

На правах рукописи

Казьмин Андрей Сергеевич

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В СОСУДАХ ЛЕГКИХ В РАЗНЫЕ СРОКИ
ЛЕТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ БОЛЬНЫХ ПРИ COVID-19**

3.3.2 – Патологическая анатомия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск, 2023

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России).

Научный руководитель

доктор медицинских наук

Тодоров Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты:

Карев Вадим Евгеньевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (Санкт-Петербург).

Овсянко Елена Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии человека имени академика Ю.И. Бородина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны РФ.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Современный мир столкнулся с серьезной эпидемиологической угрозой, объявленной пандемией ВОЗ в марте 2020 года. Вирус, относящийся к семейству бета-коронавирусов, РНК-содержащий, был назван SARS-CoV-2, а заболевание, им вызываемое – COVID-19 (Зайратьянц О.В., и др. 2020; Lu R. et al., 2020; Jin Y. et al., 2020).

Весьма стремительное распространение в мире, необычные клинические «маски» и течение заболевания, мутация возбудителя, его тропизм к определенным рецепторам системы «ренин-ангиотензин-альдостерон» (РААС) с последующим встраиванием генома вируса в клетку-хозяина (легкие, кровеносные сосуды, сердце и прочее) диктуют необходимость изучения патогенеза COVID-19.

На основании выполненных разными авторами аутопсий, результатов иммунологических исследований при данном заболевании, описаны наиболее часто встречаемые патологические и патофизиологические феномены. К ним относятся: острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) с поражением легких, феномен «цитокинового шторма» с избыточной продукцией и секрецией моноцитарно-макрофагальной системой интерлейкинов-6, 8, фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α), поражение сосудов. Наиболее тяжелые морфологические изменения возникают в легких (Зайратьянц О.В., и др. 2020; Corin M.-C., Parmentier E., Duburcq T., 2020; Carsana L. et al., 2020).

Вирус SARS-CoV-2 может оказывать цитопатическое действие на клетки альвеолярного эпителия (альвеолоциты I, II типов), эндотелий кровеносных сосудов посредством фиксации возбудителя к рецептору ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа. Этим объясняется быстрое повреждение аэрогематического барьера. Аэрогематический барьер состоит из альвеолоцитов I, II типов, которые расположены на базальной мембране, капилляров, экстрацеллюлярного матрикса, в котором имеются фибробласты, перициты, немногочисленные лимфоциты и тканевые макрофаги.

Патологические изменения, в том числе цитопатическое повреждение альвеолоцитов, стенок сосудов, интерстиция, влекут за собой изменение синтеза и секреции белка сурфактанта, обеспечивающего эластичность легочной ткани, и повышение сосудистой проницаемости с развитием острой воспалительной реакции в легочной ткани (Забозлаев Ф.Г. и др., 2020; Рыбакова М.Г. и др., 2020; Смирнов А.В. и др., 2021).

Несмотря на то, что при COVID-19 описаны различные медико-биологические эффекты вируса SARS-CoV-2 – цитопатический, оксидативный стресс с образованием свободных радикалов и активацией перекисного окисления липидов, активация макрофагальной системы с развитием цитокинового шторма, иммунологическая дисрегуляция – все эти патологические изменения требуют своей характеристики в разные сроки развития заболевания. В этой связи изучение патологоанатомических изменений сосудов легких при COVID-19 в динамике развития имеет важное фундаментальное и клиническое значение.

Таким образом, изучение патоморфологических, иммуногистохимических изменений сосудов легких в разные сроки развития COVID-19, а также выполнение компьютерной морфометрии и статистического анализа полученных результатов позволит уточнить патогенетические особенности заболевания.

Степень разработанности темы. Научно-исследовательских работ, посвященных патоморфологической и иммуногистохимической характеристике сосудов легких при COVID-19 в динамике развития, нам не встретилось. Отдельными отечественными исследователями (Забозлаев Ф.Г. и др., 2020; Самсонова М.В. и др., 2020) представлены фрагментарные описания состояния сосудов легких при COVID-19, без уточнения морфологических и иммуногистохимических особенностей, в том числе маркеров эндотелиальной дисфункции, компонентов клеточного звена иммунитета, оценки паренхиматозного и васкулярного компонентов вирусной пневмонии.

