 (18/110)	50 (9/18)	50 (9/18)
6.	Онкологические заболевания	13,6 (15/110)	46,7 (7/15)	53,3 (8/15)
7.	Ожирение	10,9 (12/110)	58,3 (7/12)	41,7 (5/12)

Как показано в таблице 4, наиболее частым сопутствующим COVID-19 заболеванием в нашей когорте пациентов является артериальная гипертензия, отмеченная в 69,1% (76/110) случаев, частота встречаемости которой была незначительно выше у мужчин (52,6%), чем у женщин (47,4%). Заболевания сердца встречались у 27,3% (30/110) пациентов, с небольшим преобладанием у мужчин - 53,3% (16/30). Структура заболеваний сердца была представлена ишемической кардиомиопатии в 13 случаях, постинфарктным кардиосклерозом в 13 случаях, и ишемической болезнью сердца в 4 случаях. Болезни ЦНС как сопутствующая патология отмечалась в 23,6% (26/110) случаев, с умеренным преобладанием у женщин - 53,8 (14/26). Болезни ЦНС были представлены атрофией головного мозга, хронической ишемией головного мозга, ишемическими инфарктами, и последствиями острого нарушения мозгового кровообращения. Также, в единичных случаях были отмечены острое нарушение мозгового кровообращения, энцефалопатии, а также болезни Альцгеймера и Паркинсона. Сахарный диабет II типа и хронические заболевания почек в качестве сопутствующих заболеваний встречались в 16,4% (18/110) случаев. У 13,6% (15/110) пациентов отмечались онкологические заболевания. Ожирением различной степени тяжести страдали 10,9% (12/110) пациентов.

Кроме того мы исследовали структуру и частоту причин смерти 110 пациентов с COVID-19, которые представлены в таблице 5.

Таблица 5. Структура и частота причин смерти пациентов с COVID-19

№	Причина смерти	Частота встречаемости, % (n)		
		Общая	Мужчины	Женщины
1	ОРДС	55 % (61/110)	57,4% (35/61)	42,6% (26/61)
2	ТЭЛА	19,1% (21/110)	33% (7/21)	67% (14/21)
3	ССН	17% (19/110)	42% (8/19)	58% (11/19)
4	ОГМ	8% (9/110)	56% (5/9)	44% (4/9)
5	ПОН	0,9% (1/110)	100% (1/1)	0% (0/1)

Примечание: ОРДС - острый респираторный синдром; ТЭЛА - тромбоэмболия легочной артерии; ССН - сердечно-сосудистая недостаточность; ОГМ - отек головного мозга, ПОН - полиорганная недостаточность.

Как представлено в таблице 5, непосредственной причиной смерти у 55% (61/110) пациентов было развитие тяжелого ОРДС. ТЭЛА и сердечно-сосудистая недостаточность стали причиной летального исхода 19% (21/110) и 17% (19/110) пациентов, соответственно. Причем, ТЭЛА и ССН, чаще развивались у женщин – 67% (14/21) и 58% (11/19) случаев, соответственно. Частота летальных случаев от развития отека головного мозга и полиорганной недостаточности составила 8% (9/110) и 5,5% (6/110), соответственно, с преобладанием обоих у мужчин – 56% (5/9) и 67% (4/6), соответственно.

3.2. Результаты патологоанатомических исследований легких

Основные макроскопические изменения легких у пациентов, умерших с COVID-19, характеризовались значительным увеличением массы органа, уплотнением легочной паренхимы, изменением цвета (от серовато-розового до синюшно-красного), застойными явлениями, а также очагами кровоизлияний.

Уплотнения легочной паренхимы в 37,3% (41/110) случаев носили двусторонний тотально диффузный характер, в 47,3% (52/110) случаев – двусторонней нижнедолевой с вовлечением средних и верхних сегментов – у 9 и 10 пациентов, соответственно. В 8,2% (9/110) наблюдений отмечалось тотальное диффузное уплотнение ткани легких в одном легком и очаговое уплотнение в нижних долях противоположного легкого (рисунок 10).

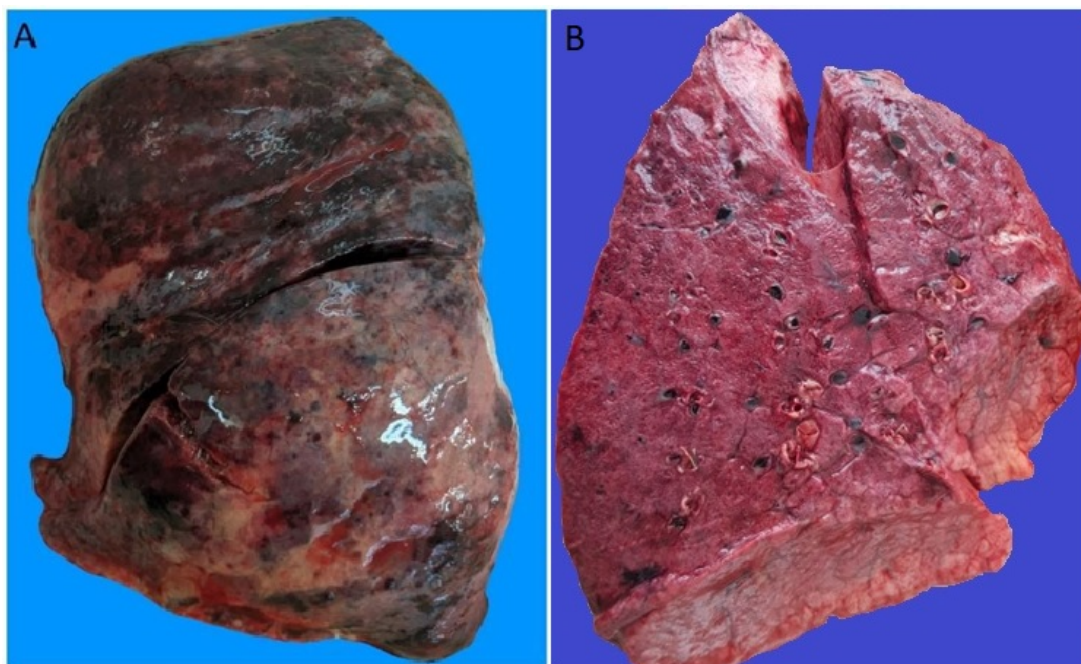


Рисунок 10. Характер уплотнений легочной паренхимы пациентов, умерших с COVID-19. А. Легкое плотное, с поверхности темно-вишневое и красно-бурое. В. Легкое на разрезе диффузно уплотнено, безвоздушно, полнокровно, синюшно-красное, с очаговыми кровоизлияниями.

На разрезе в паренхиме легких в 67,3% (74/110) случаев выявлялись обширные сливными очагами кровоизлияний, придающими легким темно-вишневую окраску (рисунок 11).

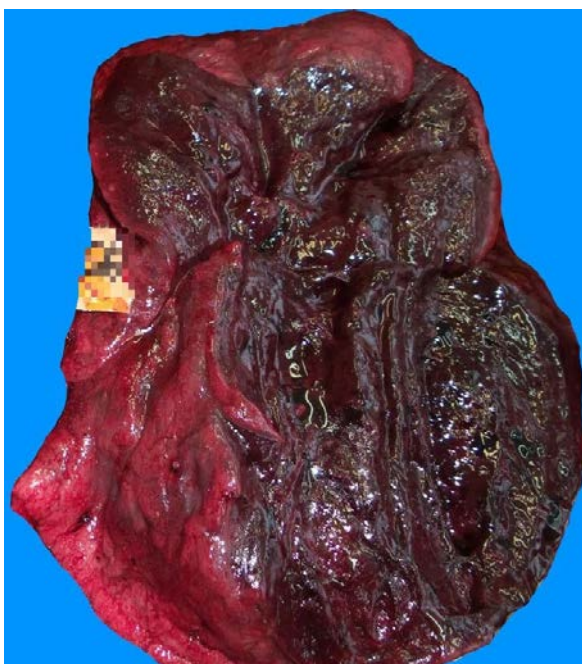


Рисунок 11. Легкое уплотнено, безвоздушно, на разрезе полнокровно, красно-синюшное.

При макроскопическом исследовании сосудов легких в 29,1% (32/110) случаев просветы легочных артерий различного калибра были обтурированы множественными темно-красными тромботическими массами, местами плотно спаянными с интимой сосудов (рисунок 12).

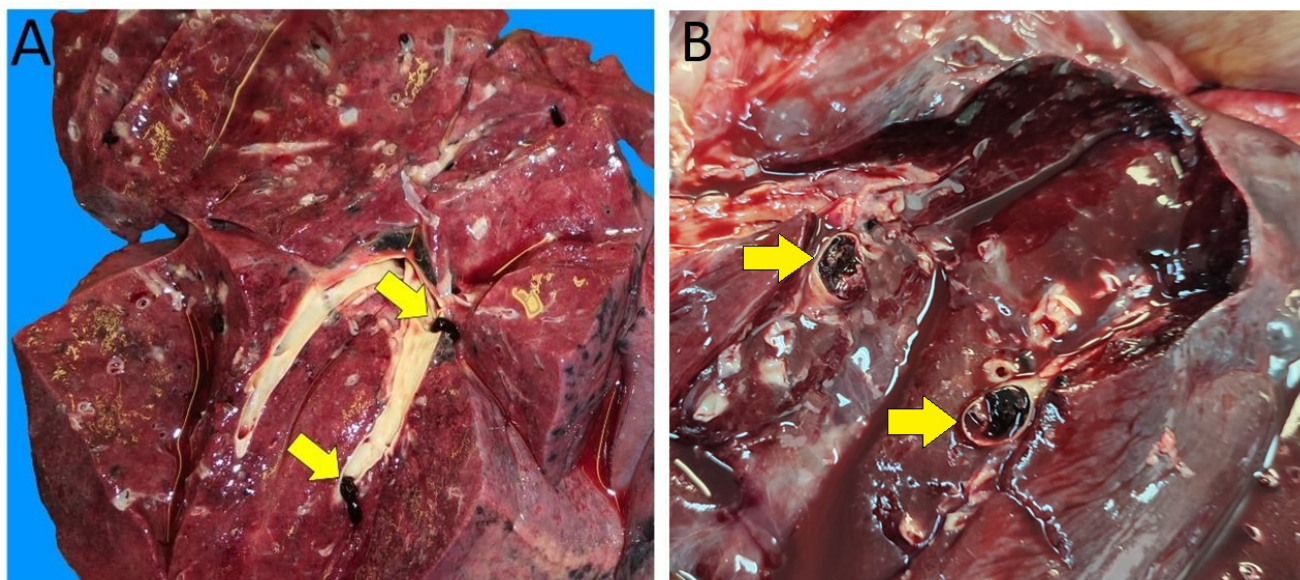


Рисунок 12. Обтурирующие тромбы в просветах легочной артерии. А. В просвете сегментарной ветви легочной артерии темно-красный тромб плотно спаянный с интимой сосуда; В. Обтурирующие тромбы в просвете легочной артерии.

В 19,1% (21/110) случаев в просвете легочных артерий обнаруживались тромбоемболы темно-красного цвета, не спаянные с интимой сосудов (рисунок 13А), и ассоциированные с тромбозом глубоких вен нижних конечностей (рисунок 13В) и пристеночными интракардиальными тромбами (рисунок 13С).

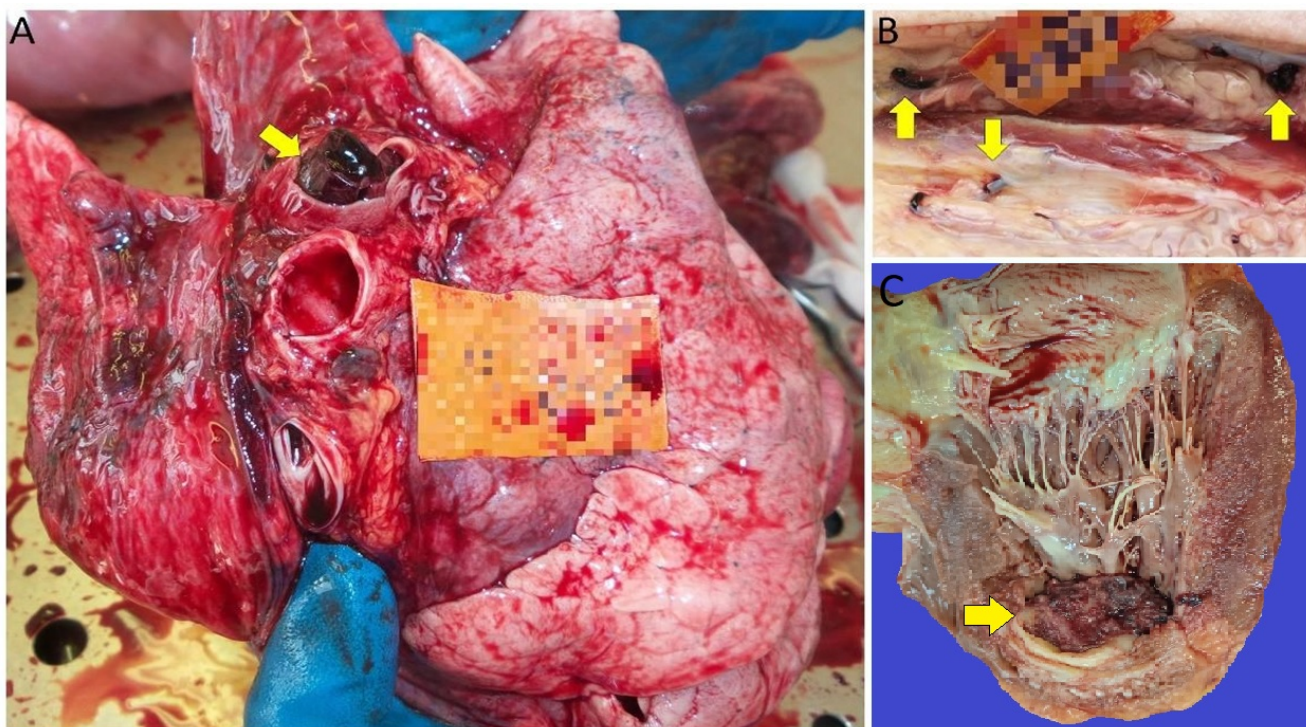


Рисунок 13. А. Обтурирующий тромб в просвете долевой ветви легочной артерии не спаянный с интимой сосуда (желтая стрелка); В. Обтурирующий тромб в глубоких венах голени; С. Пристеночные межтрабекулярные тромбы в желудочке сердца.

Также, при аутопсийных исследованиях в 33,6% (37/110) наблюдений было выявлено значительное увеличение размеров трахеобронхиальных лимфатических узлов, размер которых в среднем достигал 2,35 см (диапазон 1-4,5 см) в наибольшем измерении (рисунок 14).

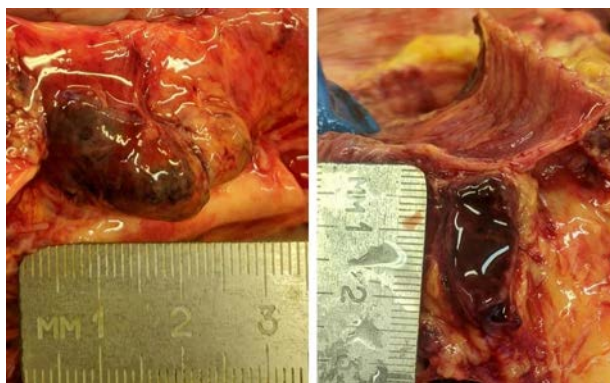


Рисунок 14. Трахеобронхиальные лимфатические узлы, размеры которых в наибольшем измерении составляют 2,5 см.

Характер и частота гистопатологических изменений, выявленных при гистологическом исследовании легочной ткани представлены в таблице 6.

Таблица 6. Характер и частота гистопатологических изменений, найденных в легких.

№	Гистопатологические изменения	Частота % (n)
1	Внутриальвеолярная/интерстициальная клеточная инфильтрация	84,5 (93/110)
2	Десквамация альвеолярного/бронхиолярного эпителия	79,1 (87/110)
3	Гиалиновые мембраны	77,3 (85/110)
5	Полнокровие сосудов/капиллярный стаз	73,6 (81/110)
6	Внутриальвеолярный отек	68,1 (75/110)
6	Внутриальвеолярные кровоизлияния	54,5 (60/110)
7	Тромбозы сосудов	51,8 (57/110)
9	Утолщение межальвеолярных перегородок	39,1 (43/110)
10	Плоскоклеточная метаплазия	32,7 (36/110)
11	Перибронхиальный/периваскулярный фиброз	12,7 (14/110)

Как представлена в таблице 6, при гистологическом исследовании легких наиболее часто выявлялась внутриальвеолярная и интерстициальная клеточная инфильтрация (84,5%), состоящая из лимфоцитов, макрофагов, плазмоцитов, а также полиморфноядерных лейкоцитов (рисунок 15).

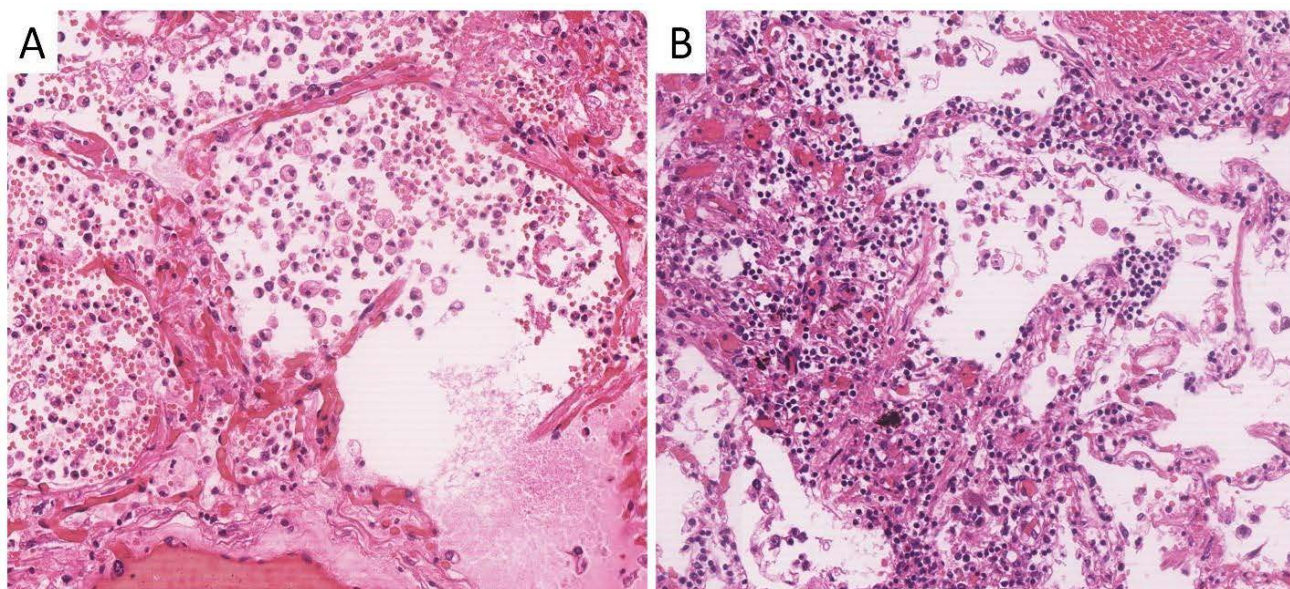


Рисунок 15. А. В просветах альвеол внутриальвеолярный отек, макрофаги и лимфоциты; В. Межальвеолярные перегородки инфильтрированы лимфоцитами. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

В 79,1% наблюдений полость альвеол и просвет бронхиол был заполнен клетками десквамированного альвеолярного и бронхиолярного эпителия (рисунок 16).

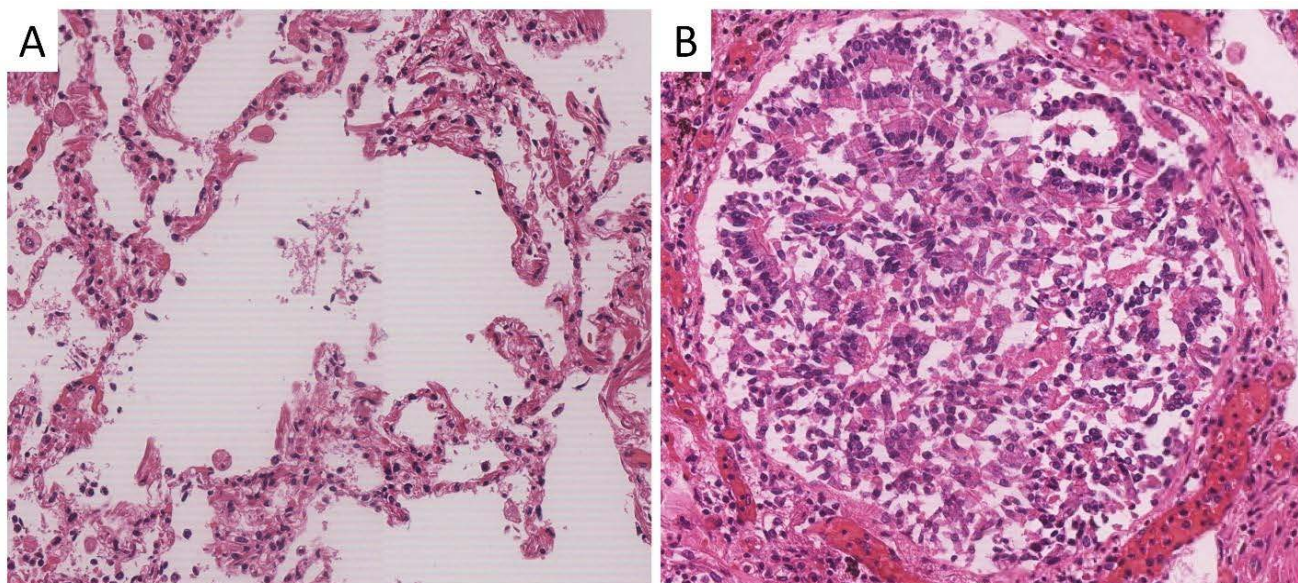


Рисунок 16. А. В полости альвеол содержится сплюснутые клетки альвеолярного эпителия; В. Десквамированный эпителий в просвете терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

В полости альвеол в 77,3% случаев обнаруживались светло-эозинофильные гомогенные массы - гиалиновые мембраны, покрывающие контуры альвеол (Рисунок 17А). В 73,6% наблюдений сосуды легких полнокровны, капилляры альвеолярных стенок характеризуются выраженным стазом со сдавлом эритроцитов (рисунок 17В).