Кроме того, в исследованиях не применялись методы компьютерной морфометрии с

последующей статистической обработкой полученных результатов патологических изменений сосудов легких при COVID-19 при разной длительности течения заболевания.

Цель исследования – изучить патоморфологические и иммуногистохимические изменения сосудов легких в разные сроки летальных исходов COVID-19.

Задачи исследования:

1. Оценить патоморфологические и иммуногистохимические изменения кровеносных сосудов легких при COVID-19 при разной длительности заболевания – через 0-14, 15-21, 22-40 суток после начала заболевания.
2. Изучить экспрессию маркеров CD31 и фактора Виллебранда при COVID-19, как показателей эндотелиальной дисфункции, связанных с тромбообразованием и ремоделированием легочной ткани.
3. Установить динамику воспалительной реакции в легких в разные сроки летальных исходов COVID-19 и их иммуногистохимические особенности.

Научная новизна. Впервые на секционном материале отражена динамика морфологических изменений кровеносных сосудов легких при COVID-19 пневмонии в зависимости от продолжительности заболевания до летального исхода. Выявлены острые нарушения кровообращения (стаз, полнокровие, плазматическое пропитывание) (0 – 14 сут), деструктивные и реологические процессы (фибриноидное набухание, некроз, тромбоз) (15 – 21 сут), гиперпластические изменения клеток эндотелия и перекалибровка сосудов (22 – 40 сут).

Впервые установлено, что маркеры эндотелиальной дисфункции (CD31, vWF) через 2 нед экспрессированы в сосудах микроциркуляторного русла и в более крупных артериях. Через 3 нед регистрируется линейно-дискретная экспрессия vWF в эндотелиоцитах мелких кровеносных сосудов, что может быть связано с развитием гиперкоагуляционного состояния с тромбообразованием. Показано, что в основе поражения сосудов легких при COVID-19 лежит прогрессирующая эндотелиопатия (увеличение соотношения маркеров эндотелиальной дисфункции CD31/vWF).

Воспалительные изменения в легких при COVID-19 имеют стадийный характер и характеризуются экссудацией (0 – 14 сут), экссудацией и некрозом (15 – 21 сут), пролиферацией и фиброзом (22 – 40 сут) с прогрессирующим снижением соотношения CD15/CD68.

Впервые, по данным иммуногистохимического анализа, установлено, что количество CD45+ клеток во все сроки развития COVID-19 больше, чем CD3+ лимфоцитов, что отражает недостаточную активность последних в процессах клеточной регуляции в ответ на воспаление. При COVID-19 в легких отмечается нарастание количества CD68 макрофагов в динамике заболевания, что подтверждается снижением соотношения CD15/CD68 с 1,21 через первые две недели до 0,24 через 22 – 40 суток. Полученные данные свидетельствуют об активации макрофагального звена иммунитета.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания о динамике патоморфологических изменений сосудов легких при COVID-19. Результаты исследования имеют большое значение для уточнения патогенеза COVID-19 в разные сроки заболевания. В клинической практике результаты исследования могут быть применены для прогностической оценки тромбоза, ремоделирования сосудов и легких при COVID-19. Использование компьютерной морфометрии для оценки степени выраженности иммуногистохимических реакций в легких при COVID-19 позволяет получить объективную количественную характеристику компонентов воспалительного клеточного инфильтрата, степени выраженности патологических процессов в легких.

Полученные результаты целесообразно использовать в образовательном процессе при подготовке врачей-патологоанатомов, инфекционистов, эпидемиологов.

Методология и методы исследования. Гистологическое исследование: определение выраженности экссудативного, пролиферативного воспаления, фиброза легких в разные сроки COVID-19 (характер экссудата, наличие фибрина, гиалиновых мембран, клеточная

инфильтрация), дисциркуляторных изменений (стаз, полнокровие), нарушение сосудистой проницаемости сосудов микроциркуляторного русла, артерий мелкого и среднего калибра (плазматическое пропитывание, фибриноидное набухание и некроз), реологические расстройства (строение тромбов, распространенность в сосудах, отношение к просвету). Иммуногистохимическое исследование: определение выраженности клеточной инфильтрации легких в разные сроки COVID-19 (CD45, CD3, CD15, CD68), оценка маркеров эндотелиальной дисфункции сосудов (CD31, фактор Виллебранда), структуры базальных мембран аэрогематического барьера (коллаген IV). Компьютерная морфометрия с целью определения количественных показателей инфильтрата (количество отдельных клеточных элементов, площадь инфильтрата, площадь фиброза) с помощью специального программного обеспечения. Статистические методы исследования: статистический анализ данных с помощью персонального компьютера и необходимого программного обеспечения (MedCalc Statistical Software version 19.1.2, Бельгия).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. COVID-19 пневмония имеет стадийный характер с развитием экссудативных (0 – 14 сут), экссудативно-некротических (15 – 21 сут), пролиферативно-фибротических (22 – 40 сут) процессов.
2. При COVID-19 пневмонии наблюдается прогрессирующая эндотелиопатия в виде острых циркуляторных нарушений (0 – 14 сут), деструктивных и реологических процессов (15 – 21 сут), гиперпластических и фибротических изменений (22 – 40 сут), которая оценивается по увеличению соотношения CD31/vWF (в 9 раз через 22 – 40 сут).
3. Во все сроки развития COVID-19 пневмонии нарастает количество CD45+, CD68+ клеток по сравнению с CD3+, CD15+ клетками, что подтверждается снижением соотношения CD15/CD68 в 5 раз через 22 – 40 сут.

Степень достоверности результатов подтверждается достаточной эмпирической базой (80 протоколов вскрытий), использованием комплексного патоморфологического анализа (световая микроскопия, иммуногистохимический анализ, морфометрический анализ), адекватным статистическим анализом полученных данных, а также наличием публикаций, подробно описывающих методику и результаты, полученных при выполнении исследования. Основные положения диссертации соответствуют пп. 1, 2, 3 и 4 паспорта специальности «Патологическая анатомия».

Апробация работы. Материалы исследования представлены на 8-й итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2021); VI съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы», посвящённой 100-летию со дня образования Государственной санитарно-эпидемиологической службы России (Екатеринбург, 2022); заседании кафедры патологической анатомии Ростовского государственного медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, а также одна – в журнале, индексируемом в базе Scopus.

Реализация результатов исследования. Основные результаты работы внедрены в практику работы патологоанатомического отделения морфологического отдела клиники Ростовского государственного медицинского университета, отделения патологической анатомии ФГБУЗ ЮОМЦ ФМБА России, Ростов-на-Дону. Научные положения диссертации используются в образовательном процессе на кафедрах патологической анатомии, оперативной хирургии, клинической анатомии и патологической анатомии Ростовского государственного медицинского университета.

Личный вклад автора. Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор также самостоятельно осуществил микроскопию и фотографирование гистологических препаратов, разработал алгоритм компьютерной морфометрии, выполнил статистическую обработку полученных данных.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 107 стр. компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Использовано 187 литературных источников, из них 13 – отечественных авторов; содержит 5 таблиц и 60 рисунков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования использован архивный секционный материал, полученный во время вскрытий 80 умерших пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 с помощью ПЦР-исследования и компьютерной томографии легких за период 2020 – 2021 г.

Вскрытия выполняли в специально подготовленных для проведения особо опасных инфекций моргах патологоанатомических отделений «Ростовского патологоанатомического бюро» (главный врач – к.м.н. Резникова Г.Л.), областной клинической больницы № 1 ФМБА России (заведующий патологоанатомическим отделением – Полесовой Ф.Г.). В соответствии с Федеральным законом от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», п. 4, ст. 67, проведение патологоанатомических вскрытий и выполнение морфологических исследований являются неотъемлемой частью диагностического процесса для оценки основного заболевания, установления причины смерти и других состояний.