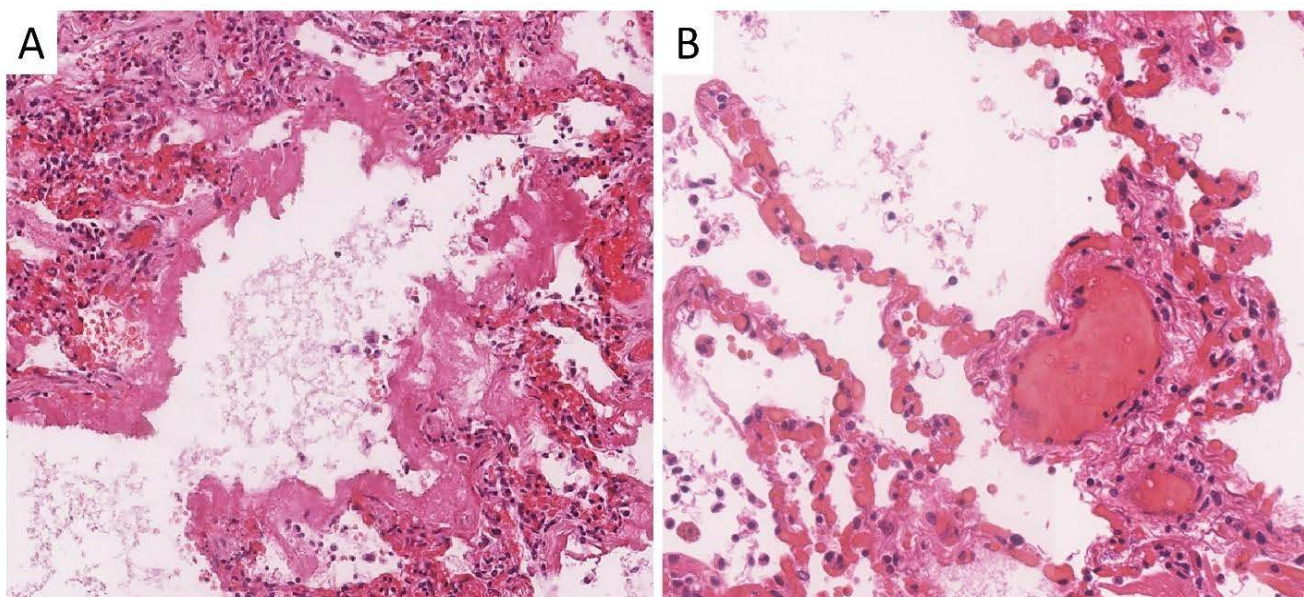


Рисунок 17. А. Гиалиновые мембраны, по контуру альвеол, и фибрин в просвете альвеолярного хода, х200; В. Полнокровные сосуды и стаз в капиллярах, х300. Окраска гематоксилином и эозином.

У 68,1% пациентов отмечался внутриальвеолярный отек и полости альвеол были заполнены светло-розового цвета богатого белком выпотом, а у 54,5% - обширные очаги внутриальвеолярных кровоизлияний (рисунок 18).

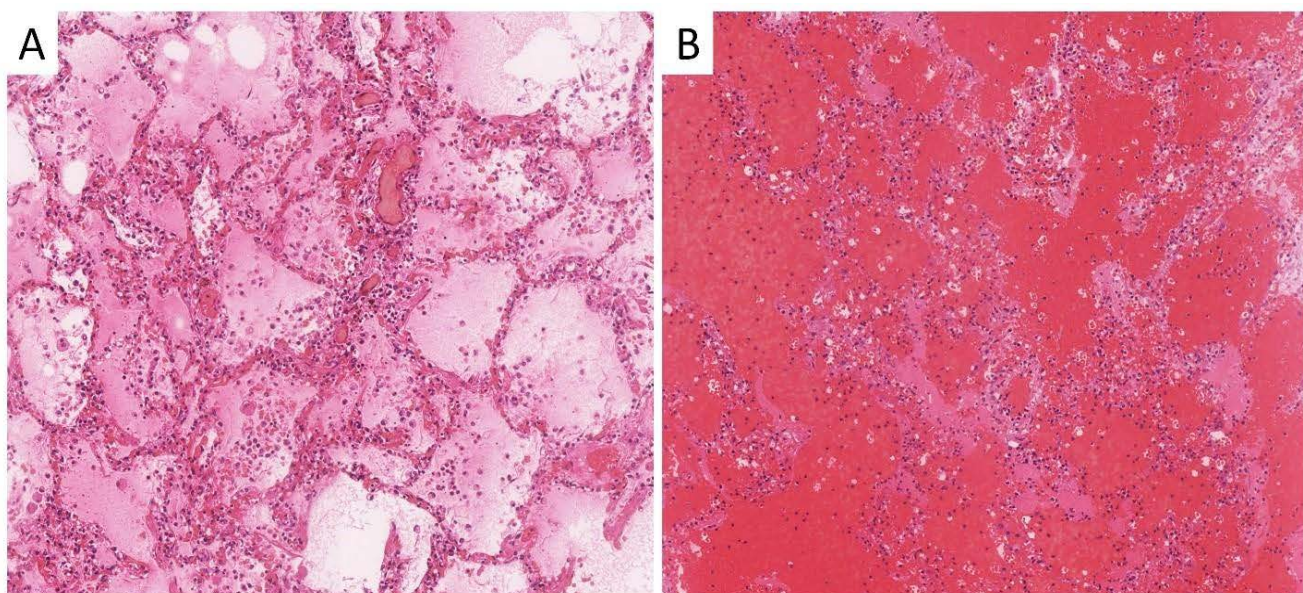


Рисунок 18. А. Внутриальвеолярный отек; В. Внутриальвеолярное кровоизлияние. Окраска гематоксилином и эозином, х100.

У 57 пациентов (51,8%) был обнаружен тромбоз легочных артерий и вен различного калибра (рисунок 19).

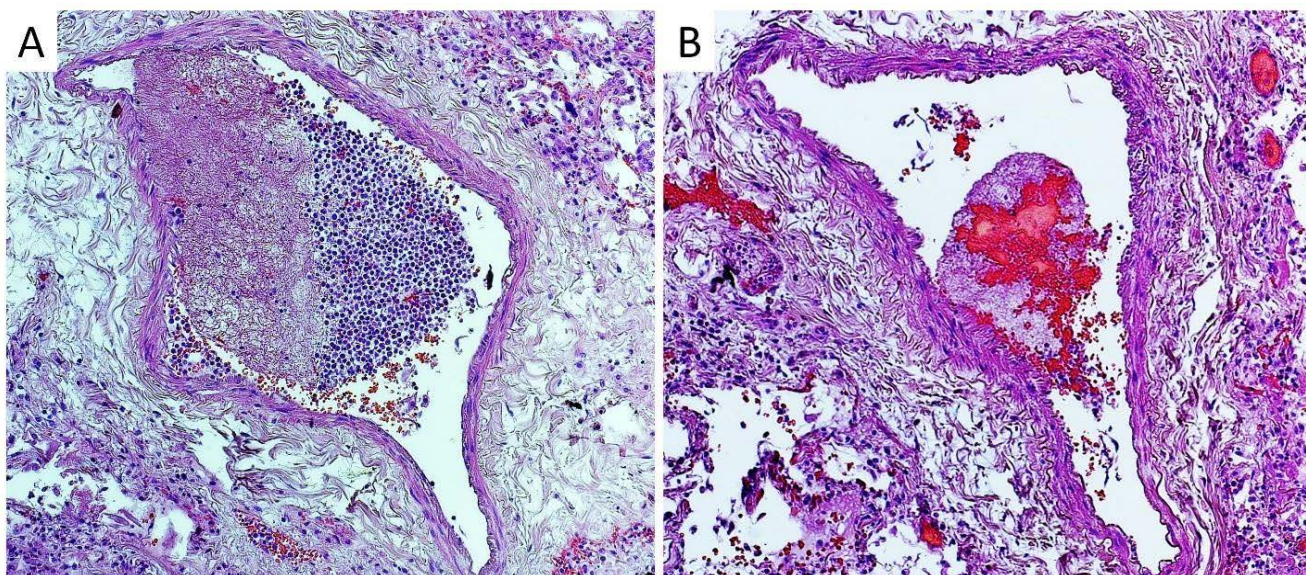


Рисунок 19. А. Смешанный организующийся тромб; В. Смешанный пристеночный тромб в просвете ветви легочной артерии. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

В 39,1% (43/110) случаев межальвеолярные перегородки были утолщены за счет пролиферации фибробластов и интерстициального фиброза (рисунок 20А), а в 12,7% наблюдений отмечался перибронхиальный и периваскулярный фиброз (рисунок 20В).

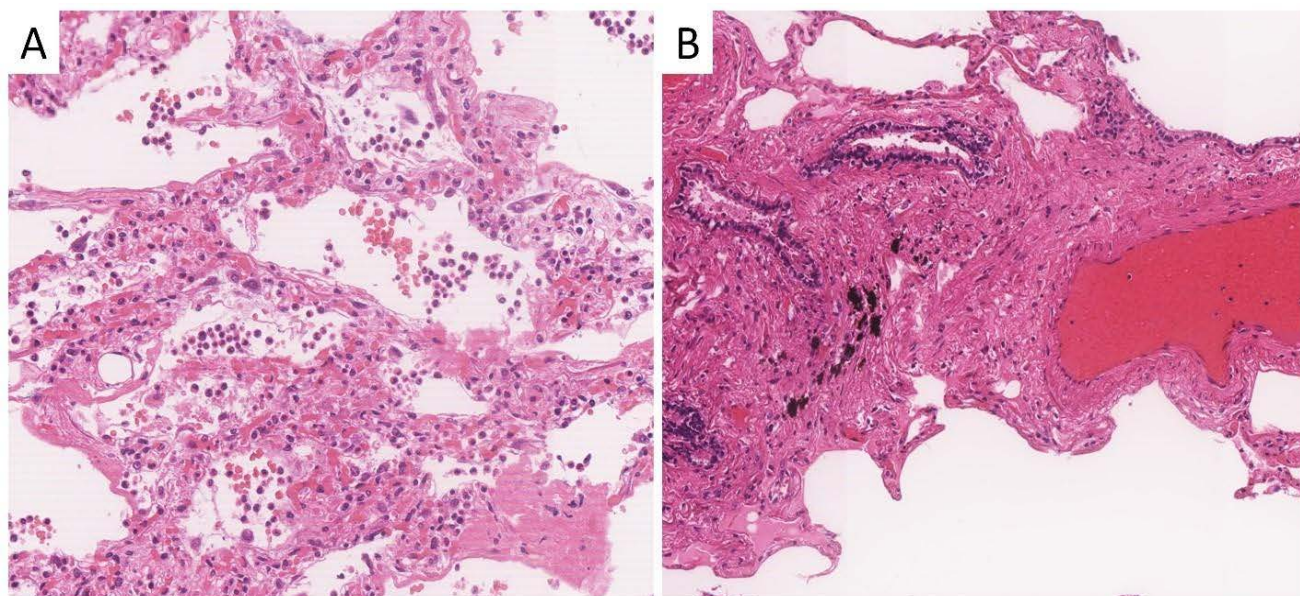


Рисунок 20. А. Утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека и пролиферации фибробластов, x200; В. Перибронхиолярный и периваскулярный фиброз, x100. Окраска гематоксилином и эозином.

Таким образом, 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 21).

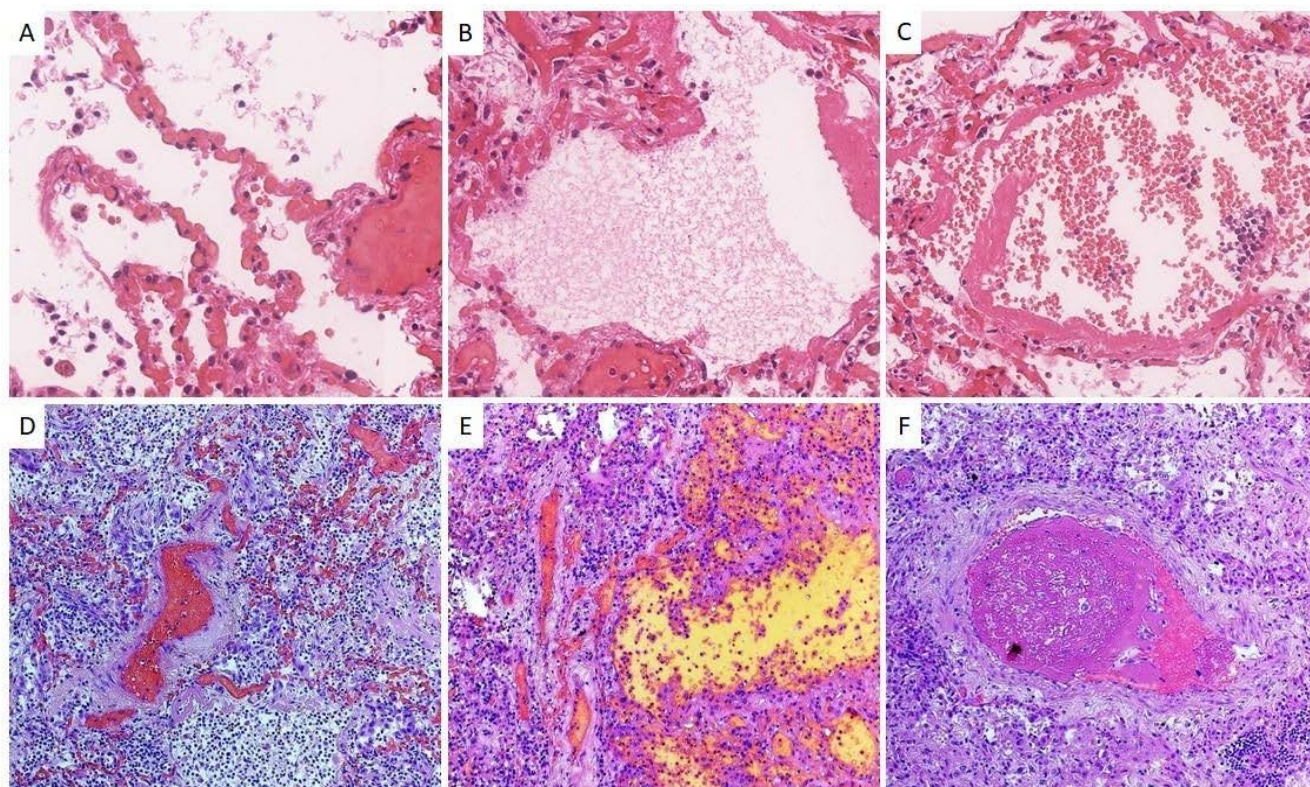


Рисунок 21. Гистопатологические признаки экссудативной фазы ДАП. А. Полнокровие сосудов легких и стаз капилляров межальвеолярных перегородок, внутриальвеолярный клеточный детрит, х300; В. Внутриальвеолярный отек и гиалиновые мембраны, х300; С. Гиалиновые мембраны и скопление эритроцитов в полости альвеолы, х200; Д. Полнокровие и стазы в сосудах легких с мононуклеарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, х100. Е. Очаги кровоизлияния с гемолизом эритроцитов, х100. Ф. Обтурирующий фибриновый

тромб в просвете ветви легочной артерии, $\times 100$. 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 22А-С). При бронхопневмонии отмечалась заполнение полости альвеол и просвета бронхов полиморфноядерной клеточной инфильтрацией (рисунок 22D, E). В отдельных участках легких выявлялись очаги эмфизематозно расширенных альвеол (рисунок 22F).

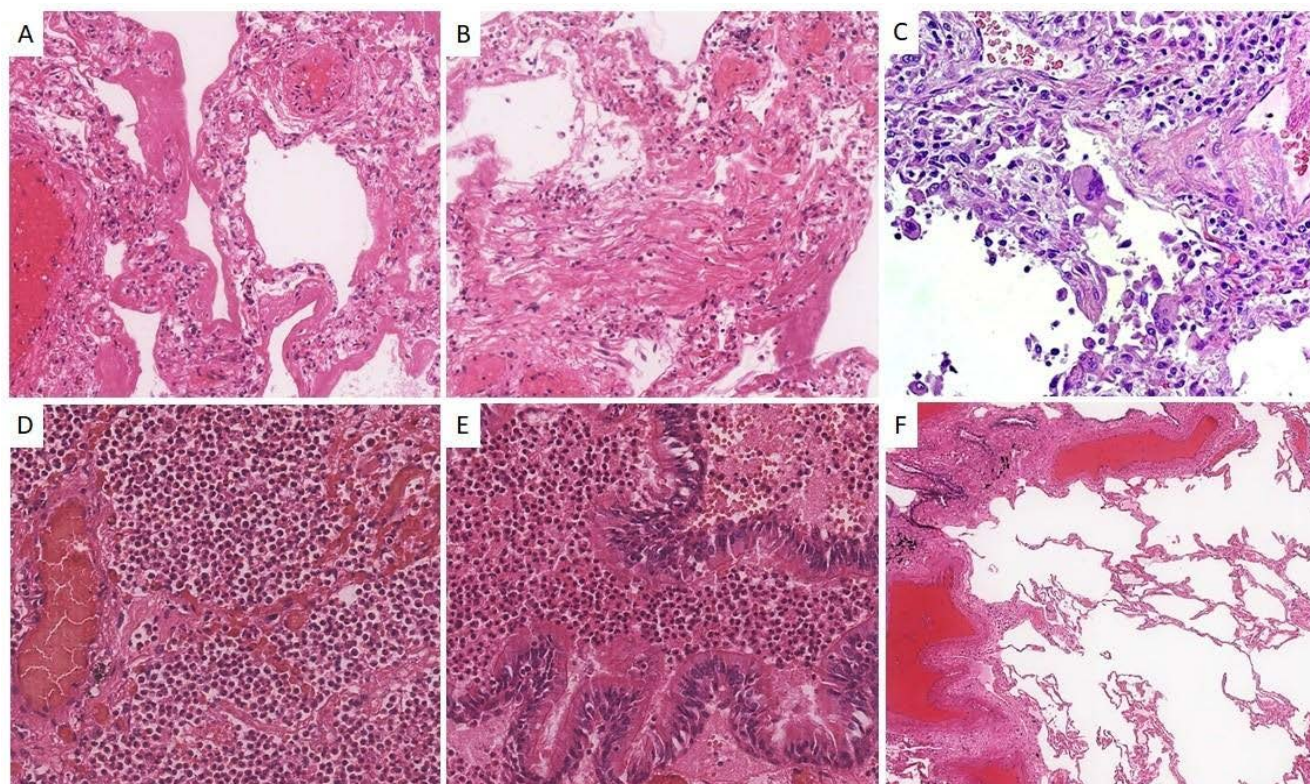


Рисунок 22. Гистопатологические признаки пролиферативной фазы ДАП и бронхопневмонии. А, В. Утолщенные за счет пролиферации фибробластов межальвеолярные перегородки, $\times 100$; С. В просвете альвеол встречаются единичные крупные атипичные многоядерные клетки, $\times 200$; D, E. Внутриальвеолярная и внутрибронхиолярная полиморфноядерная лейкоцитарная

инфильтрация, х200; F. Участки перибронхиолярного и периваскулярного фиброза, х40. 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.

Далее, для уточнения этиологической роли коронавируса SARS-CoV-2 в вышеописанных гистопатологических изменениях нами проведен молекулярно-генетический анализ на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в пораженных тканях легких и других органов, результаты которого представлены в следующем разделе настоящей главы.

3.3. Результаты молекулярно-генетических исследований

Данный раздел включает результаты молекулярно-генетической детекции РНК и количественной оценки уровня ВН SARS-CoV-2 в образцах ткани легких и других органов 36 пациентов, умерших от COVID-19 в период с октября по ноябрь 2020 года. Кроме того, в настоящий раздел вошли результаты прямого секвенирования гена *Spike*. Количественная оценка ВН SARS-CoV-2 осуществлялась оригинальным способом кПЦР РВ, авторские права на который закреплены патентным документом № RU2761358C1 от 07.12.2021 года “Набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидов и способ количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в тканях различных органов методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени”.

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) (рисунок 23).

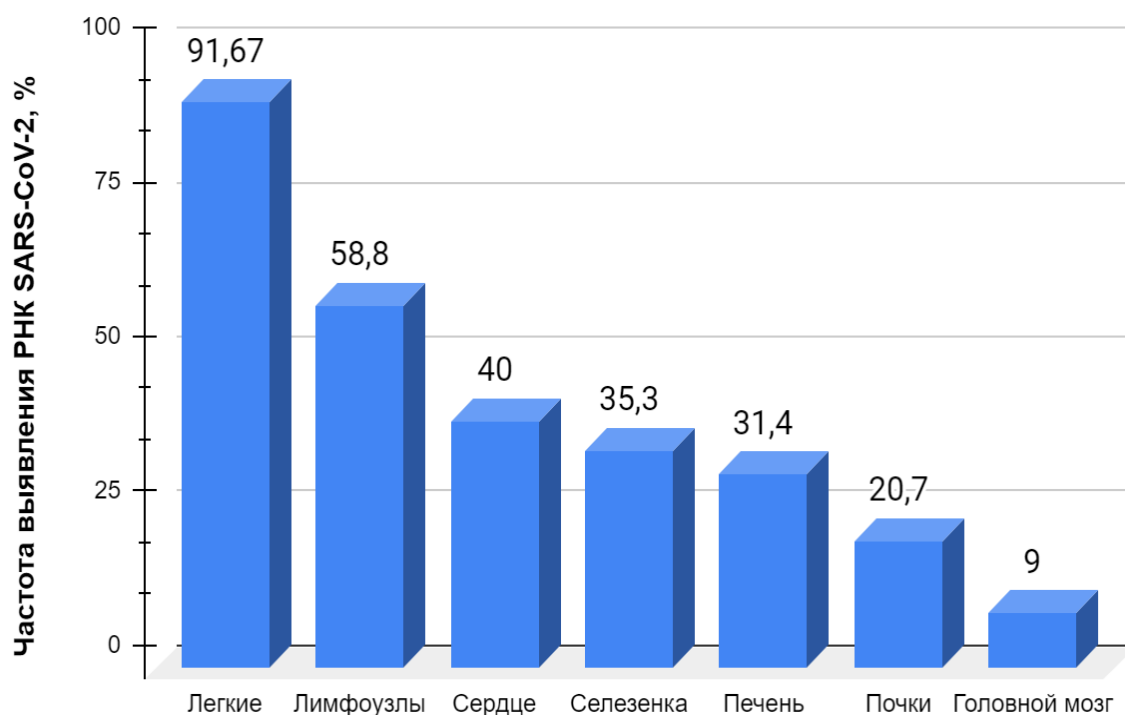


Рисунок 23. Частота выявления РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов.

Ниже в таблице 7 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.

Таблица 7. 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.

Как видно из таблицы 7, 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.

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 $VN \geq 4909$ 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.

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. 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 ОРИТ до летального исхода ($r_s = -0.348$, $p = 0.037$) – пациенты с меньшим временем пребывания в ОРИТ имели более высокие значения уровня ВН SARS-CoV-2 в легких, и наоборот.

Для подтверждения возможной связи между SARS-CoV-2-инфицированностью и повреждением тканей сердца, печени и почек, мы сравнили уровень ВН SARS-CoV-2 в этих тканях и уровень сывороточных биомаркеров, которые представлены в таблице 8.

Таблица 8. Уровень ВН SARS-CoV-2 в сердце, печени и почках и уровень сывороточных биомаркеров 27 пациентов с COVID-19.

#	ВН, сердце	КФК, МЕ/л n=20-200	ВН, печень	АСТ, МЕ/л n=8-33	АЛТ, МЕ/л n=4-36	ЛДГ, МЕ/л n=140-280	ЩФ, МЕ/л n=44-147	ВН, почки	Кр, мкмоль/л n=61.9-114.9
Группа 1. ПНК SARS-CoV-2 не обнаружено									
7	0	485	0	149	121	490	307	-	415
17	0	71,3	0	31,2	17,1	207,4	-	0	114,7
Группа 2. Моноорганный диссеминация SARS-CoV-2									
23	1238	154	0	46	33	323	192	0	194
22	0	-	0	25	11	395	189	0	309
15	0	-	0	26	26	555	162	0	103
20	0	-	0	62,2	42,5	-	-	0	185,3
8	0	775	0	72,5	87,35	836	-	0	96,41
11	0	83	0	978	503	2058	239	0	82
14	0	-	-	58	41	564	-	0	109
Группа 3. Мультиорганный диссеминация SARS-CoV-2									
5	0	1007	70	93	35	-	337	0	228
6	0	656,6	7	33,2	42,6	396,7	-	0	98,7
13	974	290,8	0	47,1	20,5	358,2	-	-	83,6
21	0	197	0	73,9	58,7	637,9	-	0	129,7
1	0	-	0	813	390	-	-	0	296,1
25	0	145,4	0	31	31,7	649,5	-	0	156,2
16	0	-	0	170,5	56,1	-	-	0	104,6
4	1267	722	47	73	73	626	-	52	194
19	0	641,4	0	140,8	81,7	493,3	-	0	283
9	2223	29	0	18	14	-	-	0	75,2
3	3733	-	160	75	-	-	-	0	122
27	0	-	522	35	22	-	-	0	216
18	270	260	0	23	21	289	48	-	89,6
26	1222	495	256	43	18	428	206	878	353
2	761	1327	40	54	13	-	-	126	364,4
12	538	735,4	980	594,6	786,6	902,7	-	-	193,6
24	2418	-	0	16,3	8,6	-	-	1291	137,4
10	6930	609	9770	71	62	767	-	3029	199

Примечание: ВН - вирусная нагрузка SARS-CoV-2, КФК - креатинфосфокиназа, АСТ - аспартатаминотрансфераза, АЛТ - аланинаминотрансфераза, ЛДГ -

лактатдегидрогеназа, ЩФ - щелочная фосфатаза, Кр - креатинин, п - референсные значения.

Как представлено в таблице 8, сравнение значений уровня КФК в сыворотке крови и ВН SARS-CoV-2 в сердце пациентов с COVID-19 показала отсутствие какой-либо зависимости между ними. Наоборот, уровень КФК в сыворотке крови у пациентов с нулевой ВН SARS-CoV-2 в сердце (№5-8, 19) был в 3-5 раз выше нормы (641-1007 МЕ/л), а у пациентов с высокой ВН SARS-CoV-2 (№9, 23) уровень КФК не превышал нормальные значения. Значительное повышение показателей уровня АЛТ и АСТ было характерно как для пациентов с неинфицированной тканью печени (№1,7,8,11,16), так и для пациентов с высокой ВН SARS-CoV-2 в печени (№4,12,19). Отсутствие какой-либо связи также выявлено между значениями уровней ЛДГ, ЩФ и Кр в сыворотке крови и ВН SARS-CoV-2 в исследованных органах наших пациентов. Также, гистологическое исследование тканей сердца, печени и почек с «нулевой» и высокой ВН SARS-CoV-2 не выявило каких-либо отличий в характере патологических изменений.

Прямое секвенирование по Сэнгеру участка гена *Spike*, кодирующего рецептор-связывающий домен S-белка коронавируса и дальнейшая сверка полученных данных с эталонной последовательностью генома SARS-CoV-2 на платформе Nextclade v1.13.1 (<https://clades.nextstrain.org/>) показала, что все выявленные нами изоляты принадлежат к корневному штамму 19A.

Тем не менее, в хроматограммах сиквенса пациента №13 была выявлена коинфекция двумя мутантными вариантами коронавируса: SARS-CoV-2 с.23191С и SARS-CoV-2 с.23191Т. Хроматограммы сиквенса пациента №13 представлены на рисунке 24.

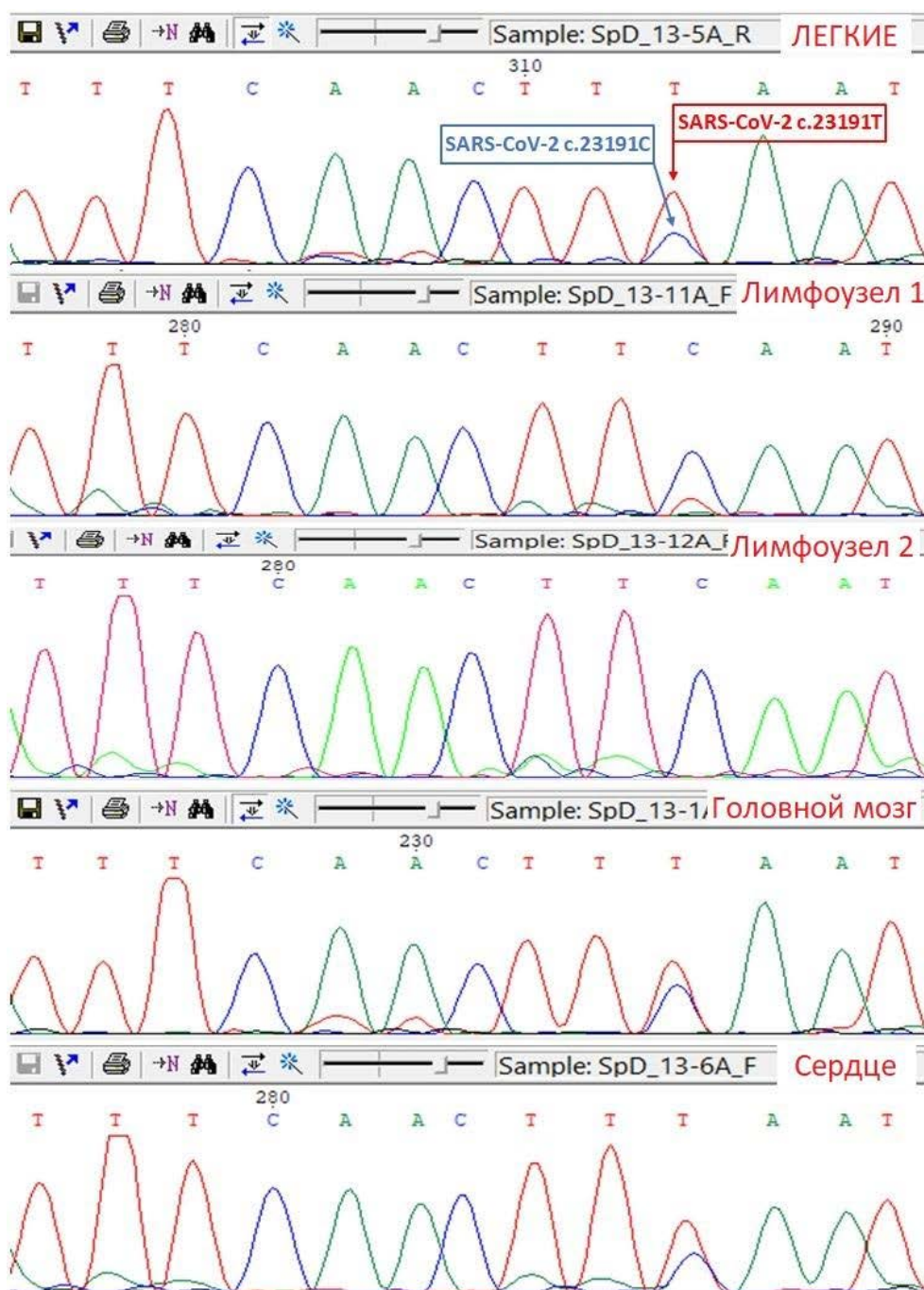


Рисунок 24. Хроматограммы секвенирования по Сэнгеру образцов ткани легких, трахеобронхиальных лимфатических узлов, головного мозга и сердца пациента №13.

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.

Таким образом, разработанный нами новый способ кПЦР РВ позволяет не только детектировать РНК SARS-CoV-2, но и дать точную количественную оценку уровню ВН в тканях различных органов пациентов с COVID-19. Частота выявления и уровень ВН (в скобках) SARS-CoV-2 составляет: в легких - 91,67% (18-250281 копий), в трахеобронхиальных лимфатических узлах - 58,8% (96-11586 копий), в сердце - 40% (197-6930 копий), в селезенке - 35,3% (9-2899 копий), в печени - 31,4% (7-9770 копий), в почках - 20,7% (52-3029 копий), и в головном мозге - 9% (718-2573 копий). Корреляционный анализ показал сильную прямую корреляционную связь между уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких и характером гистопатологических изменений в легких пациентов с COVID-19 - более высокие значения уровня ВН SARS-CoV-2 были характерны для экссудативной фазы ДАП ($r_s=0,846$, $p<0,001$). Экссудативная фаза ДАП и высокий уровень ВН SARS-CoV-2 в легких являются “легочными факторами”, способствующими мультиорганной диссеминации коронавируса SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19.

3.4. Результаты иммуногистохимических исследований

Настоящая глава посвящена результатам ИГХ-детекции коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких и других органов пациентов с COVID-19. В работе использованы первичные МкАТ против S (spike) белка коронавируса SARS-CoV-2 компании «GeneТех» (клон 1A9, кат. №GTX632604), и кроличьи ПкАТ производства «Абсам» (кат. №ab272504).

ИГХ-исследование тканей легких с использованием МкАТ против S-белка SARS-CoV-2 выявило диффузное положительное окрашивание цитоплазмы альвеолоцитов I и II типа (рисунок 25), а также альвеолярных макрофагов и многоядерных уродливых клеток (рисунок 26).

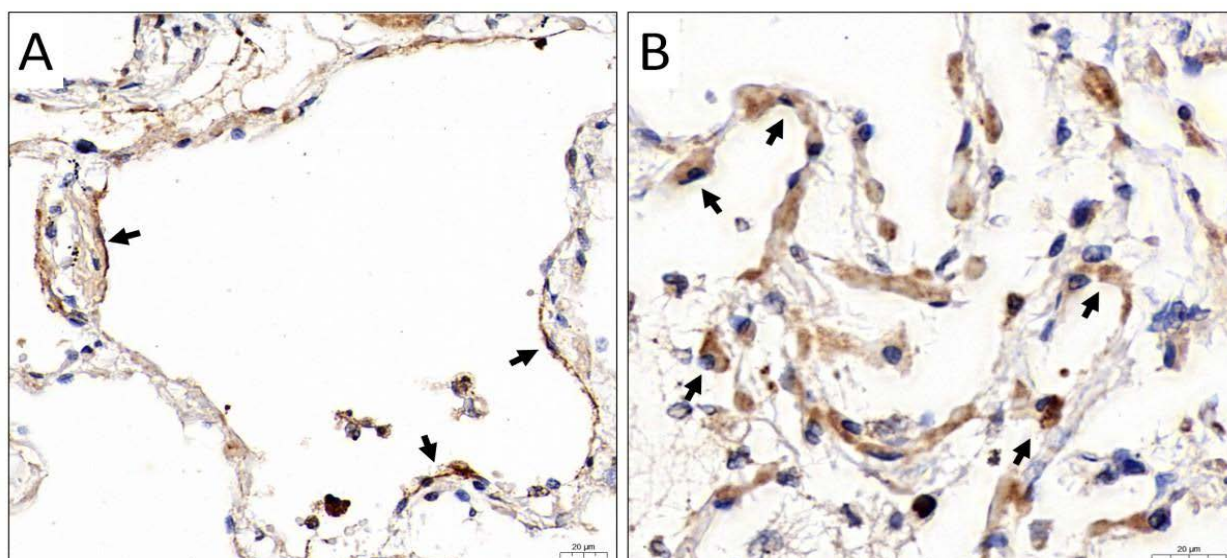


Рисунок 25. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком. А. Яркая положительная реакция в альвеолоцитах I типа с уплощенным ядром и тонкой цитоплазмой, выстилающих полость альвеол (черные стрелки); В. Положительная реакция в альвеолоцитах II типа с округлыми ядрами и толстой цитоплазмой (часть клеток отмечена черными стрелками). Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, x400.

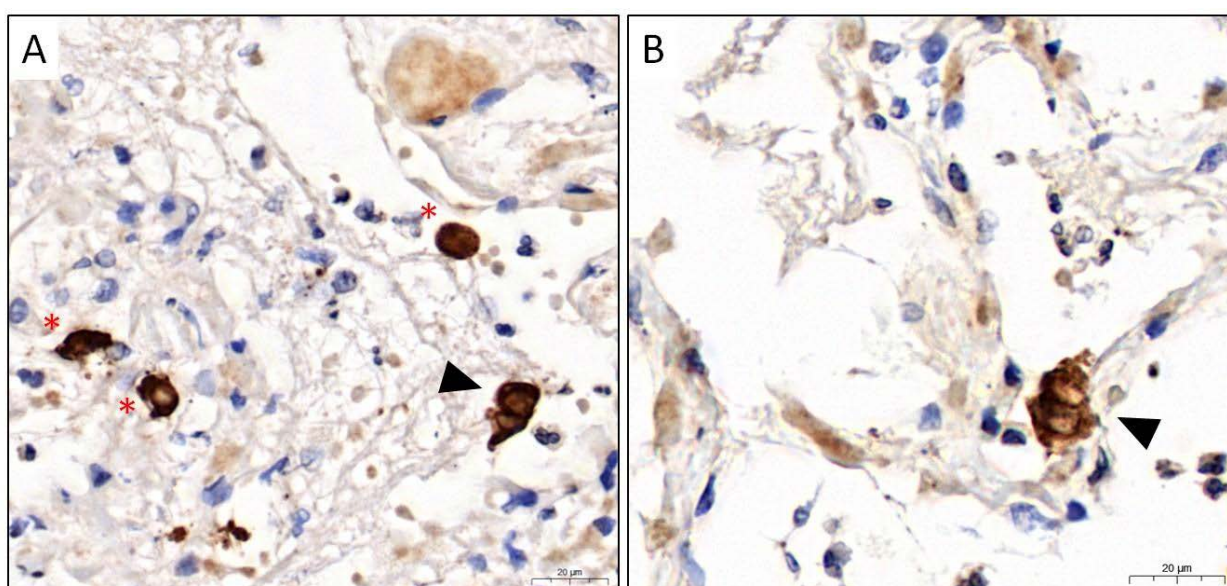


Рисунок 26. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком. А. Яркая положительная реакция в цитоплазме альвеолярных макрофагов (красные звездочки) и многоядерной уродливой клетки (стрелочная головка); В. Яркая положительная реакция в цитоплазме многоядерной уродливой клетки (стрелочная головка). Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, x400.

В образцах легких с признаками острой фазы диффузного альвеолярного повреждения иммунореактивность к анти-Spike антителам определялась в виде мелкогранулярного окрашивания в зонах внутриальвеолярного отека и гиалиновых мембранах, а также в виде яркой положительной реакции в цитоплазме единичных крупных клеток (рисунок 27).

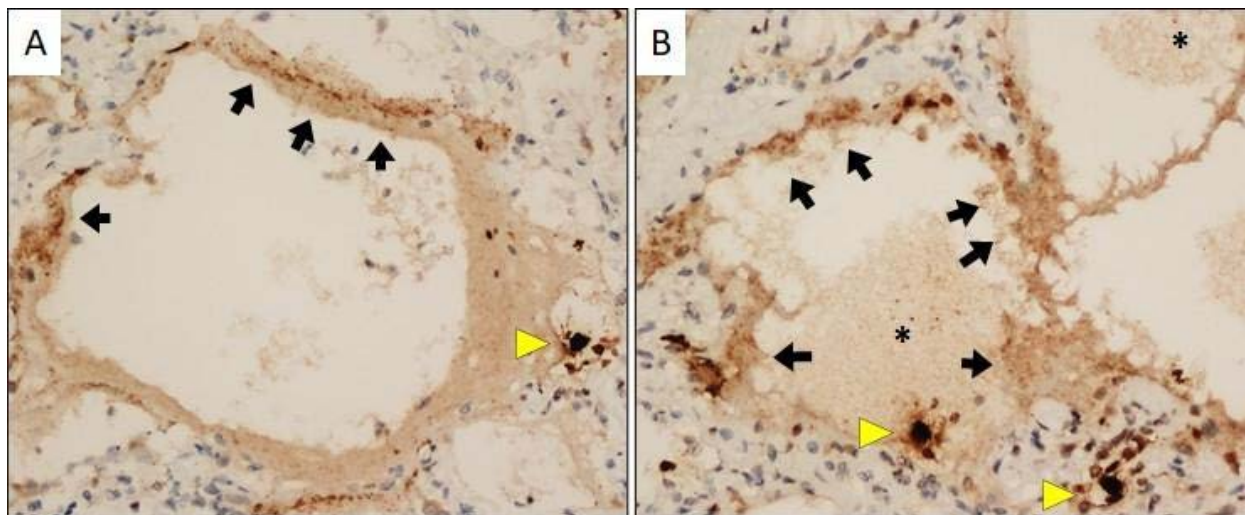


Рисунок 27. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком. А. Мелкогранулярное положительное окрашивание в гиалиновых мембранах (*черные стрелки*) и яркое окрашивание в цитоплазме единичной клетки (*желтая стрелочная головка*); В. Положительное окрашивание в фокусах внутриальвеолярного отека (*звездочка*) и гиалиновых мембранах (*стрелки*), а также яркая положительная реакция в цитоплазме единичных крупных клеток (*желтая стрелочная головка*). Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, x100.

В участках ткани легкого с расширенной и утолщенной альвеолярной перегородкой отмечалась яркая положительная реакция в части интерстициальных клеток и альвеолоцитах (рисунок 28А), что может свидетельствовать о продолжающейся активной вирусной репликации в фазе пролиферации ДАП. Иммунореактивность к анти-S МкАТ также обнаруживалась в единичных клетках частично десквамированного призматического эпителия бронхиол (рисунок 28В).

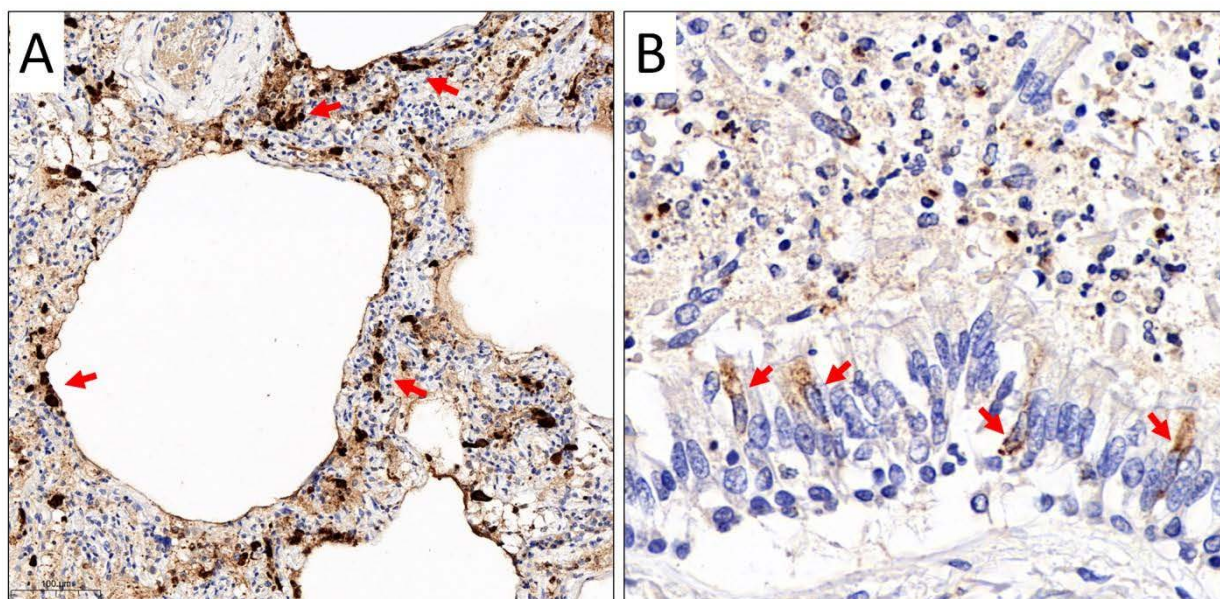


Рисунок 28. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком. А. Яркая положительная реакция в цитоплазме части клеток (красные стрелки) утолщенных межальвеолярных перегородок, х200; В. Слабая положительная реакция в цитоплазме единичных клеток цилиндрического эпителия бронхов (красные стрелки), а также отдельных элементов клеточного детрита, заполнившего просвет бронхов, х400. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера.

В целях определения клеточной тропности нами также было проведено ИГХ-исследование с использованием антител против TTF-1 (характерен для альвеолоцитов II типа), CD163 (маркер альвеолярных макрофагов) и SARS-CoV-2, результаты которого представлены на рисунке 29.

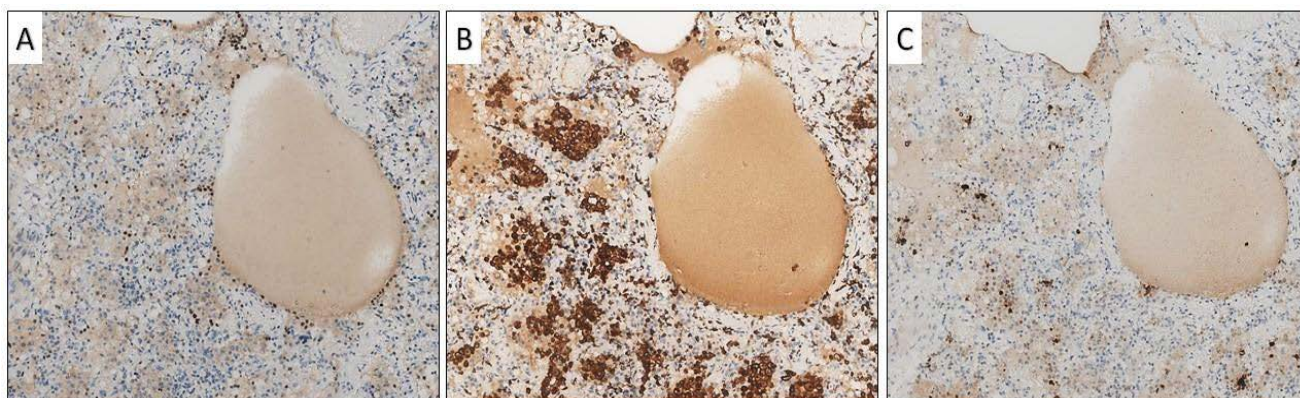


Рисунок 29. ИГХ-исследование ткани легкого с использованием анти-TTF-1 (А), анти-CD163 (В), и анти-SARS-CoV-2 (С) антителами. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, х100.

Как видно из рисунка, клетки, экспрессирующие TTF-1, имеют более диффузное расположение в ткани легкого (рисунок 29А), а CD163-положительные клетки формируют клеточные кластеры (рисунок 29В). Разрозненная положительная реакция к антителам против SARS-CoV-2 в большей степени соответствует фокусам скопления CD163-положительных клеток (рисунок 29С).

При ИГХ-исследовании ткани лимфатических узлов положительная реакция к анти-SARS-CoV-2 антителам была выявлена исключительно в клетках расширенных лимфоидных синусов (субкапсулярных, кортикальных и медуллярных) (рисунок 30).