Характеристика материала. Во время аутопсий оценивали размеры легких, состояние кровенаполнения, состояние поверхности, вид на разрезе, наличие включений и патологических изменений легочной ткани, в том числе состояние просветов кровеносных сосудов, наличие или отсутствие в них тромбов, посмертных кровяных свертков. При вскрытии сердца обращали внимание на размеры, состояние полостей, наличие или отсутствие тромбов или посмертных кровяных свертков, наличие или отсутствие патологических изменений в клапанном аппарате (эндокардит, пороки, тромботические наложения).

Непосредственной причиной смерти больных при COVID-19 были: острый респираторный дистресс-синдром (45%), тромбоз ветвей легочной артерии (30%), полиорганная недостаточность (25%).

Вскрытие легких проводили по традиционной схеме, с верхних дыхательных путей до нижних дыхательных путей и легочной паренхимы. Наиболее измененные участки легочной ткани (плотные, лаковые, отечные, резко полнокровные) иссекали в виде образцов размерами не менее 2х2 см, отдельно забирали материал для выполнения посмертного ПЦР-исследования с последующим обнаружением вируса SARS-CoV-2.

Среди умерших было 42 мужчины, 38 женщин, средний возраст которых составил 69±9,92 лет. Анализ эпикризов историй болезни умерших пациентов с COVID-19 позволил выявить наличие сопутствующей патологии: сахарный диабет (32,2%), артериальная гипертензия (86,4%), ожирение (33,4%).

Поражение легких, по данным компьютерной томографии (КТ), в среднем составило 72,7%.

Во всех изученных наблюдениях в клиническом и патологоанатомическом диагнозах COVID-19 был выставлен в качестве основного заболевания.

Учитывая различные морфологические изменения в легких при COVID-19, давность развития первых клинических признаков заболевания, были выделены следующие хронологические группы: 1) 0 – 14 сут; 2) 15 – 21 сут; 3) 22 – 40 сут. В соответствии с предложенной временной градацией развития острого инфекционного заболевания, мы проводи-

ли морфологическую, иммуногистохимическую оценку состояния паренхимы легких и сосудов. Для определения степени поражений сосудов легких мы разработали и использовали шкалу полуколичественной оценки следующих признаков: стаз эритроцитов, альтерация эндотелиоцитов, тромбоз, нейтрофильная инфильтрация стенок сосудов, фибриноидные изменения, гиперплазия эндотелия, регенерация эндотелия, которое было основано на подсчете пораженных сосудов легких в 10 полях зрения (при увеличении в 200 раз), выраженное в процентах – отсутствие признака (0%), слабый признак (1-25%) +, умеренный признак (26 – 50%) ++, выраженный признак (51 – 75%) +++, резко выраженный признак (76 – 100%) ++++. Данный метод полуколичественной оценки морфологических признаков был дополнен исследованием с помощью компьютерной морфометрии и статистического анализа.

Для проведения морфометрического анализа использовали программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ (US National Institutes of Health, США) и фотографированием микропрепаратов. Для препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, осуществляли измерение количества клеточных элементов в инфильтрате в 10 полях зрения при увеличении в 200 раз. После выполнения гистохимического окрашивания пикрофуксином по ван Гизону, иммуногистохимических реакций, определяли площадь, занимаемую красителем в клеточном инфильтрате. Критерием интенсивности реакции или выраженности патологического процесса служил коэффициент площади окрашивания (КПО) – отношение суммарной площади цветного продукта окрашивания к общей площади гистологического препарата, выраженное в процентах (Веревкин А.А. и др., 2020).

Для оценки состояния сосудов различного калибра, а также структурных изменений в стенках альвеол, интерстиция, было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием антител (табл. 1).