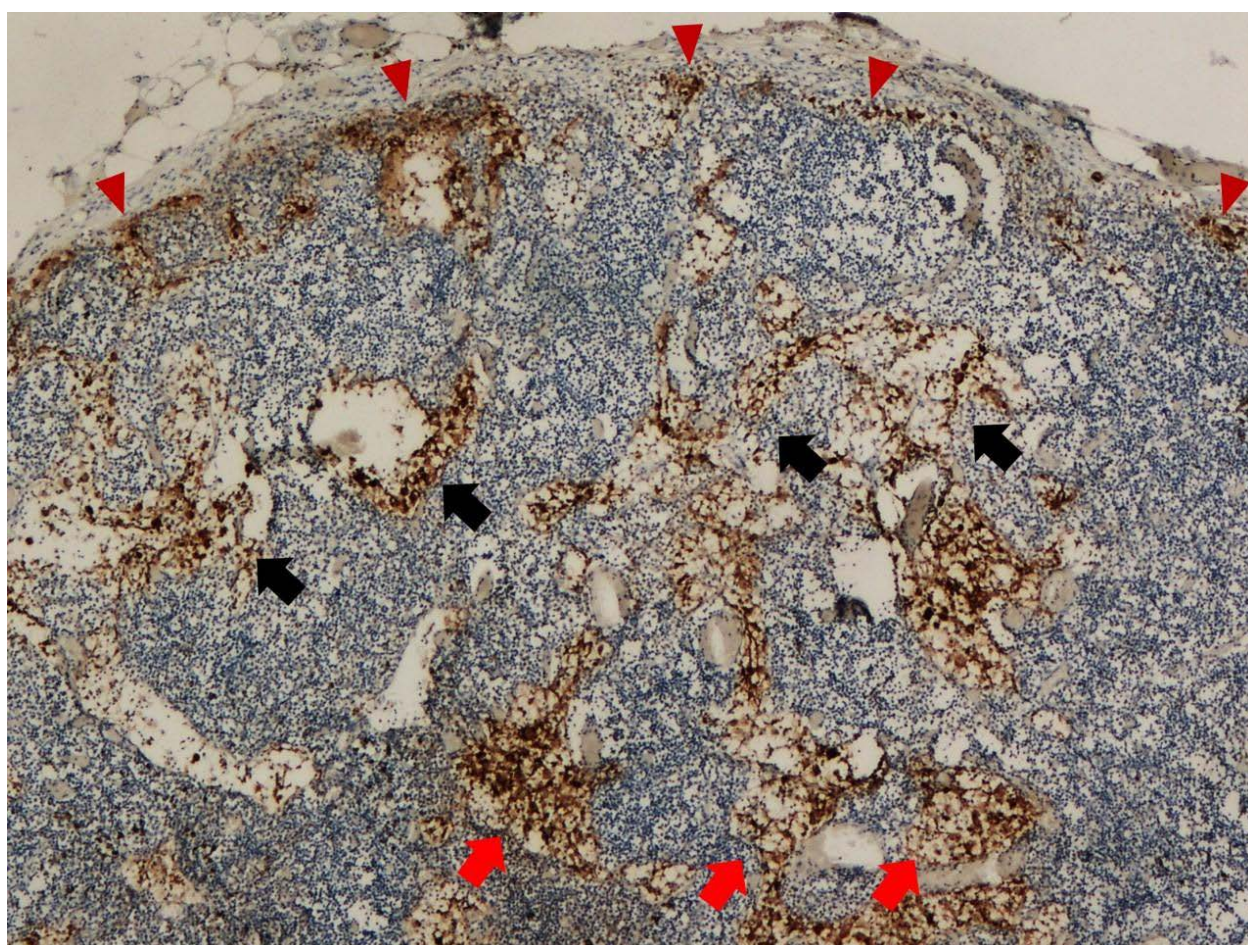


Рисунок 30. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком в лимфатическом узле в клетках субкапсулярных (красная стрелочная головка), кортикальных (черные стрелки) и медуллярных синусов (красные стрелки). Окраска ДАБ-гематоксилином Майера, х40.

Под большим увеличением видно, что иммунореактивность к анти-SARS-CoV-2 антителам проявлялась ярким окрашиванием преимущественно цитоплазмы гиперплазированных синусовых гистиоцитов (рисунок 31).

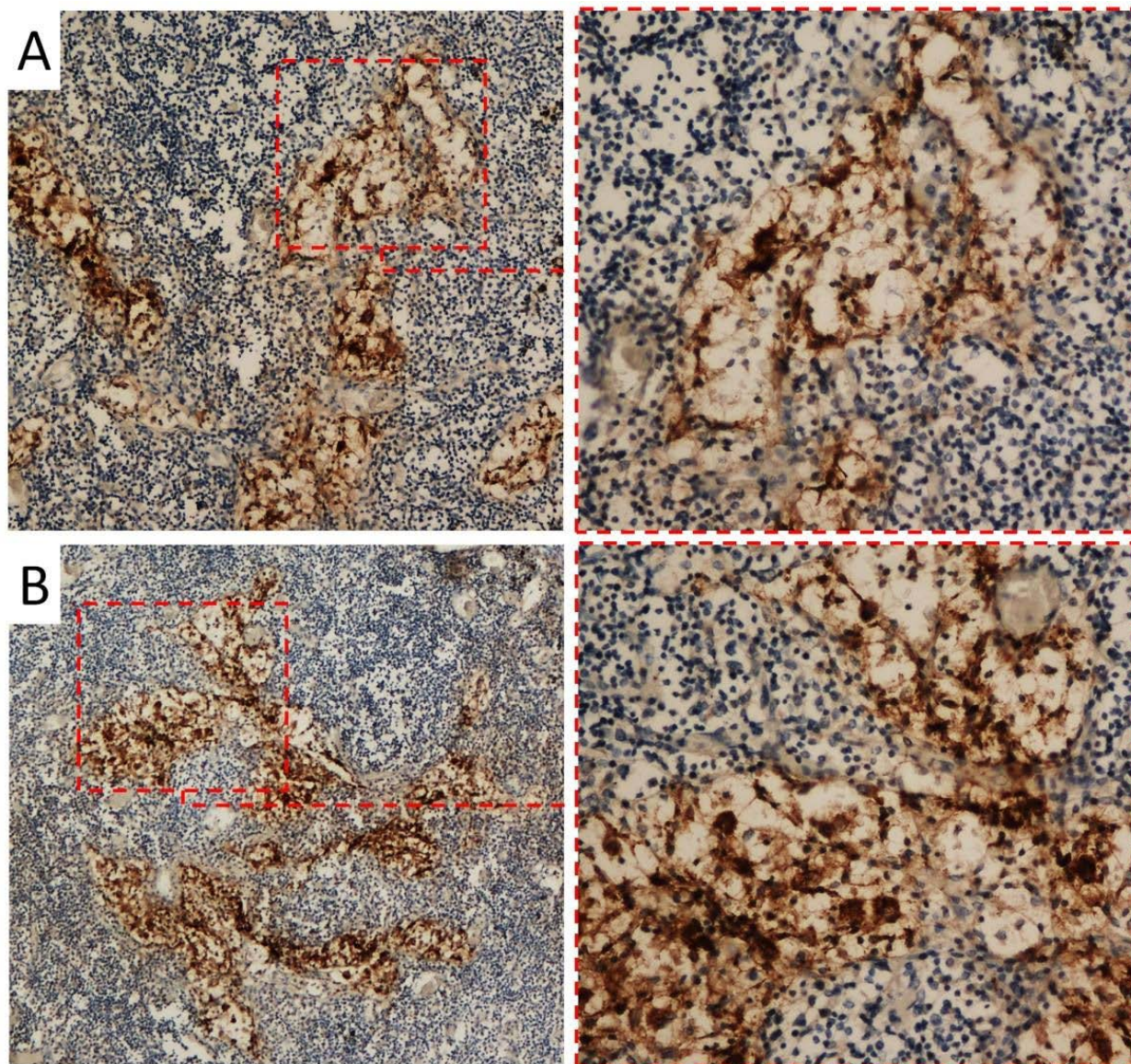


Рисунок 31. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком в лимфатическом узле. А. Положительная реакция в цитоплазме гиперплазированных гистиоцитов кортикальных лимфоидных синусов, x100 и x400 (красная рамка); В. Положительная реакция в цитоплазме гиперплазированных гистиоцитов медуллярных лимфоидных синусов, x100 и x400 (красная рамка). Окраска ДАБ-гематоксилином Майера.

При ИГХ-исследовании тканей селезенки наших пациентов было выявлено положительное окрашивание преимущественно клеток красной пульпы и единичных клеток капсулы селезенки (рисунок 32).

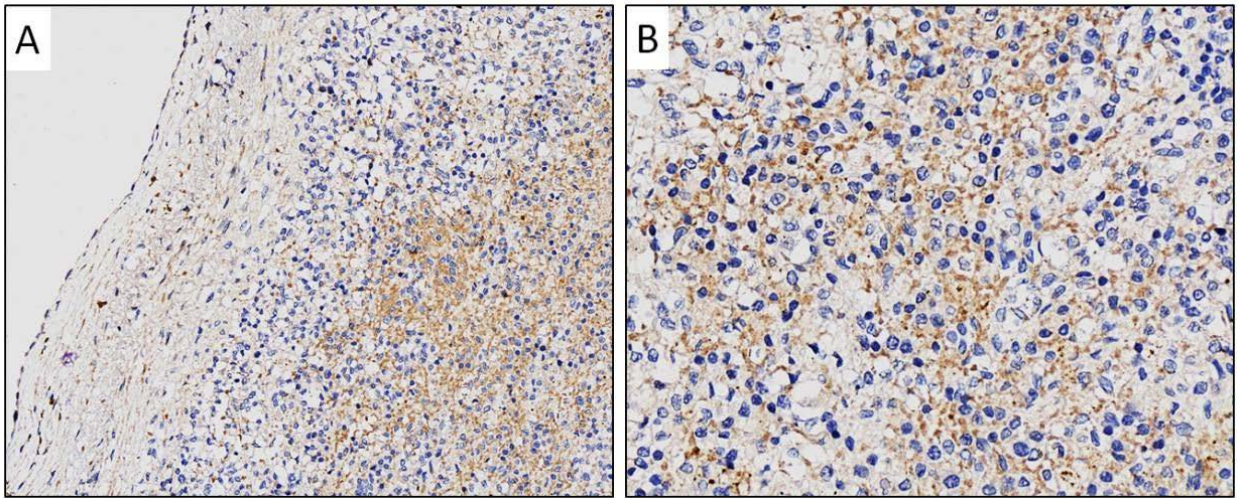


Рисунок 32. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком в селезенке. А. Положительная реакция в единичных клетках капсулы селезенки и клетках пульпарных тяжей Бильрота, х200; В. Положительная реакция в единичных клетках капсулы селезенки и клетках пульпарных тяжей Бильрота, х400. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера.

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 33А), в гладкомышечных клетках стенки сосудов почек (рисунок 33В), в клетках частично некротизированного канальцевого эпителия почек (рисунок 33С,Д). При использовании ПкАТ против S-белка SARS-CoV-2 (Abcam) положительное окрашивание отмечалось в единичных клетках капиллярной сети почечных клубочков (рисунок 33Е).

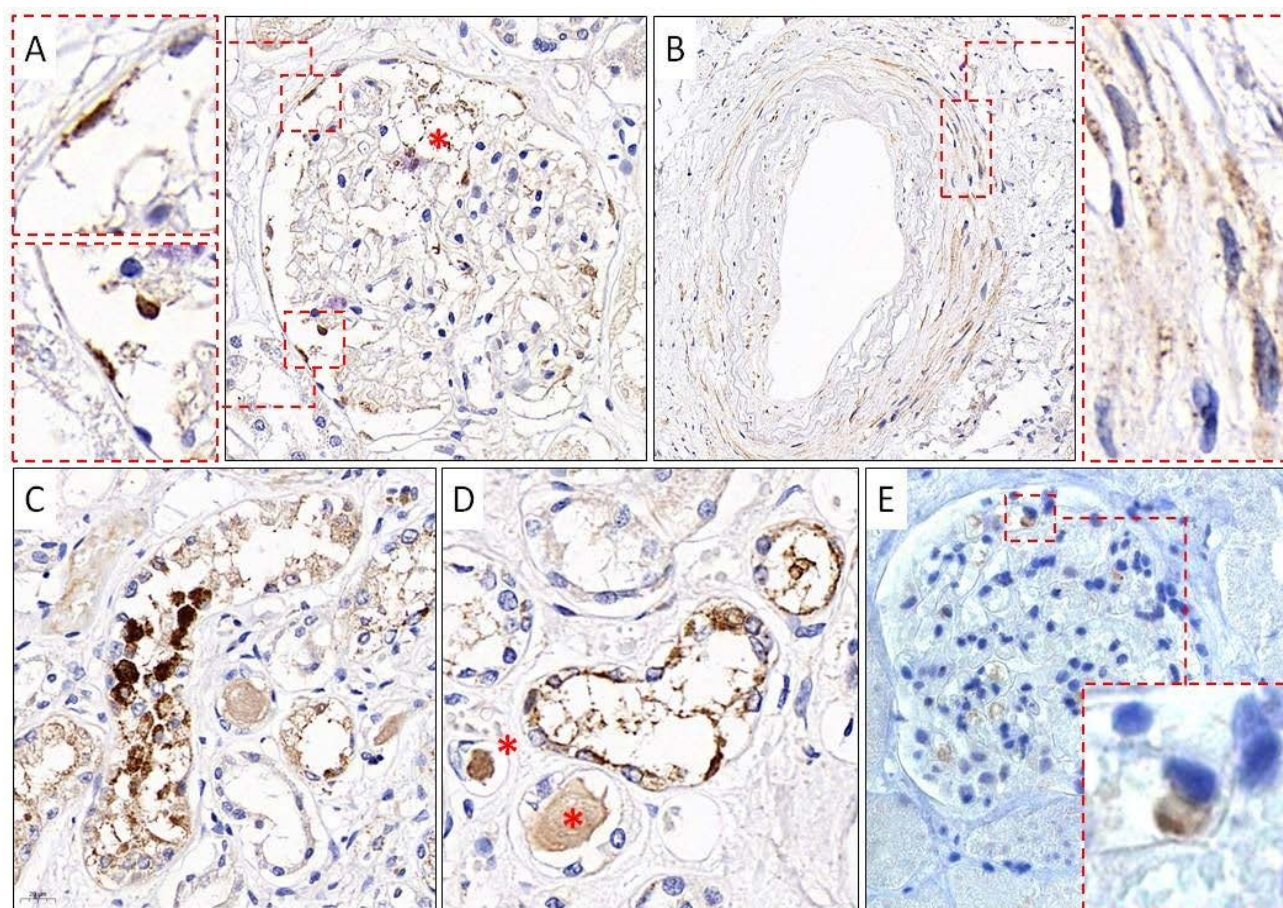


Рисунок 33. Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 в легком в почке. А. SARS-CoV-2-положительное окрашивание эндотелиальных клеток капиллярной сети (*красная звездочка*) и клеток париетального эпителия (*красные рамки*) капсулы почечных клубочков, GTX632604, x400; В. Иммунореактивные гладкомышечные клетки стенки 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.

Таким образом, ИГХ исследование с помощью МкАТ против S-белка SARS-CoV-2 выявило вирусные антигены в цитоплазме различных клеток легких, лимфатических узлов, селезенки и почек, и подкрепляет данные молекулярно-генетического анализа о мультиорганной диссеминации SARS-CoV-2.

3.5. Результаты электронно-микроскопических исследований

Данная глава посвящена результатам трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) тканей легких и других органов с использованием установки ТЭМ JEM 1400 («JEOL», Япония).

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 (рисунок 34).

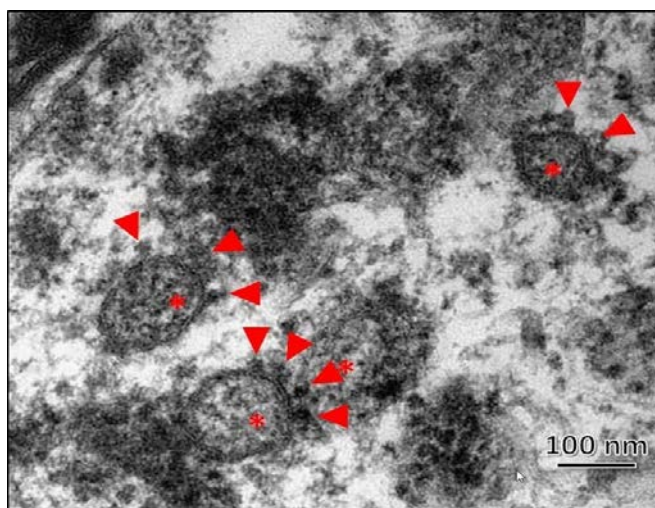


Рисунок 34. Трансмиссионная электронная микрофотография частиц коронавируса SARS-CoV-2. Внутри везикул отмечались коронавирусные частицы сферической формы, средним размером 100 нм, окруженные мембраной с электронно-плотные выростами S-белка (острие стрелки) на поверхности. В просвете частиц визуализируются зернистые структуры нуклеокапсида (звездочки).

Ниже на электронной микрофотографии легочной ткани представлен участок аэрогематического барьера (рисунок 35А), разделяющего внутриальвеолярную полость (IAS) и просвет капилляра базальной мембраной (BM) и эндотелиальной клеткой (EC), в цитоплазме которой были обнаружены везикулы, заполненные коронавирусными частицами (рисунок 35В).

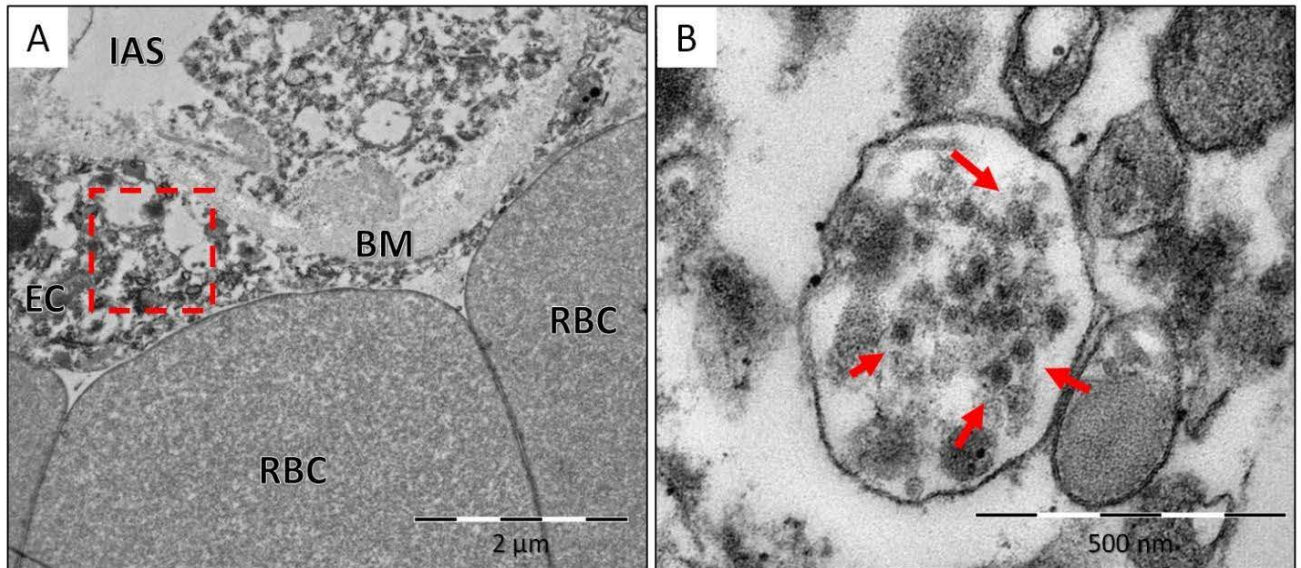


Рисунок 35. Трансмиссионная электронная микрофотография легкого. А. Участок аэрогематического барьера, в котором можно различить часть эндотелиальной клетки (EC) и эритроциты (RBC); в цитоплазме эндотелиальной клетки (красная рамка) была обнаружена везикула, содержащая коронавирусные частицы; В. Везикула была заполнена сферическими коронавирусными частицами (красные стрелки).

Также, частицы SARS-CoV-2 были обнаружены в цитоплазме эндотелиальной клетки в другом участке легочной ткани (рисунок 36).

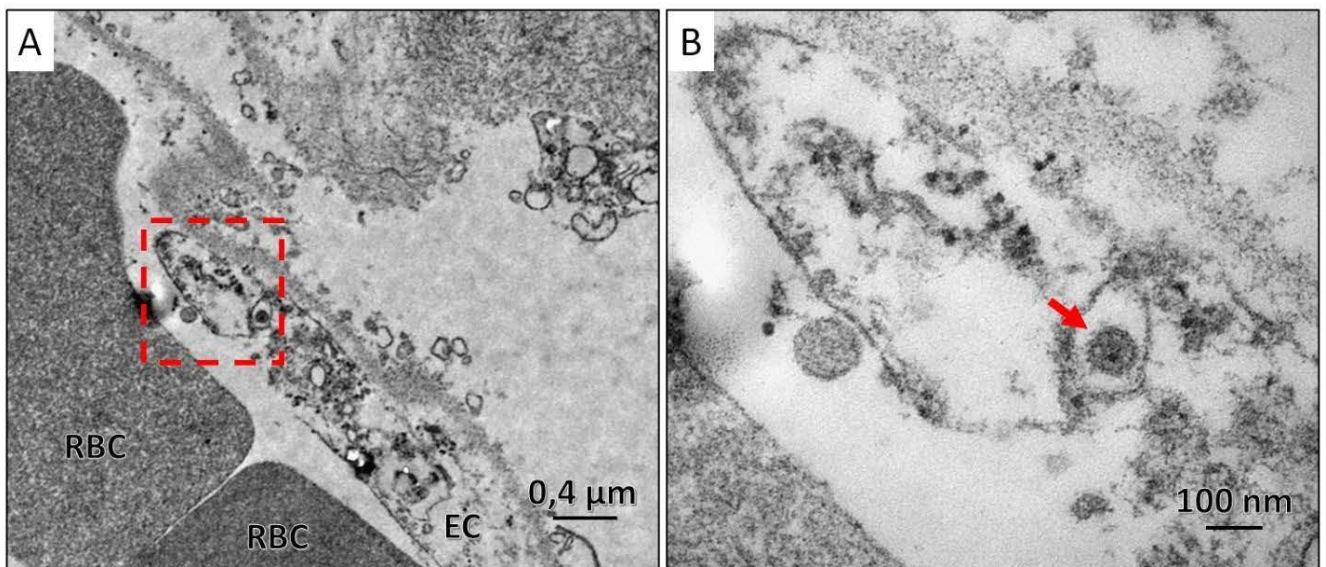


Рисунок 36. Трансмиссионная электронная микрофотография легкого. А. Участок капилляра межальвеолярной перегородки, в котором можно различить часть эндотелиальной клетки (EC) и эритроциты (RBC); в цитоплазме эндотелиальной

клетки (красная рамка) была обнаружена везикула, содержащая коронавирусную частицу; В. Частица коронавируса SARS-CoV-2 (красная стрелка) сферической формы, средним диаметром 100 нм, окруженная мембраной, на поверхности которой имеются электронно-плотные выросты S-белка; в просвете частицы можно видеть зернистые структуры нуклеокапсида.

Кроме того, в ткани легкого SARS-CoV-2 был выявлен в цитоплазме лимфоцита, обнаруженного в просвете капилляра в окружении эритроцитов (рисунок 37А). 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 37В). По периметру везикулы отмечались инвагинации, направленные в просвет везикулы – процесс сборки коронавирусных частиц (рисунок 37С).

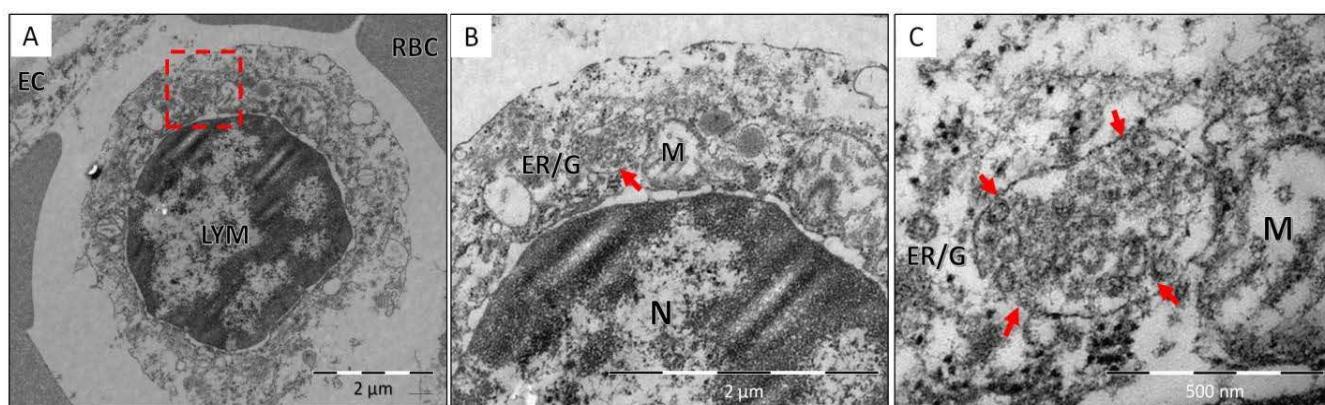


Рисунок 37. Трансмиссионная электронная микрофотография легкого. А. Участок капилляра межальвеолярной перегородки с эндотелиальной выстилкой (EC) и эритроцитами (RBC) и лимфоцитарной клеткой (LYM) в просвете. В цитоплазме лимфоцита выявлена везикула с коронавирусными частицами (красная рамка); В. Везикула 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 гемокapилляру с отчетливой эндотелиальной выстилкой и эритроидными клетками в просвете. В цитоплазме макрофагальной клетки хорошо визуализировались субклеточные структуры, такие как ядро, связанные с гранулярной эндоплазматической сетью и цистернами комплекса Гольджи мультивезикулярные структуры, а также частицы фагоцитированной угольной пыли. Мультивезикулярные структуры были заполнены множественными коронавирусами частицами (рисунок 38).