Таблица 1. Первичные антитела с указанием разведения

Название антитела	Производитель (фирма)	Клон	Происхождение антитела	Разведение
CD3	Cell Marque, США	MRQ-39	rabbit monoclonal antibody	1:200
CD15	Cell Marque, США	MMA	mouse monoclonal antibody	rtu
CD31	Cell Marque, США	клон JC70	mouse monoclonal antibody	rtu
CD45	Cell Marque, США	LCA2811&PD71 28	mouse monoclonal antibody	1:200
CD68	Cell Marque, США	Kp-1	rabbit monoclonal antibody	1:200
Коллаген IV	Cell Marque, США	клон CIV22	mouse monoclonal antibody	1:100
фактор Виллебранда	Cell Marque, США	factor VIII-R Ag	rabbit polyclonal antibody	rtu

В соответствии с разработанным алгоритмом морфометрического исследования, нами был использован метод компьютерной морфометрии, который позволил представить достоверную морфологическую картину полученных изменений в легких при COVID-19.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с применением статистических инструментов программы MedCalc Statistical Software Version 19.1.3. Значения всех выборок подвергли проверке на характер распределения с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различия выборочных значений оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Нулевую гипотезу отвергали при пороговом значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Патоморфологические изменения в сосудах легких в течение 0 – 14 сут развития COVID-19

Среди умерших данной хронологической группы было 24 больных, что составило 30% от всех вскрытий; среди них было 12 мужчин и 12 женщин. Средний возраст больных составил 70,6 лет $\pm 10,36$ (возрастной диапазон – 49 – 89 лет).

Всем больным на этапе госпитализации выполняли компьютерную томографию легких, которая выявляла признаки интерстициальной вирусной пневмонии (симптомы «матового стекла») с поражением в среднем 67% ткани легких. Во всех наблюдениях в клиническом и патологоанатомическом диагнозах в качестве основного заболевания выступала новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Среди сопутствующих заболеваний у больных отмечались: артериальная гипертензия (87,5%), сахарный диабет 2-го типа (54,2%), ожирение 1 – 2-й степени (33,3%).

Макроскопическими признаками COVID-19 пневмонии были резкое увеличение размеров легких (в среднем до 26x15x10 см), темно-красный цвет, отечность, лаковый вид, в нижних отделах – маловоздушность. На разрезе ткань легких была умеренно отечной, полнокровной, просветы бронхов содержали небольшое количество слизи.

Микроскопически среди патологических признаков поражений сосудов легких были выявлены острые расстройства кровообращения, наиболее выраженные в сосудах микроциркуляторного русла легких (стаз, полнокровие, плазматическое пропитывание). Просветы альвеол содержали умеренное количество полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов), местами имеющих признаки кариорексиса, десквамированные клетки альвеолярного эпителия, единичные альвеолярные макрофаги. В стенках альвеол нередко встречались отложения белковых масс по типу гиалиновых мембран, с резким их утолщением, в окружающей интерстициальной ткани отмечалась умеренно выраженная нейтрофильная и гистиоцитарная инфильтрация.

Иммуногистохимические изменения в сосудах легких в течение 0 – 14 сут развития COVID-19

Для оценки структурных изменений в стенках альвеол, интерстиция, а также состояния сосудов различного калибра, было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к CD3, CD45, CD20, CD15, CD68, CD31, vWF, коллагену IV типа.

Представленный набор антител отражает количественные и качественные показатели клеток иммунокомпетентной системы, в том числе клеточного звена иммунитета (CD3, CD45, CD15, CD68), а также позволяет визуализировать морфологические признаки эндотелиальной дисфункции (по экспрессии CD31, vWF), стенок кровеносных сосудов и альвеол легких (по экспрессии коллагена IV типа).

Результаты иммуногистохимических исследований легких при COVID-19 в сроки 0 – 14 сут от начала заболевания демонстрируют определенные особенности их поражения. Клеточная инфильтрация легочной ткани представлена преимущественно моноцитами и макрофагами (CD15+, CD68+), которые локализуются как в просветах альвеол, так и вокруг сосудов микроциркуляторного русла. В то же время инфильтрация CD3+, CD45+ клетками выражена в меньшей степени по сравнению с моноцитарно-макрофагальной инфильтрацией, с преимущественной локализацией вокруг мелких кровеносных сосудов легких.