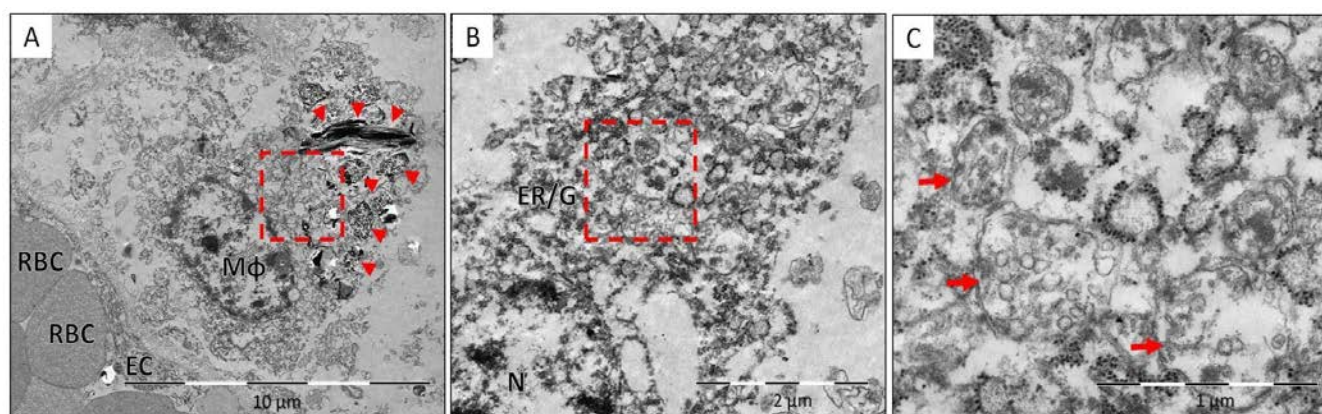


Рисунок 38. Трансмиссионная электронная микрофотография лимфатического узла. А. В лимфатическом узле, в цитоплазме макрофага (Мφ) расположенного перикапиллярно, визуализировались мультивезикулярные структуры (красная рамка) и частицы фагоцитированной угольной пыли (красные стрелочные головки); В. Мультивезикулярные структуры (красная рамка) располагались вблизи ядра (N) и были ассоциированы с эндоплазматическим ретикуломом и цистернами комплекса Гольджи (ER/G); С. При большем увеличении мультивезикулярные структуры заполнены частицами SARS-CoV-2.

При исследовании ткани почек коронавирусные частицы были также выявлены в цитоплазме эндотелиальной клетки капиллярной сети почечного клубочка (рисунок 39).

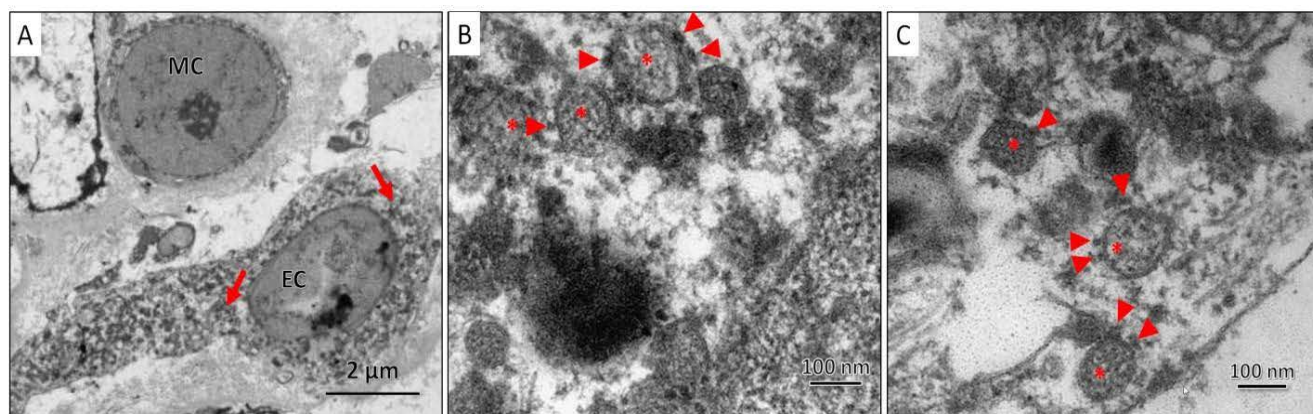


Рисунок 39. Трансмиссионная электронная микрофотография почки. А. Клубочек почки с мезангиальной (МС) и эндотелиальной (ЕС) клетками, в цитоплазме которых ближе к ядру (красные стрелки) обнаружены коронавирусные частицы; В, С. При большом увеличении внутри везикул отмечались коронавирусные частицы сферической 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).

Таким образом, ультраструктурный анализ методом ТЭМ показало внутриклеточную локализацию коронавируса SARS-CoV-2 в цитоплазме эндотелиальных клеток различных органов, что подтверждает данные о важном значении эндотелиальных дисфункций в развитии мультиорганных поражений при COVID-19. Обнаруженные в цитоплазме лимфоцита коронавирусные частицы являются прямым доказательством возможности инфицирования и SARS-CoV-2 опосредованной смерти иммунных клеток, что может пролить свет на патогенез лимфопений при COVID-19.

Глава 4. Обсуждение результатов исследования

Анализ литературных данных о типе и частоте сопутствующих заболеваний у пациентов, умерших от COVID-19, показал, что сердечно-сосудистые заболевания были наиболее частой коморбидной патологией. В частности, артериальная гипертензия отмечалась в 38,6%-90% случаев [Liu M. et al., 2021; Romanova E.S. et al., 2021], что сопоставимо с данными нашего исследования, где АГ была выявлена в 69,1% случаев. Частота выявления заболеваний ЦНС и хронических болезней почек в качестве сопутствующих патологий варьировала в широких пределах - 5,1-20% и 2-11,4%, соответственно [Xie J. et al., 2020; Romanova E.S. et al., 2021; Liu M. et al., 2021], что немного ниже, чем в нашей когорте пациентов - 23,6% и 16,4%, соответственно. Однако, сахарный диабет II типа, выявляемый у 18,3-38,8% пациентов, умерших от COVID-19 [Zhang B. et al., 2020; Bahl A. et al., 2020], в нашей когорте пациентов отмечался чуть реже – в 16,4% случаев. Частота встречаемости онкологических заболеваний (13,6%) и морбидного ожирения (10,9%) среди наших пациентов была в пределах значений, отмеченных в литературе - 7-20% и 11-37% [Li G. et al., 2020; Mikhaleva L.M. et al., 2021; Ma X. et al., 2020; Borczuk A.C. et al., 2020; Romanova E.S. et al., 2021], соответственно.

При анализе причин смерти наших пациентов от COVID-19 ОРДС выступал в качестве непосредственной причины смерти в 55% случаев, что соответствует данным других исследований, в которых ОРДС как причина летального исхода фигурировала в 42,3-90% случаев [Elezkurtaj S. et al., 2021; Zayratyants O.V. et al., 2020]. Частота смертельных исходов от ТЭЛА составляет 1,7-6,7% [Olivas-Martínez A. et al., 2021; Romanova E.S. et al., 2021], что намного меньше, чем в нашей когорте пациентов (19,1%). Частота летальности от сердечно-сосудистой недостаточности и отека головного мозга у наших пациентов составила 17% и 8%, что относительно сопоставимо с данными других исследований, в которых она варьирует в пределах 1,7-15,4% и 0,3-6,67% [Olivas-Martínez A. et al., 2021; Chen T. et al., 2020; Zayratyants O.V. et al., 2020; Romanova E.S. et al., 2021], соответственно. Тем не менее, ПОН

как непосредственная причина смерти, отмечающаяся в 9,2-42% случаев, выявлена нами в 0,9% [Olivas-Martínez A. et al., 2021; Chen T. et al., 2020].

Выявленные различия в структуре и частоте сопутствующих патологий и причин смерти пациентов, умерших от COVID-19, возможно, объясняется различиями в размерах выборок пациентов, отобранных для исследований.

Сравнение результатов наших аутопсийных исследований с литературными данными показало, что частота выявленных нами макроскопических признаков находилась в пределах значений, отмеченных в работах других исследователей. Так, частота обнаружения уплотнений легочной паренхимы составляет 14-100%, изменений цвета легочной паренхимы – 82-100%, отека с увеличением массы легких – 25-100%. Кроме того, в 25-50% наблюдений были описаны участки эмфизематозных расширений, чаще всего выявляемые в передне-верхних отделах легких пациентов, длительно находившихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) [Odilov A.A. et al., 2020; Odilov A.A. et al., 2021; ДЗМ, 2020; Borczuk A.C., 2021]. Описанная нами полярность характера поражений ткани легких, когда задне-базальные отделы диффузно уплотнены, безвоздушны и на разрезе имеют темно-вишневый цвет, а передне-верхние - имеют светло-розовый цвет и нормальную воздушность или эмфизематозно расширены, предположительно, обусловлена длительным пребыванием пациента в лежачем положении на спине, особенно при ИВЛ [Odilov A.A. et al., 2021].

Частота тромбозов легочных артерий, выявленных при аутопсийном исследовании тел наших пациентов, составила 29,1%. Тем не менее, по данным литературы, их частота намного выше, и может достигать 40-58% [Edler C. et al., 2020; Wichmann D. et al., 2020]. В работе Borczuk и соавт. тромбоз крупных сосудов легких наблюдается в 42% случаев, но при этом микротромбы в сосудах легких выявлялись в 84% случаев при аутопсии тел пациентов с COVID-19 [Borczuk A.C. et al., 2020]. ТЭЛА, обнаруженная нами в 19,1% случаев, в работах других исследователей описывается в 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 [Tang N. et al., 2020; Bikdeli B. et al., 2020; Connors J.M. et al., 2020].

О высокой частоте увеличенных внутригрудных лимфатических узлов при аутопсии пациентов, умерших от COVID-19, ранее сообщалось и другими исследователями [Prilutskiy A. et al., 2020; Yan L. et al., 2020]. По результатам компьютерной томографии органов грудной клетки, лимфаденопатия средостения выявляется у 6% всех госпитализированных и у 66% пациентов с тяжелой формой COVID-19 [Bao C. et al., 2020; Shi H. et al., 2020]. Увеличение внутригрудных лимфатических узлов было обнаружено также при аутопсийных исследованиях пациентов, умерших от COVID-19 [Prilutskiy A. et al., 2020; Yan L. et al., 2020].

При гистологических исследованиях легких частота внутриальвеолярной и интерстициальной клеточной инфильтрации и образование гиалиновых мембран составили 54,2% и 64,4% соответственно, что оказалось намного меньше, чем частота, выявленная в нашей когорте (84,5% и 77,3%). Частота выявления гиперемий и капиллярных стазов в легких составила 14,4%, внутриальвеолярный и интерстициальный отек - 54,3%, интраальвеолярные кровоизлияния и микротромбозы сосудов встречались в 24,6% и 28% наблюдений, соответственно [ДЗМ, 2020; Odilov A.A. et al., 2020; Odilov A.A. et al., 2021]. Однако, по данным отдельных исследований частота кровоизлияний в паренхиму легких (от единичных очагов до масштабных диффузных участков) достигает 84,2% [Carsana L. et al., 2020], а микротромбозов - до 72% случаев [Grosse C. et al., 2020; Hanley B. et al., 2020; Rapkiewicz A.V. et al., 2020].

Средняя частота выявления утолщений межальвеолярных перегородок и плоскоклеточной метаплазии составила 65,3% и 37,3%, 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 [Borczuk A.C. et al., 2020; Carsana L. et al., 2020; Grosse C. et al., 2020; Kommoss F.K.F. et al., 2020]. Частота трахеитов и трахеобронхитов с богатой нейтрофильной инфильтрацией слизистой

оболочки составляет 28.6%-47% [Bradley B.T. et al., 2020; Menter T. et al., 2020; Borczuk A.C. et al., 2020].

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 не различимо от ДАП, вызванных другими причинами, за исключением более высокой частоты выявления микротромбозов и тромбозмболий [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; Zabozaev 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 атипичном течении ОРДС при новой коронавирусной инфекции (COVID-19) [Zabozaev F.G. et al., 2020].

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]. Среднее время пребывания в ОРИТ пациентов с моно- и полиорганной диссеминацией SARS-CoV-2 составило 15,8 и 10,8 дней, соответственно.

В нашей когорте пациентов частота диссеминации SARS-CoV-2 в трахеобронхиальные лимфатические узлы составила – 58,8%, сердце – 40%, селезенку – 35,3%, печень – 31,4%, почки – 20,7% и головной мозг – 9%. Для сравнения: 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; Rimmelink M. et al., 2020; Lagana S.M. et al., 2020; Matschke J. et al., 2020].

Мы предполагаем, что высокая частота диссеминаций и уровень ВН SARS-CoV-2 в лимфатические узлы свидетельствует о лимфогематогенном 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].

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]. Кроме того, нами выявлена зависимость между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в легких и временем пребывания пациентов в ОРИТ до летального исхода ($r_s = -0.348$, $p = 0.037$), согласно которой пациенты с

более высокими значениям уровня ВН SARS-CoV-2 в легких имели менее продолжительное время пребывания в ОПИТ, и наоборот.

Опубликован большой объем данных о наличии корреляционной связи между уровнем ВН SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки пациентов в начале болезни и риском тяжелого течения и летального исхода COVID-19 [Magleby R. et al., 2020; Pujadas E. et al., 2020; Rao S.N. et al., 2020]. Однако, в нашей когорте пациентов уровень ВН SARS-CoV-2 в легких колебался от нуля до 250281 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1 и не было выявлено какой-либо связи между уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких и смертью наших пациентов с COVID-19.

Согласно данным литературы, при поражении тканей сердца, печени и почек наблюдается повышение уровня креатинфосфокиназа (КФК), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и креатинина (Кр) в сыворотке крови пациентов с COVID-19. Однако, при сравнении значений уровней КФК, ЛДГ, АСТ, АЛТ и Кр в сыворотке крови и уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях сердца, печени и почек нами не было выявлено какой-либо зависимости между этими двумя показателями. По данным Chornenkuu и соавт., у большинства пациентов, умерших от COVID-19 с высокими значениями трансаминаз и гистопатологическими признаками гепатита, РНК SARS-CoV-2 выявляется в менее чем половине случаев [Chornenkuu Y. et al., 2021]. Также, согласно данным Lagana и соавт., позитивность ПЦР не была достоверно связана с повышением АСТ/АЛТ [Lagana S.M. et al., 2020]. Отсутствие связи между уровнем ВН SARS-CoV-2 и развитием органной дисфункции у пациентов с COVID-19 также ранее были описаны и другими авторами [Mokhtari T. et al., 2020; Deinhardt-Emmer S. et al., 2021]. По их мнению, прямое воздействие коронавируса SARS-CoV-2 в ткани жизненно важных органов ограничено во времени и наблюдается только в начале болезни, а далее процесс воспаления поддерживается другими механизмами [Mokhtari T. et al., 2020; El Jamal S.M. et al., 2020]. При гистологическом исследовании SARS-CoV-2-инфицированных тканей были выявлены только

неспецифические патоморфологические изменения, а высокие уровни ВН SARS-CoV-2 были выявлены даже в тканях без гистопатологических признаков повреждения [Remmelink M. et al., 2020; Deinhardt-Emmer S. et al., 2021].

В выявленном нами случае коинфекции, варианты SARS-CoV-2 с.23191С и SARS-CoV-2 с.23191Т характеризуются идентичной аминокислотную структуру S-белка, так как мутация SARS-CoV-2 с.23191С/Т является синонимичной. Здесь, перекрестная контаминация исключается, так как это единственный случай выявления SARS-CoV-2 с.23191Т в нашей лаборатории. 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].

Использованный нами анти-S мкАт (S2) SARS-CoV/SARS-CoV-2 антитела (кат.№ GTX632604 (1A9) компании "GeneTex" (США) ранее были апробированы в клеточных культурах и тканях различных органов пациентов с COVID-19 [1,2]. При сравнительном анализе анти-S (1A9) мкАт ("GeneTex" США) с анти-S мкАт (S1) ("Sino Biological", КНР) и анти-S мкАт ("Abcam", США) имела лучшую чувствительность и специфичность при обнаружении Spike белка коронавируса SARS-CoV2 [Szabolcs M. et al., 2021; Carossino M. et al., 2020].

При ИГХ исследование тканей легких у наших пациентов иммунореактивность к анти-S (1A9) мкАт выявлена в цитоплазме альвеолоцитов I и II типа, альвеолярных макрофагов и в клетках бронхиолярного эпителия. Наши результаты созвучны с данными других ИГХ исследований по выявлению антигенов коронавируса SARS-CoV-2 легочной ткани [Massoth L.R. et al., 2021; Roden A.C. et al., 2021; Hirschbühl K. et al., 2021]. Обнаруженная нами иммунореактивность к антигенам в фокусах внутриальвеолярного отека и гиалиновых мембранах, также подтверждается результатами подобных исследований [Massoth L.R. et al., 2021; Barisione E. et al., 2021]. Согласно данным литературы, выявленная нами многоядерная уродливая 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, нежели SARS-CoV [Bussani R. et al., 2020]. Наши результаты ИГХ исследований с использованием антител против SARS-CoV-2, TTF-1 и CD163 на серийных срезах одного участка ткани легкого, показало преимущественную колокализацию антигенов SARS-CoV-2 с CD163 положительными альвеолярными макрофагами. Несмотря на то, что было множество сообщений об обнаружении антигенов SARS-CoV-2 в тканевых макрофагах, все еще остается открытым вопрос, является ли это отражением продуктивной инфекции или результатом фагоцитоза инфицированных вирусами клеточного детрита [Merad M. et al., 2020]. По данным литературы иммунореактивность к анти-SARS-CoV-2 антителам в легких была характерна только для острой фазы ДАП [Sauter J.L. et al., 2020; Ray A. et al., 2021] и выявлялась в цитоплазме альвеолоцитов I и II типа, альвеолярных макрофагов, в фокусах внутриальвеолярного отека и гиалиновых мембранах [Massoth L.R. et al., 2021; Adachi T., et al., 2020; Roden A.C. et al., 2021]. Тем не менее, нам удалось выявить антигены SARS-CoV-2 при ИГХ исследовании ткани легкого в пролиферативную фазу ДАП, в клетках межальвеолярных перегородок, утолщенных за счет пролиферации альвеолоцитов II типа и гиперплазии фибробластов.

При ИГХ исследовании образцов ткани лимфатических узлов иммунореактивность к анти-SARS-CoV-2 антителам была выявлена в цитоплазме гиперплазированных синусовых гистиоцитов. Наши результаты оказались схожими с 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].

При ИГХ исследование тканей селезенки положительное окрашивание с анти-S (1A9) мкАт выявлена преимущественно в клетках красной пульпы и единичных клетках капсулы. Однако, в доступной литературе отсутствуют сведения о результатах ИГХ детекции SARS-CoV-2 в тканях селезенки.

Иммунореактивность к анти-S SARS-CoV-2 мкАт (GeneTex) также выявлена в клетках канальцевого эпителия почек эндотелиальных клетках капиллярной сети, в клетках париетального эпителия капсулы почечных клубочков, в гладкомышечных клетках стенки сосудов почек и в клетках частично некротизированного канальцевого эпителия. При использовании поликлональных антител против S-белка SARS-CoV-2 (Abcam) положительное окрашивание отмечалось в единичных клетках капиллярной сети почечных клубочков (Рис. 9Е). Полученные нами данные по ИГХ исследований с использованием анти Spike антител, существенно дополняет результаты других исследований [Bradley B.T. et al., 2020; Su H. et al., 2020; Pérez A. et al., 2021].

Таким образом, ИГХ исследование с использованием анти-S (1A9) мкАт компании "GeneTex" (США) и поликлональных кроличьих антител против S-белка SARS-CoV-2 «Abcam» (Великобритания) является эффективным способом детекция коронавируса SARS-CoV-2 в клетках и тканях различных органов пациентов с COVID-19.

При ИГХ исследовании ткани легких, нам впервые удалось выявить иммунореактивность к анти-SARS-Cov-2 антителам в пролиферативную фазу ДАП, а именно в цитоплазме пролиферирующих клеток утолщенных межальвеолярных перегородок. При исследовании ткани селезенки нам также удалось впервые обнаружить положительную реакцию к анти-S мкАт в клетках красной пульпы и единичных клетках капсулы. В доступной литературе отсутствуют сведения о результатах ИГХ-детекции SARS-CoV-2 в тканях селезенки.

Обнаруженная нами многоядерная уродливая клетка с яркой положительной реакцией цитоплазмы на анти-Spike антитела является отличительным цитопатическим признаком, характерным для SARS-CoV-2 инфекции.

Исследование с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (в диапазоне увеличений от 5000 до 40000) показало, что ультраструктурная анатомия в исследованных нами тканях имела хорошую сохранность. Из структурных компонентов в исследованных тканях, в легких хорошо визуализировались участок

аэрогематического барьера со всеми участвующими в ней структурными элементами, а также участок гемокапилляра, выстланного эндотелиальной клеткой и содержащий в просвете эритроциты и лимфоциты. В ткани лимфатических узлов при ТЭМ хорошо дифференцировались тканевые макрофаги с частицами фагоцитированной угольной пыли, характерными для антракоза лимфатических узлов, клеточные компоненты гемокапилляра (эндотелиальная выстилка и эритроциты в просвете). В почках удалось визуализировать участок почечных клубочков с мезангиальной и эндотелиальной клетками.

В электронных микрофотографиях, полученных при большом увеличении отчетливо были видны различные субклеточные структуры, такие как ядро клетки, митохондрии, шероховатая эндоплазматическая сеть, цистерны комплекса Гольджи, различные включения (частицы угольной пыли) и др. Межклеточный матрикс был неоднородный и в нем хорошо визуализировались коллагеновые фибриллы разного диаметра.

Ультраструктурная анатомия коронавируса SARS-CoV-2 характеризуется сферической формой и диаметром частиц в 80-130 нм. Коронавирусные частицы окружены мембраной, покрытой снаружи электронно-плотными выростами, представляющими собой S-белки, а внутри заполнены электронно-плотными зернистыми структурами – нуклеокапсид. Частицы SARS-CoV-2 в тканях встречаются как по отдельности, так и в виде кластеров внутри цитоплазматических везикул с электронно-светлым, почти прозрачным гомогенным содержимым [Dittmayer C. et al., 2020; Turoňová B. et al., 2020; Wang Y. et al., 2020].