Маркеры эндотелиальной дисфункции (CD31, vWF) экспрессировались в сосудах микроциркуляторного русла (капилляры, артерии мелкого калибра) и в более крупных артериях. При этом отмечалась гиперэкспрессия vWF в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов различного калибра.

Базальные мембраны альвеол на большем протяжении были сохранены, содержали коллаген IV типа без выраженных деструктивных изменений в кровеносных сосудах и

альвеол легочной ткани.

Острые экссудативные изменения в легких представлены гиалиновыми мембранами стенок альвеол, преобладанием в просветах альвеол CD68+ макрофагов, умеренной экспрессией белков CD3+, CD15+, CD45+ преимущественно периваскулярно.

Гиперэкспрессия белка vWF, CD31+ в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов отражала эндотелиальную дисфункцию, что, вероятно, могло способствовать дисрегуляции свертывающей системы крови с началом тромбообразования.

Патоморфологические изменения в сосудах легких в течение 15 – 21 сут развития COVID-19

Среди умерших данной хронологической группы было 30 человек, что составило 37,5% всех вскрытий, среди них было 14 мужчин и 16 женщин; средний возраст больных составил $71,5 \pm 8,25$ лет, возрастной диапазон – 45 – 85 лет.

Всем больным на этапе госпитализации выполнялась компьютерная томография легких, которая выявляла признаки интерстициальной вирусной пневмонии (симптомы «матового стекла») с поражением в среднем 72% легких. Во всех наблюдениях в клиническом и патологоанатомическом диагнозах в качестве основного заболевания выступала новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Среди сопутствующих заболеваний у больных отмечались: артериальная гипертензия (83,3%), сахарный диабет 2-го типа (23,3%), ожирение 1 – 2-й степени (40%).

При макроскопическом исследовании легкие были увеличены в размерах, темно-красного цвета, с поверхности разреза стекала в небольшом количестве геморрагическая отечная жидкость. Листки плевры были гладкими, резко полнокровными. Просветы бронхов содержали умеренное количество слизисто-геморрагического содержимого.

После просмотра гистологических препаратов с признаками COVID-19 пневмонии производили отбор важных для диагностики микропрепаратов с рутинной окраской гематоксилином-эозином, после чего отдельные гистологические срезы окрашивали пикрофуксином по ван Гизону, по Хочкису. Из наиболее пораженных участков легочной ткани при COVID-19 выбирали гистологические срезы, которые в дальнейшем подвергали иммуногистохимическому исследованию с антителами к CD3, CD45, CD15, CD68, CD31, фактору Виллебранда, коллагену IV типа.

В течение 15 – 21 сут от начала заболевания COVID-19 в просветах мелких и средних ветвей легочной артерии выявлялись обтурирующие смешанные тромбы, представленные глыбками фибрина, окруженными лизированными эритроцитами. Просветы отдельных средних ветвей легочной артерии были дилатированы, содержали пристеночные тромбы, состоящие из лизированных эритроцитов и фибрина. Во внутренней и средней оболочках артерий отмечалась умеренно выраженная нейтрофильная инфильтрация с альтерацией отдельных групп эндотелиальных клеток и развитием фибриноидного набухания и некроза клеток.

В окружающей легочной паренхиме отмечалась резко выраженная нейтрофильная, моноцитарно-макрофагальная инфильтрация с лизисом отдельных межалвеолярных перегородок, очаговым скоплением в них гиалиновых мембран. В части клеточного воспалительного инфильтрата наблюдались кариорексис нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, что указывало на их токсическое повреждение. Обращало на себя внимание наличие гиперплазии альвеолоцитов отдельных групп альвеол, что указывало на ремоделирование легочной паренхимы.

При гистохимическом исследовании гистопрепаратов, окрашенных пикрофуксином по ван Гизону, ШИК-реакции по Хочкису, было установлено, что стенки кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров были сохранены, просветы их дилатированы, содержали ШИК+ материал. Данные морфологические изменения характерны для повышения сосудистой проницаемости с развитием плазматического пропитывания стенок артерий мелко-

го и среднего калибров.