При ТЭМ исследование ткани легких коронавирусные частицы в большинстве случаев были выявлены в эндотелиальных клетках, что также подтверждается результатами различных исследований, где частицы SARS-CoV-2 были выявлены в эндотелиальных клетках различных органов [Ackermann M. et al., 2020; Stahl K. et al., 2020; Varga Z. et al., 2020]. ТЭМ визуализация частиц SARS-CoV-2 в эндотелиальных клетках сосудов во многих исследованиях может косвенно подтвердить гипотезу о ключевом значении эндотелиальных дисфункций

в развитии мультиорганной недостаточности, являющейся 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]. Нам впервые удалось представить ТЭМ доказательства возможности прямого инфицирования лимфоцита коронавирусом SARS-CoV-2 в капилляре легкого пациента, умершего с COVID-19 [Abdullaev A. et al., 2021].

Обнаруженные при ТЭМ лимфатических узлов в цитоплазме макрофагальной клетки частицы SARS-CoV-2 дополняют результаты более ранних работ, визуализирующих коронавирусные частицы в цитоплазме клеток трахеобронхиальных лимфатических узлов [Xiang Q. et al., 2021]. Тем не менее, авторам этих исследований не удалось идентифицировать тип инфицированной клетки.

При ТЭМ исследовании ткани почек частицы SARS-CoV-2 были выявлены в цитоплазме эндотелиальной клетки капиллярной сети почечных клубочков, что дополняет результаты других 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].

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

Однако, обнаружение вируса на аутопсийном материале чрезвычайно сложно, требует много времени и успешно только в исключительных случаях и в руках универсальных специалистов, обладающих не только техникой выполнения электронной микроскопии, но и знаниями по ультраструктурной патологии тканей и вирусологии.

Полученные нами результаты ТЭМ исследований ткани легких, почек и трахеобронхиальных лимфатических узлов подтверждают и дополняют результаты ранее опубликованных работ.

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 сокращений и условных обозначений

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

Список литературы

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 12 (21.09.2021)» // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2021. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/058/075/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V12.pdf.
2. Вступительное слово Генерального директора на пресс брифинге по COVID-19 11 марта 2020 г. // Всемирная организация здравоохранения. – 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
3. Патологическая анатомия COVID-19. Атлас // Департамент здравоохранения города Москвы. – 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/ru-RU/patanatomiya_covid19_fullv2_compressed.pdf.
4. Постановление Главного санитарного врача Российской Федерации от 22 мая 2020 г. № 15 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» // Главный санитарный врач Российской Федерации. – 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/0001202005270006.pdf>.
5. Постановление Правительства РФ от 31 января 2020 г. № 66 «О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих» // Правительство Российской Федерации. – 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://static.government.ru/media/files/z6dggqPV4sFVFuBxysVu1fHai9rDhJlg7.pdf>.
6. Abdullaev, A. 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. Abdullaev, A. Odilov, M. Ershler, A. Volkov, T. Lipina, T. Gasanova, Y. Lebedin, I. Babichenko, A. Sudarikov // Viruses. – 2021. – Vol. 13, № 7. – P. 1410.

7. Abdulrahman, A. COVID-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study / A. Abdulrahman, S.I. Mallah, M. Alqahtani // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 688.
8. Achua, J.K. Histopathology and Ultrastructural Findings of Fatal COVID-19 Infections on Testis / J.K. Achua, K.Y. Chu, E. Ibrahim, K. Khodamoradi, K.S. Delma, O.A. Iakymenko, O.N. Kryvenko, H. Arora, R. Ramasamy // *The World Journal of Men's Health*. – 2021. – Vol. 39, № 1. – P. 65.
9. Ackermann, M. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 / M. Ackermann, S.E. Verleden, M. Kuehnel, A. Haverich, T. Welte, F. Laenger, A. Vanstapel, C. Werlein, H. Stark, A. Tzankov, W.W. Li, V.W. Li, S.J. Mentzer, D. Jonigk // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 2. – P. 120–128.
10. Adachi, T. Clinicopathologic and Immunohistochemical Findings from Autopsy of Patient with COVID-19, Japan / T. Adachi, J.-M. Chong, N. Nakajima, M. Sano, J. Yamazaki, I. Miyamoto, H. Nishioka, H. Akita, Y. Sato, M. Kataoka, H. Katano, M. Tobiume, T. Sekizuka, K. Itokawa, M. Kuroda, T. Suzuki // *Emerging Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26, № 9. – P. 2157–2161.
11. Algarroba, G.N. Visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy / G.N. Algarroba, P. Rekawek, S.A. Vahanian, P. Khullar, T. Palaia, M.R. Peltier, M.R. Chavez, A.M. Vintzileos // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 223, № 2. – P. 275–278.
12. Almeida, J.D. A CLASSIFICATION OF VIRUS PARTICLES BASED ON MORPHOLOGY / J.D. Almeida // *Canadian Medical Association Journal*. – 1963. – Vol. 89, – P. 787–798.
13. Almeida, J.D. The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture / J.D. Almeida, D.A.J. Tyrrell // *Journal of General Virology*. – 1967. – Vol. 1, № 2. – P. 175–178.
14. Aquino-Jarquín, G. The Raw Cycle Threshold Values From Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction Detection Are Not Viral Load Quantitation Units / G. Aquino-Jarquín // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 72, № 8. – P. 1489–1490.

15. Arya, R. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins / R. Arya, S. Kumari, B. Pandey, H. Mistry, S.C. Bihani, A. Das, V. Prashar, G.D. Gupta, L. Panicker, M. Kumar // *Journal of Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 433, № 2. – P. 166725.
16. Astuti, I. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response / I. Astuti, Ysrafil // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. – 2020. – Vol. 14, № 4. – P. 407–412.
17. Bahl, A. Early predictors of in-hospital mortality in patients with COVID-19 in a large American cohort / A. Bahl, M.N. Van Baalen, L. Ortiz, N.-W. Chen, C. Todd, M. Milad, A. Yang, J. Tang, M. Nygren, L. Qu // *Internal and Emergency Medicine*. – 2020. – Vol. 15, № 8. – P. 1485–1499.
18. Bao, C. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) CT Findings: A Systematic Review and Meta-analysis / C. Bao, X. Liu, H. Zhang, Y. Li, J. Liu // *Journal of the American College of Radiology*. – 2020. – Vol. 17, № 6. – P. 701–709.
19. Barisione, E. Fibrotic progression and radiologic correlation in matched lung samples from COVID-19 post-mortems / E. Barisione, F. Grillo, L. Ball, R. Bianchi, M. Grosso, P. Morbini, P. Pelosi, N.A. Patroniti, A. De Lucia, G. Orengo, A. Gratarola, M. Verda, G. Cittadini, L. Mastracci, R. Fiocca // *Virchows Archiv*. – 2021. – Vol. 478, № 3. – P. 471–485.
20. Barreto-Vieira, D.F. Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells / D.F. Barreto-Vieira, M.A.N. da Silva, C.C. Garcia, M.D. Miranda, A. da R. Matos, B.C. Caetano, P.C. Resende, F.C. Motta, M.M. Siqueira, W. Girard-Dias, B.S. Archanjo, O.M. Barth // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2021. – Vol. 116, – P. E200443.
21. Barton, L.M. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA / L.M. Barton, E.J. Duval, E. Stroberg, S. Ghosh, S. Mukhopadhyay // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2020. – Vol. 153, № 6. – P. 725–733.
22. Best Rocha, A. Detection of SARS-CoV-2 in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using commercially available reagents / A. Best Rocha, E. Stroberg, L.M. Barton, E.J. Duval, S. Mukhopadhyay, N. Yarid, T. Caza, J.D. Wilson, D.J. Kenan, M. Kuperman, S.G. Sharma, C.P. Larsen // *Laboratory Investigation*. – 2020. – Vol. 100, № 11. – P. 1485–1489.

23. Biguenet, A. SARS-CoV-2 respiratory viral loads and association with clinical and biological features / A. Biguenet, K. Bouiller, S. Marty-Quinternet, A. Brunel, C. Chirouze, Q. Lepiller // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, № 3. – P. 1761–1765.
24. Bikdeli, B. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up / B. Bikdeli, M.V. Madhavan, D. Jimenez, T. Chuich, I. Dreyfus, E. Driggin, C.D. Nigoghossian, W. Ageno, M. Madjid, Y. Guo, L.V. Tang, Y. Hu, J. Giri, M. Cushman, I. Quéré, E.P. Dimakakos, C.M. Gibson, G. Lippi, E.J. Favaloro, J. Fareed, J.A. Caprini, A.J. Tafur, J.R. Burton, D.P. Francese, E.Y. Wang, A. Falanga, C. McLintock, B.J. Hunt, A.C. Spyropoulos, G.D. Barnes, J.W. Eikelboom, I. Weinberg, S. Schulman, M. Carrier, G. Piazza, J.A. Beckman, P.G. Steg, G.W. Stone, S. Rosenkranz, S.Z. Goldhaber, S.A. Parikh, M. Monreal, H.M. Krumholz, S.V. Konstantinides, J.I. Weitz, G.Y.H. Lip // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2020. – Vol. 75, № 23. – P. 2950–2973.
25. Borczuk, A.C. Pulmonary pathology of COVID-19: a review of autopsy studies / A.C. Borczuk // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2021. – Vol. 27, № 3. – P. 184–192.
26. Borczuk, A.C. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City / A.C. Borczuk, S.P. Salvatore, S.V. Seshan, S.S. Patel, J.B. Bussel, M. Mostyka, S. Elsoukkary, B. He, C. Del Vecchio, F. Fortarezza, F. Pezzuto, P. Navalesi, A. Crisanti, M.E. Fowkes, C.H. Bryce, F. Calabrese, M.B. Beasley // *Modern Pathology*. – 2020. – Vol. 33, № 11. – P. 2156–2168.
27. Bradley, B.T. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series / B.T. Bradley, H. Maioli, R. Johnston, I. Chaudhry, S.L. Fink, H. Xu, B. Najafian, G. Deutsch, J.M. Lacy, T. Williams, N. Yarid, D.A. Marshall // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 396, № 10247. – P. 320–332.
28. Buchrieser, J. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells / J. Buchrieser, J. Dufloo, M. Hubert, B. Monel, D. Planas, M.M. Rajah, C. Planchais, F. Porrot, F. Guivel-Benhassine, S. Van der Werf, N. Casartelli, H. Mouquet, T. Bruel, O. Schwartz // *The EMBO Journal*. – 2020. – Vol. 39, № 23.

29. Buja, L.M. The emerging spectrum of cardiopulmonary pathology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19): Report of 3 autopsies from Houston, Texas, and review of autopsy findings from other United States cities / L.M. Buja, D.A. Wolf, B. Zhao, B. Akkanti, M. McDonald, L. Lelenwa, N. Reilly, G. Ottaviani, M.T. Elghetany, D.O. Trujillo, G.M. Aisenberg, M. Madjid, B. Kar // *Cardiovascular Pathology*. – 2020. – Vol. 48, – P. 107233.
30. Bullock, H.A. Difficulties in Differentiating Coronaviruses from Subcellular Structures in Human Tissues by Electron Microscopy / H.A. Bullock, C.S. Goldsmith, S.R. Zaki, R.B. Martines, S.E. Miller // *Emerging Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 27, № 4. – P. 1023–1031.
31. Bussani, R. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology / R. Bussani, E. Schneider, L. Zentilin, C. Collesi, H. Ali, L. Braga, M.C. Volpe, A. Colliva, F. Zanconati, G. Berlot, F. Silvestri, S. Zacchigna, M. Giacca // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 61, – P. 103104.
32. Bustin, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems / S. Bustin // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2002. – Vol. 29, № 1. – P. 23–39.
33. Carossino, M. Detection of SARS-CoV-2 by RNAscope® in situ hybridization and immunohistochemistry techniques / M. Carossino, H.S. Ip, J.A. Richt, K. Shultz, K. Harper, A.T. Loynachan, F. Del Piero, U.B.R. Balasuriya // *Archives of Virology*. – 2020. – Vol. 165, № 10. – P. 2373–2377.
34. Carsana, L. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study / L. Carsana, A. Sonzogni, A. Nasr, R.S. Rossi, A. Pellegrinelli, P. Zerbi, R. Rech, R. Colombo, S. Antinori, M. Corbellino, M. Galli, E. Catena, A. Tosoni, A. Gianatti, M. Nebuloni // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 10. – P. 1135–1140.
35. Casagrande, M. Detection of SARS-CoV-2 in Human Retinal Biopsies of Deceased COVID-19 Patients / M. Casagrande, A. Fitzek, K. Püschel, G. Aleshcheva, H.-P. Schultheiss, L. Berneking, M.S. Spitzer, M. Schultheiss // *Ocular Immunology and Inflammation*. – 2020. – Vol. 28, № 5. – P. 721–725.

36. Chan, J.F.-W. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan / J.F.-W. Chan, K.-H. Kok, Z. Zhu, H. Chu, K.K.-W. To, S. Yuan, K.-Y. Yuen // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 221–236.
37. Chan, J.F.-W. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J.F.-W. Chan, S. Yuan, K.-H. Kok, K.K.-W. To, H. Chu, J. Yang, F. Xing, J. Liu, C.C.-Y. Yip, R.W.-S. Poon, H.-W. Tsoi, S.K.-F. Lo, K.-H. Chan, V.K.-M. Poon, W.-M. Chan, J.D. Ip, J.-P. Cai, V.C.-C. Cheng, H. Chen, C.K.-M. Hui, K.-Y. Yuen // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10223. – P. 514–523.
38. Chen, J. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity / J. Chen, R. Wang, M. Wang, G.-W. Wei // *Journal of Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 432, № 19. – P. 5212–5226.
39. Chen, T. Clinical Characteristics and Outcomes of Older Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective Study / T. Chen, Z. Dai, P. Mo, X. Li, Z. Ma, S. Song, X. Chen, M. Luo, K. Liang, S. Gao, Y. Zhang, L. Deng, Y. Xiong // *The Journals of Gerontology: Series A*. / ed. by Newman A. – 2020. – Vol. 75, № 9. – P. 1788–1795.
40. Chornenkyy, Y. Liver Pathology and SARS-CoV-2 Detection in Formalin-Fixed Tissue of Patients With COVID-19 / Y. Chornenkyy, M. Mejia-Bautista, M. Brucal, T. Blanke, D. Dittmann, A. Yeldandi, J.R. Boike, J.W. Lomasney, R. Nayar, L.J. Jennings, M.K. Pezhouh // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2021. – Vol. 155, № 6. – P. 802–814.
41. Chu, H. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways / H. Chu, J. Zhou, B.H.-Y. Wong, C. Li, J.F.-W. Chan, Z.-S. Cheng, D. Yang, D. Wang, A.C.-Y. Lee, C. Li, M.-L. Yeung, J.-P. Cai, I.H.-Y. Chan, W.-K. Ho, K.K.-W. To, B.-J. Zheng, Y. Yao, C. Qin, K.-Y. Yuen // *Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 213, № 6. – P. 904–914.

42. Colmenero, I. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases / I. Colmenero, C. Santonja, M. Alonso-Riaño, L. Noguera-Morel, A. Hernández-Martín, D. Andina, T. Wiesner, J.L. Rodríguez-Peralto, L. Requena, A. Torrelo // *British Journal of Dermatology*. – 2020. – Vol. 183, № 4. – P. 729–737.
43. Colson, P. Spreading of a new SARS-CoV-2 N501Y spike variant in a new lineage / P. Colson, A. Levasseur, J. Delerce, L. Pinault, P. Dudouet, C. Devaux, P.-E. Fournier, B. La Scola, J.-C. Lagier, D. Raoult // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2021. – Vol. 27, № 9. – P. 1352.e1-1352.e5.
44. Connors, J.M. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation / J.M. Connors, J.H. Levy // *Blood*. – 2020. – Vol. 135, № 23. – P. 2033–2040.
45. Craver, R. Fatal Eosinophilic Myocarditis in a Healthy 17-Year-Old Male with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2c) / R. Craver, S. Huber, M. Sandomirsky, D. McKenna, J. Schieffelin, L. Finger // *Fetal and Pediatric Pathology*. – 2020. – Vol. 39, № 3. – P. 263–268.
46. Helms, J. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study / J. Helms, C. Tacquard, F. Severac, I. Leonard-Lorant, M. Ohana, X. Delabranche, H. Merdji, R. Clere-Jehl, M. Schenck, F. Fagot Gandet, S. Fafi-Kremer, V. Castelain, F. Schneider, L. Grunebaum, E. Anglés-Cano, L. Sattler, P.-M. Mertes, F. Meziani // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46, № 6. – P. 1089–1098.
47. Curry, A. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: Present and future / A. Curry, H. Appleton, B. Dowsett // *Micron*. – 2006. – Vol. 37, № 2. – P. 91–106.
48. Dahdouh, E. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load / E. Dahdouh, F. Lázaro-Perona, M.P. Romero-Gómez, J. Mingorance, J. García-Rodríguez // *Journal of Infection*. – 2021. – Vol. 82, № 3. – P. 414–451.
49. Deinhardt-Emmer, S. Early postmortem mapping of SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 and the correlation with tissue damage / S. Deinhardt-Emmer, D.

Wittschieber, J. Sanft, S. Kleemann, S. Elschner, K.F. Haupt, V. Vau, C. Häring, J. Rödel, A. Henke, C. Ehrhardt, M. Bauer, M. Philipp, N. Gaßler, S. Nietzsche, B. Löffler, G. Mall // *eLife*. – 2021. – Vol. 10, – P. E60361.

50. Devaux, C.A. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome / C.A. Devaux, J.-M. Rolain, D. Raoult // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2020. – Vol. 53, № 3. – P. 425–435.

51. Diao, B. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection / B. Diao, C. Wang, R. Wang, Z. Feng, J. Zhang, H. Yang, Y. Tan, H. Wang, C. Wang, L. Liu, Y. Liu, Y. Liu, G. Wang, Z. Yuan, X. Hou, L. Ren, Y. Wu, Y. Chen // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 2506.

52. Dittmayer, C. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral / C. Dittmayer, J. Meinhardt, H. Radbruch, J. Radke, B.I. Heppner, F.L. Heppner, W. Stenzel, G. Holland, M. Laue // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 396, № 10260. – P. E64–e65.

53. Dolhnikoff, M. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology / M. Dolhnikoff, A.N. Duarte-Neto, P.H.N. Saldiva, E.G. Caldini // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397, № 10270. – P. 196–197.

54. Dolhnikoff, M. SARS-CoV-2 in cardiac tissue of a child with COVID-19-related multisystem inflammatory syndrome / M. Dolhnikoff, J. Ferreira Ferranti, R.A. de Almeida Monteiro, A.N. Duarte-Neto, M. Soares Gomes-Gouvêa, N. Viu Degaspere, A. Figueiredo Delgado, C. Montanari Fiorita, G. Nunes Leal, R.M. Rodrigues, K. Taverna Chaim, J.R. Rebello Pinho, M. Carneiro-Sampaio, T. Mauad, L.F. Ferraz da Silva, W. Brunow de Carvalho, P.H.N. Saldiva, E. Garcia Caldini // *The Lancet Child & Adolescent Health*. – 2020. – Vol. 4, № 10. – P. 790–794.

55. Dong, E. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time / E. Dong, H. Du, L. Gardner // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 5. – P. 533–534.

56. Duarte-Neto, A.N. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy / A.N. Duarte-Neto, R.A.A.

Monteiro, L.F.F. Silva, D.M.A.C. Malheiros, E.P. Oliveira, J. Theodoro-Filho, J.R.R. Pinho, M.S. Gomes-Gouvêa, A.P.M. Salles, I.R.S. Oliveira, T. Mauad, P.H.N. Saldiva, M. Dolhnikoff // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 77, № 2. – P. 186–197.

57. Edler, C. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany / C. Edler, A.S. Schröder, M. Aepfelbacher, A. Fitzek, A. Heinemann, F. Heinrich, A. Klein, F. Langenwalder, M. Lütgehetmann, K. Meißner, K. Püschel, J. Schädler, S. Steurer, H. Mushumba, J.-P. Sperhake // *International Journal of Legal Medicine*. – 2020. – Vol. 134, № 4. – P. 1275–1284.

58. El Jamal, S.M. Tissue-based SARS-CoV-2 detection in fatal COVID-19 infections: Sustained direct viral-induced damage is not necessary to drive disease progression / S.M. El Jamal, E. Pujadas, I. Ramos, C. Bryce, Z.M. Grimes, F. Amanat, N.M. Tsankova, Z. Mussa, S. Olson, F. Salem, L. Miorin, T. Aydillo, M. Schotsaert, R.A. Albrecht, W.-C. Liu, N. Marjanovic, N. Francoeur, R. Sebra, S.C. Sealfon, A. García-Sastre, M. Fowkes, C. Cordon-Cardo, W.H. Westra // *Human Pathology*. – 2021. – Vol. 114, – P. 110–119.

59. Elez Kurtaj, S. Causes of death and comorbidities in hospitalized patients with COVID-19 / S. Elez Kurtaj, S. Greuel, J. Ihlow, E.G. Michaelis, P. Bischoff, C.A. Kunze, B.V. Sinn, M. Gerhold, K. Hauptmann, B. Ingold-Heppner, F. Miller, H. Herbst, V.M. Corman, H. Martin, H. Radbruch, F.L. Heppner, D. Horst // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 4263.

60. Falasca, L. Postmortem Findings in Italian Patients With COVID-19: A Descriptive Full Autopsy Study of Cases With and Without Comorbidities / L. Falasca, R. Nardacci, D. Colombo, E. Lalle, A. Di Caro, E. Nicastrì, A. Antinori, N. Petrosillo, L. Marchioni, G. Biava, G. D'Offizi, F. Palmieri, D. Goletti, A. Zumla, G. Ippolito, M. Piacentini, F. Del Nonno // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222, № 11. – P. 1807–1815.

61. Fan, B.E. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection / B.E. Fan, V.C.L. Chong, S.S.W. Chan, G.H. Lim, K.G.E. Lim, G.B. Tan, S.S. Mucheli, P. Kuperan, K.H. Ong // *American Journal of Hematology*. – 2020. – Vol. 95, № 6.

62. Farkash, E.A. Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2 / E.A. Farkash, A.M. Wilson, J.M. Jentzen // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2020. – Vol. 31, № 8. – P. 1683–1687.
63. Felix, J.C. Diffuse interstitial pneumonia-like/macrophage activation syndrome-like changes in patients with COVID-19 correlate with length of illness / J.C. Felix, Y.M. Sheinin, D. Suster, N. Ronen, M. Ratiani, T. Vanden Heuvel, E. Winge, M.D. Patton, M.J. Rau, L. Ge, Y. Sun, S.S. Udhane, J.F. Langenheimer, H. Rui // *Annals of Diagnostic Pathology*. – 2021. – Vol. 53, – P. 151744.
64. Figueroa, S. High sensitivity-low cost detection of SARS-CoV-2 by two steps end point RT-PCR with agarose gel electrophoresis visualization / S. Figueroa, B. Freire-Paspuel, P. Vega-Mariño, A. Velez, M. Cruz, W.B. Cardenas, M.A. Garcia-Bereguian // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 21658.
65. Fodor, A. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19—Mechanisms and Therapeutic Targets / A. Fodor, B. Tipericiuc, C. Login, O.H. Orasan, A.L. Lazar, C. Buchman, P. Hanghichel, A. Sitar-Taut, R. Suharoschi, R. Vulturar, A. Cozma // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. / ed. by Jakovljevic V. – 2021. – Vol. 2021, – P. 1–15.
66. Fox, S.E. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans / S.E. Fox, A. Akmatbekov, J.L. Harbert, G. Li, J. Quincy Brown, R.S. Vander Heide // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8, № 7. – P. 681–686.
67. Fox, S.E. Unexpected Features of Cardiac Pathology in COVID-19 Infection / S.E. Fox, G. Li, A. Akmatbekov, J.L. Harbert, F.S. Lameira, J.Q. Brown, R.S. Vander Heide // *Circulation*. – 2020. – Vol. 142, № 11. – P. 1123–1125.
68. Gauchotte, G. SARS-Cov-2 fulminant myocarditis: an autopsy and histopathological case study / G. Gauchotte, V. Venard, M. Segondy, C. Cadoz, A. Esposito-Fava, D. Barraud, G. Louis // *International Journal of Legal Medicine*. – 2021. – Vol. 135, № 2. – P. 577–581.

69. Goldsmith, C.S. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task / C.S. Goldsmith, S.E. Miller, R.B. Martines, H.A. Bullock, S.R. Zaki // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10238. – P. E99.
70. Goldsmith, C.S. Ultrastructural Characterization of SARS Coronavirus / C.S. Goldsmith, K.M. Tatti, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, J.A. Comer, W.W. Lee, P.A. Rota, B. Bankamp, W.J. Bellini, S.R. Zaki // *Emerging Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 10, № 2. – P. 320–326.
71. Grasselli, G. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy / G. Grasselli, M. Greco, A. Zanella, G. Albano, M. Antonelli, G. Bellani, E. Bonanomi, L. Cabrini, E. Carlesso, G. Castelli, S. Cattaneo, D. Cereda, S. Colombo, A. Coluccello, G. Crescini, A. Forastieri Molinari, G. Foti, R. Fumagalli, G.A. Iotti, T. Langer, N. Latronico, F.L. Lorini, F. Mojoli, G. Natalini, C.M. Pessina, V.M. Ranieri, R. Rech, L. Scudeller, A. Rosano, E. Storti, B.T. Thompson, M. Tirani, P.G. Villani, A. Pesenti, M. Cecconi, COVID-19 Lombardy ICU Network, E. Agosteo, G. Albano, A. Albertin, A. Alborghetti, G. Aldegheri, B. Antonini, E. Barbara, G. Bardelloni, S. Basilico, N. Belgiorno, G. Bellani, E. Beretta, A. Berselli, L. Bianciardi, E. Bonanomi, S. Bonazzi, M. Borelli, N. Bottino, N. Bronzini, S. Brusatori, L. Cabrini, C. Capra, L. Carnevale, G. Castelli, E. Catena, S. Cattaneo, M. Cecconi, S. Celotti, S. Cerutti, D. Chiumello, S. Cirri, G. Citerio, S. Colombo, A. Coluccello, D. Coppini, A. Corona, P. Cortellazzi, E. Costantini, R.D. Covello, G. Crescini, G. De Filippi, M. Dei Poli, P. Dughi, F. Fieni, G. Florio, A. Forastieri Molinari, G. Foti, R. Fumagalli, M. Galletti, G.A. Gallioli, H. Gay, M. Gemma, P. Gnesin, G. Grasselli, S. Greco, M. Greco, P. Grosso, L. Guatteri, D. Guzzon, G.A. Iotti, R. Keim, T. Langer, N. Latronico, A. Lombardo, F.L. Lorini, F. Mamprin, G. Marino, F. Marino, G. Merli, A. Micucci, C.R. Militano, F. Mojoli, G. Monti, S. Muttini, S. Nadalin, G. Natalini, P. Perazzo, G.B. Perego, L. Perotti, A. Pesenti, C.M. Pessina, N. Petrucci, A. Pezzi, S. Piva, G. Portella, A. Protti, M. Racagni, D. Radrizzani, M. Raimondi, M. Ranucci, R. Rech, M. Riccio, A. Rosano, P. Ruggeri, G. Sala, L. Salvi, P. Sebastiano, P. Severgnini, D. Sigurtà, N. Stocchetti, E. Storti, M. Subert, M. Tavola, S. Todaro, F. Torriglia, D. Tubiolo, R.

Valsecchi, P.G. Villani, U. Viola, G. Vitale, M. Zambon, A. Zanella, E. Zoia // *JAMA Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 180, № 10. – P. 1345.

72. Greaney, A.J. Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition / A.J. Greaney, T.N. Starr, P. Gilchuk, S.J. Zost, E. Binshtein, A.N. Loes, S.K. Hilton, J. Huddleston, R. Eguia, K.H.D. Crawford, A.S. Dingens, R.S. Nargi, R.E. Sutton, N. Suryadevara, P.W. Rothlauf, Z. Liu, S.P.J. Whelan, R.H. Carnahan, J.E. Crowe, J.D. Bloom // *Cell Host & Microbe*. – 2021. – Vol. 29, № 1. – P. 44-57.e9.

73. Grimes, Z. Fatal Pulmonary Thromboembolism in SARS-CoV-2-Infection / Z. Grimes, C. Bryce, E.M. Sordillo, R.E. Gordon, J. Reidy, A.E. Paniz Mondolfi, M. Fowkes // *Cardiovascular Pathology*. – 2020. – Vol. 48, – P. 107227.

74. Grosse, C. Analysis of cardiopulmonary findings in COVID-19 fatalities: High incidence of pulmonary artery thrombi and acute suppurative bronchopneumonia / C. Grosse, A. Grosse, H.J.F. Salzer, M.W. Dünser, R. Motz, R. Langer // *Cardiovascular Pathology*. – 2020. – Vol. 49, – P. 107263.

75. Gu, J. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS / J. Gu, E. Gong, B. Zhang, J. Zheng, Z. Gao, Y. Zhong, W. Zou, J. Zhan, S. Wang, Z. Xie, H. Zhuang, B. Wu, H. Zhong, H. Shao, W. Fang, D. Gao, F. Pei, X. Li, Z. He, D. Xu, X. Shi, V.M. Anderson, A.S.-Y. Leong // *Journal of Experimental Medicine*. – 2005. – Vol. 202, № 3. – P. 415–424.

76. Hanley, B. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study / B. Hanley, K.N. Naresh, C. Roufosse, A.G. Nicholson, J. Weir, G.S. Cooke, M. Thursz, P. Manousou, R. Corbett, R. Goldin, S. Al-Sarraj, A. Abdolrasouli, O.C. Swann, L. Baillon, R. Penn, W.S. Barclay, P. Viola, M. Osborn // *The Lancet Microbe*. – 2020. – Vol. 1, № 6. – P. E245–e253.

77. Haslbauer, J.D. Histomorphological patterns of regional lymph nodes in COVID-19 lungs / J.D. Haslbauer, M.S. Matter, A.K. Stalder, A. Tzankov // *Der Pathologe*. – 2021. – Vol. 42, № S1. – P. 89–97.

78. Hirschbühl, K. Viral mapping in COVID-19 deceased in the Augsburg autopsy series of the first wave: A multiorgan and multimethodological approach / K. Hirschbühl, S.

- Dintner, M. Beer, C. Wylezich, J. Schlegel, C. Delbridge, L. Borchering, J. Lippert, S. Schiele, G. Müller, D. Moiraki, O. Spring, M. Wittmann, E. Kling, G. Braun, T. Kröncke, R. Claus, B. Märkl, T. Schaller // *PLOS ONE*. / ed. by Ito E. – 2021. – Vol. 16, № 7. – P. E0254872.
79. Hopfer, H. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues / H. Hopfer, M.C. Herzig, R. Gosert, T. Menter, J. Hench, A. Tzankov, H.H. Hirsch, S.E. Miller // *Histopathology*. – 2021. – Vol. 78, № 3. – P. 358–370.
80. Hsiao, C.-H. Immunohistochemical study of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in tissue sections of patients / C.-H. Hsiao, M.-F. Chang, P.-R. Hsueh, I.-J. Su // *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*. – 2005. – Vol. 104, № 3. – P. 150–156.
81. Hsu, A.L. Placental SARS-CoV-2 in a pregnant woman with mild COVID-19 disease / A.L. Hsu, M. Guan, E. Johannesen, A.J. Stephens, N. Khaleel, N. Kagan, B.C. Tuhlei, X. Wan // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, № 2. – P. 1038–1044.
82. Hu, B. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 / B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z.-L. Shi // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19, № 3. – P. 141–154.
83. Huang, C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, B. Cao // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10223. – P. 497–506.
84. Jafarzadeh, A. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: Possible mechanisms / A. Jafarzadeh, S. Jafarzadeh, P. Nozari, P. Mokhtari, M. Nemati // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2021. – Vol. 93, № 2.
85. Kang, S. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites / S. Kang, M. Yang, Z. Hong, L. Zhang, Z. Huang, X. Chen, S. He, Z. Zhou, Z. Zhou, Q. Chen, Y. Yan, C. Zhang, H. Shan, S. Chen // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2020. – Vol. 10, № 7. – P. 1228–1238.

86. Kaufer, A.M. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent / A.M. Kaufer, T. Theis, K.A. Lau, J.L. Gray, W.D. Rawlinson // *Pathology*. – 2020. – Vol. 52, № 7. – P. 790–795.
87. Kissling, S. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient / S. Kissling, S. Rotman, C. Gerber, M. Halfon, F. Lamoth, D. Comte, L. Lhopitallier, S. Sadallah, F. Fakhouri // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 98, № 1. – P. 228–231.
88. Klok, F.A. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19 / F.A. Klok, M.J.H.A. Kruip, N.J.M. van der Meer, M.S. Arbous, D.A.M.P.J. Gommers, K.M. Kant, F.H.J. Kaptein, J. van Paassen, M.A.M. Stals, M.V. Huisman, H. Endeman // *Thrombosis Research*. – 2020. – Vol. 191, – P. 145–147.
89. Kniss, D.A. Alternative interpretation to the findings reported in visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy / D.A. Kniss // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 223, № 5. – P. 785–786.
90. Ko, S.H. High-throughput, single-copy sequencing reveals SARS-CoV-2 spike variants coincident with mounting humoral immunity during acute COVID-19 / S.H. Ko, E. Bayat Mokhtari, P. Mudvari, S. Stein, C.D. Stringham, D. Wagner, S. Ramelli, M.J. Ramos-Benitez, J.R. Strich, R.T. Davey, T. Zhou, J. Misasi, P.D. Kwong, D.S. Chertow, N.J. Sullivan, E.A. Boritz // *PLOS Pathogens*. / ed. by Luring A.S. – 2021. – Vol. 17, № 4. – P. E1009431.
91. Kommoss, F.K.F. The Pathology of Severe COVID-19-Related Lung Damage / F.K.F. Kommoss, C. Schwab, L. Tavernar, J. Schreck, W.L. Wagner, U. Merle, D. Jonigk, P. Schirmacher, T. Longerich // *Deutsches Arzteblatt International*. – 2020. – Vol. 117, № 29–30. – P. 500–506.
92. Konopka, K.E. Diffuse alveolar damage (DAD) resulting from coronavirus disease 2019 Infection is Morphologically Indistinguishable from Other Causes of DAD / K.E. Konopka, T. Nguyen, J.M. Jentzen, O. Rayes, C.J. Schmidt, A.M. Wilson, C.F. Farver, J.L. Myers // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 77, № 4. – P. 570–578.

93. Konopka, K.E. Postmortem Lung Findings in a Patient With Asthma and Coronavirus Disease 2019 / K.E. Konopka, A. Wilson, J.L. Myers // *Chest*. – 2020. – Vol. 158, № 3. – P. E99–e101.
94. Kuipers, J. Within-patient genetic diversity of SARS-CoV-2 / J. Kuipers, A.A. Batavia, K.P. Jablonski, F. Bayer, N. Borgsmüller, A. Dondi, M.-A. Drăgan, P. Ferreira, K. Jahn, L. Lamberti, M. Pirkl, S. Posada-Céspedes, I. Topolsky, I. Nissen, N. Santacroce, E. Burcklen, T. Schär, V. Capece, C. Beckmann, O. Kobel, C. Noppen, M. Redondo, S. Nadeau, S. Seidel, N. Santamaria de Souza, C. Beisel, T. Stadler, N. Beerenwinkel // *bioRxiv*. – 2020. – P. 2020.10.12.335919.
95. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases // World Health Organization. – 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>.
96. Lagana, S.M. Hepatic pathology in patients dying of COVID-19: a series of 40 cases including clinical, histologic, and virologic data / S.M. Lagana, S. Kudose, A.C. Iuga, M.J. Lee, L. Fazlollahi, H.E. Remotti, A. Del Portillo, S. De Michele, A.K. de Gonzalez, A. Saqi, P. Khairallah, A.M. Chong, H. Park, A.-C. Uhlemann, J.H. Lefkowitz, E.C. Verna // *Modern Pathology*. – 2020. – Vol. 33, № 11. – P. 2147–2155.
97. Laue, M. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures / M. Laue, A. Kauter, T. Hoffmann, L. Möller, J. Michel, A. Nitsche // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 3515.
98. Lax, S.F. Pulmonary Arterial Thrombosis in COVID-19 With Fatal Outcome: Results From a Prospective, Single-Center, Clinicopathologic Case Series / S.F. Lax, K. Skok, P. Zechner, H.H. Kessler, N. Kaufmann, C. Koelblinger, K. Vander, U. Bargfrieder, M. Trauner // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 173, № 5. – P. 350–361.
99. Li, G. Mortality risk of COVID-19 in elderly males with comorbidities: a multi-country study / G. Li, Y. Liu, X. Jing, Y. Wang, M. Miao, L. Tao, Z. Zhou, Y. Xie, Y. Huang, J. Lei, G. Gong, P. Jin, Y. Hao, N.R. Faria, E.D. Clercq, M. Zhang // *Aging*. – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 27–60.
100. Li, Q. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia / Q. Li, X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, Y. Tong, R. Ren, K.S.M.

- Leung, E.H.Y. Lau, J.Y. Wong, X. Xing, N. Xiang, Y. Wu, C. Li, Q. Chen, D. Li, T. Liu, J. Zhao, M. Liu, W. Tu, C. Chen, L. Jin, R. Yang, Q. Wang, S. Zhou, R. Wang, H. Liu, Y. Luo, Y. Liu, G. Shao, H. Li, Z. Tao, Y. Yang, Z. Deng, B. Liu, Z. Ma, Y. Zhang, G. Shi, T.T.Y. Lam, J.T. Wu, G.F. Gao, B.J. Cowling, B. Yang, G.M. Leung, Z. Feng // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, № 13. – P. 1199–1207.
101. Li, T. Phylogenetic supertree reveals detailed evolution of SARS-CoV-2 / T. Li, D. Liu, Y. Yang, J. Guo, Y. Feng, X. Zhang, S. Cheng, J. Feng // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 22366.
102. Lindner, D. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases / D. Lindner, A. Fitzek, H. Bräuninger, G. Aleshcheva, C. Edler, K. Meissner, K. Scherschel, P. Kirchhof, F. Escher, H.-P. Schultheiss, S. Blankenberg, K. Püschel, D. Westermann // *JAMA Cardiology*. – 2020. – Vol. 5, № 11. – P. 1281.
103. Lippi, G. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection / G. Lippi, M. Plebani // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2020. – Vol. 58, № 7. – P. 1131–1134.
104. Liu, M. Outcomes and prognostic factors in 70 non-survivors and 595 survivors with COVID-19 in Wuhan, China / M. Liu, S. Han, Q. Liao, L. Chang, Y. Tan, P. Jia, L. Yang, H. Cai, S. Feng, C. Chen, S. Zhang, Z. Jia, J. Yi // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2021. – Vol. 68, № 6. – P. 3611–3623.
105. Liu, S. Genetic Spectrum and Distinct Evolution Patterns of SARS-CoV-2 / S. Liu, J. Shen, S. Fang, K. Li, J. Liu, L. Yang, C.-D. Hu, J. Wan // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11, – P. 593548.
106. Llitjos, J. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients / J. Llitjos, M. Leclerc, C. Chochois, J. Monsallier, M. Ramakers, M. Auvray, K. Merouani // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 7. – P. 1743–1746.
107. Lu, R. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Y. Bi, X. Ma, F. Zhan, L. Wang, T.

- Hu, H. Zhou, Z. Hu, W. Zhou, L. Zhao, J. Chen, Y. Meng, J. Wang, Y. Lin, J. Yuan, Z. Xie, J. Ma, W.J. Liu, D. Wang, W. Xu, E.C. Holmes, G.F. Gao, G. Wu, W. Chen, W. Shi, W. Tan // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10224. – P. 565–574.
108. Ma, X. Characteristic of 523 COVID-19 in Henan Province and a Death Prediction Model / X. Ma, A. Li, M. Jiao, Q. Shi, X. An, Y. Feng, L. Xing, H. Liang, J. Chen, H. Li, J. Li, Z. Ren, R. Sun, G. Cui, Y. Zhou, M. Cheng, P. Jiao, Y. Wang, J. Xing, S. Shen, Q. Zhang, A. Xu, Z. Yu // *Frontiers in Public Health*. – 2020. – Vol. 8, – P. 475.
109. Machado, A. The Impact of SARS-CoV-2 Viral Load on the Mortality of Hospitalized Patients: A Retrospective Analysis / A. Machado, P. Salvador, P. Oliveira, T. Teixeira, C. Figueiredo, S. Nunes, L. Silva, L. Silva, T. Costa, L. Malheiro // *Cureus*. – 2021. – .
110. Magleby, R. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 / R. Magleby, L.F. Westblade, A. Trzebucki, M.S. Simon, M. Rajan, J. Park, P. Goyal, M.M. Safford, M.J. Satlin // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 73, № 11. – P. E4197–e4205.
111. Magro, C. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases / C. Magro, J.J. Mulvey, D. Berlin, G. Nuovo, S. Salvatore, J. Harp, A. Baxter-Stoltzfus, J. Laurence // *Translational Research*. – 2020. – Vol. 220, – P. 1–13.
112. Mahmood, T.B. A next generation sequencing (NGS) analysis to reveal genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2 in South Asia / T.B. Mahmood, A. Saha, M.I. Hossan, S. Mizan, S.M.A.S. Arman, A.S. Chowdhury // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2, – P. 100065.
113. Martines, R.B. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States / R.B. Martines, J.M. Ritter, E. Matkovic, J. Gary, B.C. Bollweg, H. Bullock, C.S. Goldsmith, L. Silva-Flannery, J.N. Seixas, S. Reagan-Steiner, T. Uyeki, A. Denison, J. Bhatnagar, W.-J. Shieh, S.R. Zaki // *Emerging Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26, № 9. – P. 2005–2015.

114. Massoth, L.R. Comparison of RNA In Situ Hybridization and Immunohistochemistry Techniques for the Detection and Localization of SARS-CoV-2 in Human Tissues / L.R. Massoth, N. Desai, A. Szabolcs, C.K. Harris, A. Neyaz, R. Crotty, I. Chebib, M.N. Rivera, L.M. Sholl, J.R. Stone, D.T. Ting, V. Deshpande // *American Journal of Surgical Pathology*. – 2021. – Vol. 45, № 1. – P. 14–24.
115. Matschke, J. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series / J. Matschke, M. Lütgehetmann, C. Hagel, J.P. Sperhake, A.S. Schröder, C. Edler, H. Mushumba, A. Fitzek, L. Allweiss, M. Dandri, M. Dottermusch, A. Heinemann, S. Pfefferle, M. Schwabenland, D. Sumner Magruder, S. Bonn, M. Prinz, C. Gerloff, K. Püschel, S. Krasemann, M. Aepfelbacher, M. Glatzel // *The Lancet Neurology*. – 2020. – Vol. 19, № 11. – P. 919–929.
116. Menter, T. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction / T. Menter, J.D. Haslbauer, R. Nienhold, S. Savic, H. Hopfer, N. Deigendesch, S. Frank, D. Turek, N. Willi, H. Pargger, S. Bassetti, J.D. Leuppi, G. Cathomas, M. Tolnay, K.D. Mertz, A. Tzankov // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 77, № 2. – P. 198–209.
117. Merad, M. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages / M. Merad, J.C. Martin // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20, № 6. – P. 355–362.
118. Mikhaleva, L.M. Pathological Features in 100 Deceased Patients With COVID-19 in Correlation With Clinical and Laboratory Data / L.M. Mikhaleva, A.L. Cherniaev, M.V. Samsonova, O.V. Zayratyants, L.V. Kakturskiy, O.A. Vasyukova, A.E. Birukov, A.S. Kontorshchikov, A.V. Sorokina, M.Y. Sinelnikov // *Pathology and Oncology Research*. – 2021. – Vol. 27, – P. 1609900.
119. Miller, S.E. Visualization of putative coronavirus in kidney / S.E. Miller, J.K. Brealey // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 98, № 1. – P. 231–232.
120. Mokhtari, T. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms / T. Mokhtari, F. Hassani, N. Ghaffari, B. Ebrahimi, A. Yarahmadi, G. Hassanzadeh // *Journal of Molecular Histology*. – 2020. – Vol. 51, № 6. – P. 613–628.

121. Mu, J. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells / J. Mu, J. Xu, L. Zhang, T. Shu, D. Wu, M. Huang, Y. Ren, X. Li, Q. Geng, Y. Xu, Y. Qiu, X. Zhou // *Science China Life Sciences*. – 2020. – Vol. 63, № 9. – P. 1413–1416.
122. Naqvi, A.A.T. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach / A.A.T. Naqvi, K. Fatima, T. Mohammad, U. Fatima, I.K. Singh, A. Singh, S.M. Atif, G. Hariprasad, G.M. Hasan, Md.I. Hassan // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2020. – Vol. 1866, № 10. – P. 165878.
123. Neil, D. Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep / D. Neil, L. Moran, C. Horsfield, E. Curtis, O. Swann, W. Barclay, B. Hanley, M. Hollinshead, C. Roufosse // *The Journal of Pathology*. – 2020. – Vol. 252, № 4. – P. 346–357.
124. Ng, D.L. Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Findings of a Fatal Case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the United Arab Emirates, April 2014 / D.L. Ng, F. Al Hosani, M.K. Keating, S.I. Gerber, T.L. Jones, M.G. Metcalfe, S. Tong, Y. Tao, N.N. Alami, L.M. Haynes, M.A. Mutei, L. Abdel-Wareth, T.M. Uyeki, D.L. Swerdlow, M. Barakat, S.R. Zaki // *The American Journal of Pathology*. – 2016. – Vol. 186, № 3. – P. 652–658.
125. Nicholls, J. SARS: clinical virology and pathogenesis / J. Nicholls, X.-P. Dong, G. Jiang, M. Peiris // *Respirology*. – 2003. – Vol. 8, № S1. – P. S6–S8.
126. Noris, M. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact / M. Noris, A. Benigni, G. Remuzzi // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 98, № 2. – P. 314–322.
127. Odilov, A.A. Organ changes found by postmortem examination in COVID-19 patients / A.A. Odilov, N.S. Tsimbalist, A.V. Volkov, I.I. Babichenko // *Arkhiv patologii*. – 2020. – Vol. 82, № 6. – P. 63.
128. Olivas-Martínez, A. In-hospital mortality from severe COVID-19 in a tertiary care center in Mexico City; causes of death, risk factors and the impact of hospital saturation / A. Olivas-Martínez, J.L. Cárdenas-Fragoso, J.V. Jiménez, O.A. Lozano-Cruz, E. Ortiz-

Brizuela, V.H. Tovar-Méndez, C. Medrano-Borromeo, A. Martínez-Valenzuela, C.M. Román-Montes, B. Martínez-Guerra, M.F. González-Lara, T. Hernandez-Gilsoul, A.G. Herrero, K.M. Tamez-Flores, E. Ochoa-Hein, A. Ponce-de-León, A. Galindo-Fraga, D. Kershenobich-Stalnikowitz, J. Sifuentes-Osornio // PLOS ONE. / ed. by Lazzeri C. – 2021. – Vol. 16, № 2. – P. E0245772.

129. Paraskevis, D. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event / D. Paraskevis, E.G. Kostaki, G. Magiorkinis, G. Panayiotakopoulos, G. Sourvinos, S. Tsiodras // Infection, Genetics and Evolution. – 2020. – Vol. 79, – P. 104212.

130. Park, W.B. Isolation of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus from a Patient of the 2015 Korean Outbreak / W.B. Park, N.-J. Kwon, P.G. Choe, S.-J. Choi, H.S. Oh, S.M. Lee, H. Chong, J.-I. Kim, K.-H. Song, J.H. Bang, E.S. Kim, H.-B. Kim, S.W. Park, N.J. Kim, M. Oh // Journal of Korean Medical Science. – 2016. – Vol. 31, № 2. – P. 315.

131. Odilov, A.A. Histopathological characteristics of multi-organ lesions in patients with COVID-19 / A.A. Odilov, N.S. Tsimbalist, A.V. Volkov, I.I. Babichenko // Medical Science And Education Of Ural. – 2021. – Vol. 22, № 1. – P. 53–60.

132. Pérez, A. IgA-Dominant Infection-Associated Glomerulonephritis Following SARS-CoV-2 Infection / A. Pérez, I. Torregrosa, L. D’Marco, I. Juan, L. Terradez, M.Á. Solís, F. Moncho, C. Carda-Batalla, M.J. Forner, J.L. Gorriz // Viruses. – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 587.

133. Pesaresi, M. SARS-CoV-2 identification in lungs, heart and kidney specimens by transmission and scanning electron microscopy / M. Pesaresi, F. Pirani, A. Tagliabracci, M. Valsecchi, A.D. Procopio, F.P. Busardò, L. Graciotti // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2020. – Vol. 24, № 9. – P. 5186–5188.

134. Prasad, S. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2 / S. Prasad, V. Potdar, S. Cherian, P. Abraham, A. Basu // Indian Journal of Medical Research. – 2020. – Vol. 151, № 2. – P. 241.

135. Prilutskiy, A. SARS-CoV-2 Infection–Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis / A. Prilutskiy, M. Kritselis, A. Shevtsov, I. Yambayev, C.

- Vadlamudi, Q. Zhao, Y. Kataria, S.R. Sarosiek, A. Lerner, J.M. Sloan, K. Quillen, E.J. Burks // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2020. – Vol. 154, № 4. – P. 466–474.
136. Puelles, V.G. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2 / V.G. Puelles, M. Lütgehetmann, M.T. Lindenmeyer, J.P. Sperhake, M.N. Wong, L. Allweiss, S. Chilla, A. Heinemann, N. Wanner, S. Liu, F. Braun, S. Lu, S. Pfefferle, A.S. Schröder, C. Edler, O. Gross, M. Glatzel, D. Wichmann, T. Wiech, S. Kluge, K. Puschel, M. Aepfelbacher, T.B. Huber // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 6. – P. 590–592.
137. Pujadas, E. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality / E. Pujadas, F. Chaudhry, R. McBride, F. Richter, S. Zhao, A. Wajnberg, G. Nadkarni, B.S. Glicksberg, J. Houldsworth, C. Cordon-Cardo // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8, № 9. – P. E70.
138. Rao, S.N. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19 / S.N. Rao, D. Manissero, V.R. Steele, J. Pareja // *Infectious Diseases and Therapy*. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 573–586.
139. Rapkiewicz, A.V. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series / A.V. Rapkiewicz, X. Mai, S.E. Carsons, S. Pittaluga, D.E. Kleiner, J.S. Berger, S. Thomas, N.M. Adler, D.M. Charytan, B. Gasmi, J.S. Hochman, H.R. Reynolds // *EClinicalMedicine*. – 2020. – Vol. 24, – P. 100434.
140. Ray, A. Clinico-pathological features in fatal COVID-19 infection: a preliminary experience of a tertiary care center in North India using postmortem minimally invasive tissue sampling / A. Ray, D. Jain, A. Goel, S. Agarwal, S. Swaroop, P. Das, S.K. Arava, A.R. Mridha, A. Nambirajan, G. Singh, S. Arulselvi, P. Mathur, S. Kumar, S. Sahni, J. Nehra, Nazneen, M. Bm, N. Rastogi, S. Mahato, C. Gupta, S. Bharadhan, G. Dhital, P. Goel, P. Pandey, S. Kn, S. Chaudhary, V.C. Keri, V.S. Chauhan, N. Mahishi, A. Shahi, R. R, B.K. Gupta, R. Aggarwal, K.D. Soni, N. Nischal, M. Soneja, S. Lalwani, C. Sarkar, R. Guleria, N. Wig, A. Trikha // *Expert Review of Respiratory Medicine*. – 2021. – Vol. 15, № 10. – P. 1367–1375.
141. Rimmelink, M. Unspecific post-mortem findings despite multiorgan viral spread in COVID-19 patients / M. Rimmelink, R. De Mendonça, N. D’Haene, S. De Clercq, C.

Verocq, L. Lebrun, P. Lavis, M.-L. Racu, A.-L. Trépan, C. Maris, S. Rorive, J.-C. Goffard, O. De Witte, L. Peluso, J.-L. Vincent, C. Decaestecker, F.S. Taccone, I. Salmon // *Critical Care*. – 2020. – Vol. 24, № 1. – P. 495.

142. Rhoads, D. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value / D. Rhoads, D.R. Peaper, R.C. She, F.S. Nolte, C.M. Wojewoda, N.W. Anderson, B.S. Pritt // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 72, № 10. – P. E685–e686.

143. Roden, A.C. Comparison of In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, and Reverse Transcription–Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Testing in Tissue / A.C. Roden, J.A. Vrana, J.W. Koeplin, A.E. Hudson, A.P. Norgan, G. Jenkinson, S. Yamaoka, H. Ebihara, R. Monroe, M.J. Szabolcs, R. Majumdar, A.M. Moyer, J.J. García, B.R. Kipp // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2021. – Vol. 145, № 7. – P. 785–796.

144. Roingard, P. Virus detection by transmission electron microscopy: Still useful for diagnosis and a plus for biosafety / P. Roingard, P.-I. Raynal, S. Eymieux, E. Blanchard // *Reviews in Medical Virology*. – 2019. – Vol. 29, № 1. – P. E2019.

145. Romanova, E.S. Cause of death based on systematic post-mortem studies in patients with positive SARS-CoV-2 tissue PCR during the COVID-19 pandemic / E.S. Romanova, V.V. Vasilyev, G. Startseva, V. Karev, M.G. Rybakova, P.G. Platonov // *Journal of Internal Medicine*. – 2021. – Vol. 290, № 3. – P. 655–665.

146. Sadegh Beigee, F. Diffuse alveolar damage and thrombotic microangiopathy are the main histopathological findings in lung tissue biopsy samples of COVID-19 patients / F. Sadegh Beigee, M. Pourabdollah Toutkaboni, N. Khalili, S.A. Nadji, A. Dorudinia, M. Rezaei, E. Askari, B. Farzanegan, M. Marjani, A. Rafiezadeh // *Pathology - Research and Practice*. – 2020. – Vol. 216, № 10. – P. 153228.

147. Samsonova, M.V. Features of pathological anatomy of lungs at COVID-19 / M.V. Samsonova, A.L. Chernyaev, Zh.R. Omarova, E.A. Pershina, O.D. Mishnev, O.V. Zayratyants, L.M. Mikhaleva, D.V. Kalinin, V.V. Varyasin, O.A. Tishkevich, S.A. Vinogradov, K.Yu. Mikhaylichenko, A.V. Chernyak // *PULMONOLOGIYA*. – 2020. – Vol. 30, № 5. – P. 519–532.

148. Sauter, J.L. Insights into pathogenesis of fatal COVID-19 pneumonia from histopathology with immunohistochemical and viral RNA studies / J.L. Sauter, M.K. Baine, K.J. Butnor, D.J. Buonocore, J.C. Chang, A.A. Jungbluth, M.J. Szabolcs, S. Morjaria, S.L. Mount, N. Rekhtman, E. Selbs, Z. Sheng, Y. Xiao, D.E. Kleiner, S. Pittaluga, J.K. Taubenberger, A.V. Rapkiewicz, W.D. Travis // *Histopathology*. – 2020. – Vol. 77, № 6. – P. 915–925.
149. Schaefer, I.-M. In situ detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19 / I.-M. Schaefer, R.F. Padera, I.H. Solomon, S. Kanjilal, M.M. Hammer, J.L. Hornick, L.M. Sholl // *Modern Pathology*. – 2020. – Vol. 33, № 11. – P. 2104–2114.
150. Schaller, T. Postmortem Examination of Patients With COVID-19 / T. Schaller, K. Hirschbühl, K. Burkhardt, G. Braun, M. Trepel, B. Märkl, R. Claus // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323, № 24. – P. 2518.
151. Schnuriger, A. Caution in interpretation of SARS-CoV-2 quantification based on RT-PCR cycle threshold value / A. Schnuriger, M. Perrier, V. Marinho, Y. Michel, K. Saloum, N. Boukli, S. Lambert-Niclot, C. Amiel, D.B. Fofana, J. Gozlan, L. Morand-Joubert // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2021. – Vol. 100, № 3. – P. 115366.
152. Schoenmakers, S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Placental Infection and Inflammation Leading to Fetal Distress and Neonatal Multi-Organ Failure in an Asymptomatic Woman / S. Schoenmakers, P. Snijder, R.M. Verdijk, T. Kuiken, S.S.M. Kamphuis, L.P. Koopman, T.B. Krasemann, M. Rousian, M. Broekhuizen, E.A.P. Steegers, M.P.G. Koopmans, P.L.A. Fraaij, I.K.M. Reiss // *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 556–561.
153. Schurink, B. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study / B. Schurink, E. Roos, T. Radonic, E. Barbe, C.S.C. Bouman, H.H. de Boer, G.J. de Bree, E.B. Bulle, E.M. Aronica, S. Florquin, J. Fronczek, L.M.A. Heunks, M.D. de Jong, L. Guo, R. du Long, R. Lutter, P.C.G. Molenaar, E.A. Neefjes-Borst, H.W.M. Niessen, C.J.M. van Noesel, J.J.T.H. Roelofs, E.J. Snijder, E.C. Soer, J. Verheij, A.P.J. Vlaar, W. Vos, N.N. van der Wel, A.C. van der

- Wal, P. van der Valk, M. Bugiani // *The Lancet Microbe*. – 2020. – Vol. 1, № 7. – P. E290–e299.
154. Schwensen, H.F. Fatal pulmonary fibrosis: a post-COVID-19 autopsy case / H.F. Schwensen, L.K. Borreschmidt, M. Storgaard, S. Redsted, S. Christensen, L.B. Madsen // *Journal of Clinical Pathology*. – 2021. – Vol. 74, № 6. – P. 400–402.
155. Sekulic, M. Molecular Detection of SARS-CoV-2 Infection in FFPE Samples and Histopathologic Findings in Fatal SARS-CoV-2 Cases / M. Sekulic, H. Harper, B.G. Nezami, D.L. Shen, S.P. Sekulic, A.T. Koeth, C.V. Harding, H. Gilmore, N. Sadri // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2020. – Vol. 154, № 2. – P. 190–200.
156. Shi, H. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / H. Shi, X. Han, N. Jiang, Y. Cao, O. Alwalid, J. Gu, Y. Fan, C. Zheng // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 4. – P. 425–434.
157. Shoar, S. Meta-analysis of Cardiovascular Events and Related Biomarkers Comparing Survivors Versus Non-survivors in Patients With COVID-19 / S. Shoar, F. Hosseini, M. Naderan, J.L. Mehta // *The American Journal of Cardiology*. – 2020. – Vol. 135, – P. 50–61.
158. Skok, K. Post-mortem viral dynamics and tropism in COVID-19 patients in correlation with organ damage / K. Skok, E. Stelzl, M. Trauner, H.H. Kessler, S.F. Lax // *Virchows Archiv*. – 2021. – Vol. 478, № 2. – P. 343–353.
159. Stahl, K. Direct evidence of SARS-CoV-2 in gut endothelium / K. Stahl, J.H. Bräsen, M.M. Hoepfer, S. David // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46, № 11. – P. 2081–2082.
160. Steenblock, C. Viral infiltration of pancreatic islets in patients with COVID-19 / C. Steenblock, S. Richter, I. Berger, M. Barovic, J. Schmid, U. Schubert, N. Jarzebska, A. von Mässenhausen, A. Linkermann, A. Schürmann, J. Pablik, T. Dienemann, K. Evert, R.N. Rodionov, N.Y. Semenova, V.A. Zinserling, R.R. Gainetdinov, G. Baretton, D. Lindemann, M. Solimena, B. Ludwig, S.R. Bornstein // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 3534.

161. Su, H. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China / H. Su, M. Yang, C. Wan, L.-X. Yi, F. Tang, H.-Y. Zhu, F. Yi, H.-C. Yang, A.B. Fogo, X. Nie, C. Zhang // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 98, № 1. – P. 219–227.
162. Sun, P. Understanding of COVID-19 based on current evidence / P. Sun, X. Lu, C. Xu, W. Sun, B. Pan // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92, № 6. – P. 548–551.
163. Szabolcs, M. Identification of Immunohistochemical Reagents for In Situ Protein Expression Analysis of Coronavirus-associated Changes in Human Tissues / M. Szabolcs, J.L. Sauter, D. Frosina, J.A. Geronimo, E. Hernandez, E. Selbs, A.V. Rapkiewicz, N. Rekhtman, M.K. Baine, E. Jäger, W.D. Travis, A.A. Jungbluth // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2021. – Vol. 29, № 1. – P. 5–12.
164. Tang, N. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia / N. Tang, D. Li, X. Wang, Z. Sun // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 4. – P. 844–847.
165. Tavazzi, G. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock / G. Tavazzi, C. Pellegrini, M. Maurelli, M. Belliato, F. Sciutti, A. Bottazzi, P.A. Sepe, T. Resasco, R. Camporotondo, R. Bruno, F. Baldanti, S. Paolucci, S. Pelenghi, G.A. Iotti, F. Mojoli, E. Arbustini // *European Journal of Heart Failure*. – 2020. – Vol. 22, № 5. – P. 911–915.
166. Tian, S. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies / S. Tian, Y. Xiong, H. Liu, L. Niu, J. Guo, M. Liao, S.-Y. Xiao // *Modern Pathology*. – 2020. – Vol. 33, № 6. – P. 1007–1014.
167. Trunfio, M. Diagnostic SARS-CoV-2 Cycle Threshold Value Predicts Disease Severity, Survival, and Six-Month Sequelae in COVID-19 Symptomatic Patients / M. Trunfio, F. Venuti, F. Alladio, B.M. Longo, E. Burdino, F. Cerutti, V. Ghisetti, R. Bertucci, C. Picco, S. Bonora, G. Di Perri, A. Calcagno // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 281.
168. Turoňová, B. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges / B. Turoňová, M. Sikora, C. Schürmann, W.J.H. Hagen, S.

Welsch, F.E.C. Blanc, S. von Bülow, M. Gecht, K. Bagola, C. Hörner, G. van Zandbergen, J. Landry, N.T.D. de Azevedo, S. Mosalaganti, A. Schwarz, R. Covino, M.D. Mühlebach, G. Hummer, J. Krijnse Locker, M. Beck // *Science*. – 2020. – Vol. 370, № 6513. – P. 203–208.

169. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3, № 7. – P. Research0034.1.

170. Varga, Z. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 / Z. Varga, A.J. Flammer, P. Steiger, M. Haberecker, R. Andermatt, A.S. Zinkernagel, M.R. Mehra, R.A. Schuepbach, F. Ruschitzka, H. Moch // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10234. – P. 1417–1418.

171. von Stillfried, S. Detection methods for SARS-CoV-2 in tissue / S. von Stillfried, P. Boor // *Der Pathologe*. – 2021. – Vol. 42, № S1. – P. 81–88.

172. Wang, C. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients / C. Wang, J. Xie, L. Zhao, X. Fei, H. Zhang, Y. Tan, X. Nie, L. Zhou, Z. Liu, Y. Ren, L. Yuan, Y. Zhang, J. Zhang, L. Liang, X. Chen, X. Liu, P. Wang, X. Han, X. Weng, Y. Chen, T. Yu, X. Zhang, J. Cai, R. Chen, Z.-L. Shi, X.-W. Bian // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 57, – P. 102833.

173. Wang, Y. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19 / Y. Wang, S. Liu, H. Liu, W. Li, F. Lin, L. Jiang, X. Li, P. Xu, L. Zhang, L. Zhao, Y. Cao, J. Kang, J. Yang, L. Li, X. Liu, Y. Li, R. Nie, J. Mu, F. Lu, S. Zhao, J. Lu, J. Zhao // *Journal of Hepatology*. – 2020. – Vol. 73, № 4. – P. 807–816.

174. Weisblum, Y. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants / Y. Weisblum, F. Schmidt, F. Zhang, J. DaSilva, D. Poston, J.C. Lorenzi, F. Muecksch, M. Rutkowska, H.-H. Hoffmann, E. Michailidis, C. Gaebler, M. Agudelo, A. Cho, Z. Wang, A. Gazumyan, M. Cipolla, L. Luchsinger, C.D. Hillyer, M. Caskey, D.F. Robbani, C.M. Rice, M.C. Nussenzweig, T. Hatziioannou, P.D. Bieniasz // *eLife*. – 2020. – Vol. 9, – P. E61312.

175. Wichmann, D. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study / D. Wichmann, J.-P. Sperhake, M. Lütgehetmann, S. Steurer, C. Edler, A. Heinemann, F. Heinrich, H. Mushumba, I. Kniep, A.S. Schröder, C. Burdelski, G. de Heer, A. Nierhaus, D. Frings, S. Pfefferle, H. Becker, H. Brederke-Wiedling, A. de Weerth, H.-R. Paschen, S. Sheikhzadeh-Eggers, A. Stang, S. Schmiedel, C. Bokemeyer, M.M. Addo, M. Aepfelbacher, K. Püschel, S. Kluge // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 173, № 4. – P. 268–277.
176. Wong, D.W.L. Multisystemic Cellular Tropism of SARS-CoV-2 in Autopsies of COVID-19 Patients / D.W.L. Wong, B.M. Klinkhammer, S. Djudjaj, S. Villwock, M.C. Timm, E.M. Buhl, S. Wucherpfennig, C. Cacchi, T. Braunschweig, R. Knüchel-Clarke, D. Jonigk, C. Werlein, R.D. Bülow, E. Dahl, S. von Stillfried, P. Boor // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. 1900.
177. Wong, M.L. Real-time PCR for mRNA quantitation / M.L. Wong, J.F. Medrano // *BioTechniques*. – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 75–85.
178. Wu, F. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.-H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.-J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, Y.-Z. Zhang // *Nature*. – 2020. – Vol. 579, № 7798. – P. 265–269.
179. Wu, Z. A meta-analysis of the impact of COVID-19 on liver dysfunction / Z. Wu, D. Yang // *European Journal of Medical Research*. – 2020. – Vol. 25, № 1. – P. 54.
180. Xiang, Q. SARS-CoV-2 Induces Lymphocytopenia by Promoting Inflammation and Decimates Secondary Lymphoid Organs / Q. Xiang, Z. Feng, B. Diao, C. Tu, Q. Qiao, H. Yang, Y. Zhang, G. Wang, H. Wang, C. Wang, L. Liu, C. Wang, L. Liu, R. Chen, Y. Wu, Y. Chen // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12, – P. 661052.
181. Xie, J. Clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with novel coronavirus infectious disease (COVID-19) in China: a retrospective multicenter study / J. Xie, W. Wu, S. Li, Y. Hu, M. Hu, J. Li, Y. Yang, T. Huang, K. Zheng, Y. Wang, H. Kang, Y. Huang, L. Jiang, W. Zhang, M. Zhong, L. Sang, X. Zheng, C. Pan, R. Zheng, X. Li, Z. Tong, H. Qiu, B. Du // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46, № 10. – P. 1863–1872.

182. Xu, Z. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome / Z. Xu, L. Shi, Y. Wang, J. Zhang, L. Huang, C. Zhang, S. Liu, P. Zhao, H. Liu, L. Zhu, Y. Tai, C. Bai, T. Gao, J. Song, P. Xia, J. Dong, J. Zhao, F.-S. Wang // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8, № 4. – P. 420–422.
183. Yan, L. COVID-19 in a Hispanic Woman / L. Yan, M. Mir, P. Sanchez, M. Beg, J. Peters, O. Enriquez, A. Gilbert // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2020. – Vol. 144, № 9. – P. 1041–1047.
184. Yang, X. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study / X. Yang, Y. Yu, J. Xu, H. Shu, J. Xia, H. Liu, Y. Wu, L. Zhang, Z. Yu, M. Fang, T. Yu, Y. Wang, S. Pan, X. Zou, S. Yuan, Y. Shang // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8, № 5. – P. 475–481.
185. Yu, F. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients / F. Yu, L. Yan, N. Wang, S. Yang, L. Wang, Y. Tang, G. Gao, S. Wang, C. Ma, R. Xie, F. Wang, C. Tan, L. Zhu, Y. Guo, F. Zhang // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71, № 15. – P. 793–798.
186. Zabožlaev, F.G. PULMONARY PATHOLOGY OF NEW CORONAVIRUS DISEASE (COVID- 19). THE PRELIMINARY ANALYSIS OF POST-MORTEM FINDINGS / F.G. Zabožlaev, E.V. Kravchenko, A.R. Gallyamova, N.N. Letunovskiy // *Journal of Clinical Practice*. – 2020. – Vol. 11, № 2. – P. 21–37.
187. Zayratyants, O.V. COVID-19 pathology: experience of 2000 autopsies / O.V. Zayratyants, M.V. Samsonova, A.L. Cherniaev, O.D. Mishnev, L.M. Mikhaleva, N.M. Krupnov, D.V. Kalinin // *Russian Journal of Forensic Medicine*. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 10–23.
188. Zhang, B. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19 / B. Zhang, X. Zhou, Y. Qiu, Y. Song, F. Feng, J. Feng, Q. Song, Q. Jia, J. Wang // *PLOS ONE*. / ed. by Jin X. – 2020. – Vol. 15, № 7. – P. E0235458.
189. Zhang, C. Protein Structure and Sequence Reanalysis of 2019-nCoV Genome Refutes Snakes as Its Intermediate Host and the Unique Similarity between Its Spike

- Protein Insertions and HIV-1 / C. Zhang, W. Zheng, X. Huang, E.W. Bell, X. Zhou, Y. Zhang // *Journal of Proteome Research*. – 2020. – Vol. 19, № 4. – P. 1351–1360.
190. Zhang, H. Histopathologic Changes and SARS-CoV-2 Immunostaining in the Lung of a Patient With COVID-19 / H. Zhang, P. Zhou, Y. Wei, H. Yue, Y. Wang, M. Hu, S. Zhang, T. Cao, C. Yang, M. Li, G. Guo, X. Chen, Y. Chen, M. Lei, H. Liu, J. Zhao, P. Peng, C.-Y. Wang, R. Du // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 172, № 9. – P. 629–632.
191. Zhang, L. SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier accompanied with basement membrane disruption without tight junctions alteration / L. Zhang, L. Zhou, L. Bao, J. Liu, H. Zhu, Q. Lv, R. Liu, W. Chen, W. Tong, Q. Wei, Y. Xu, W. Deng, H. Gao, J. Xue, Z. Song, P. Yu, Y. Han, Y. Zhang, X. Sun, X. Yu, C. Qin // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 337.
192. Zhao, C.L. Pathological findings in the postmortem liver of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) / C.L. Zhao, A. Rapkiewicz, M. Maghsoodi-Deerwester, M. Gupta, W. Cao, T. Palaia, J. Zhou, B. Ram, D. Vo, B. Rafiee, Z. Hossein-Zadeh, B. Dabiri, I. Hanna // *Human Pathology*. – 2021. – Vol. 109, – P. 59–68.
193. Zhou, F. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du, G. Fan, Y. Liu, Z. Liu, J. Xiang, Y. Wang, B. Song, X. Gu, L. Guan, Y. Wei, H. Li, X. Wu, J. Xu, S. Tu, Y. Zhang, H. Chen, B. Cao // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10229. – P. 1054–1062.
194. Zhu, N. Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, W. Tan // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, № 8. – P. 727–733.