Иммуногистохимические изменения в сосудах легких в течение 15 – 21 сут развития COVID-19

Анализ экспрессии белка CD3+ Т-лимфоцитов показал очаговую цитоплазматическую реакцию вокруг мелких кровеносных сосудов, по ходу межалвеолярных перегородок. Общий лейкоцитарный антиген – CD45 – обнаруживался очагово-дискретно в виде цитоплазматической экспрессии белка в межалвеолярных перегородках легкого, вокруг отдельных кровеносных сосудов. Маркер моноцитов – CD15 – отмечался в виде дискретной цитоплазматической экспрессии белка в строме межалвеолярных перегородок, вокруг отдельных кровеносных сосудов.

В указанные сроки развития COVID-19 выявлялась выраженная цитоплазматическая экспрессия белка CD68+ макрофагов в просветах альвеол, вокруг кровеносных сосудов легких.

При оценке васкулярных изменений в легочной ткани обращали внимание особенности экспрессии белков CD31, vWF. Данные белки по-разному экспрессировались в сосудах микроциркуляторного русла, мелких и средних ветвях легочной артерии. Так, была выражена яркая линейная экспрессия белка CD31+ в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов мелкого и среднего калибра легких, в то же время отмечалась дискретная экспрессия белка CD31+ в отдельных клетках эндотелия средней ветви легочной артерии. В эндотелиоцитах мелких кровеносных сосудов наблюдалась линейно-дискретная экспрессия белка vWF.

При анализе структурных компонентов стенок артерий мелкого калибра – коллагена IV типа – отмечалась яркая мембранно-цитоплазматическая экспрессия, по сравнению с очаговой негативной экспрессией белка в капиллярах разрушенных межалвеолярных перегородок.

Патоморфологические изменения в сосудах легких при развитии COVID-19 в течение 22 – 40 сут

Среди умерших данной хронологической группы было 26 человек, что составило 32,5% всех вскрытий; среди них было 16 мужчин и 10 женщин. Средний возраст больных составил $64,9 \pm 10,37$ лет, возрастной диапазон – 38 – 85 лет.

Всем больным на этапе госпитализации выполняли компьютерную томографию легких, которая выявляла признаки интерстициальной вирусной пневмонии (симптомы «матового стекла») с поражением в среднем 79% легких.

Во всех наблюдениях в клиническом и патологоанатомическом диагнозах в качестве основного заболевания выступала новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Среди сопутствующих заболеваний у больных отмечались: артериальная гипертензия (88,5%), сахарный диабет 2-го типа (19,2%), ожирение 1 – 2-й степени (26,9%).

Макроскопически легкие были умеренно увеличены в размерах, пестрого вида с участками темно-красного цвета, плотной консистенции, с развитием вокруг бронхов белесоватой тонкой ткани, что указывало на очаги пневмофиброза.

Гистологический и гистохимический анализ изменений легких при COVID-19 в указанные сроки развития заболевания выявил определенные особенности. Васкулярный компонент COVID-19 пневмонии был представлен изменениями в сосудах мелкого калибра с формированием обтурирующих тромбов с признаками начала организации, гиперплазией клеток эндотелия. Обращало на себя внимание новообразование сосудов мелкого калибра, капилляров, с развитием полей ангиоматоза, признаками плазматического пропитывания их стенок за счет накопления ШИК+ веществ.

Альвеолярный компонент COVID-19 пневмонии был представлен зонами формирования фиброзных узелков, состоящих из фибробластов, макрофагов, лимфоцитов, окружен-

ных коллагеновыми волокнами. Гистоархитектоника легких была нарушена, нормальные альвеолярные структуры встречались крайне редко. Кроме того, в легких выявлялись участки гиперплазии клеток альвеолярного эпителия с умеренно выраженной лимфоцитарной, макрофагальной инфильтрацией стромы, ремоделированием легких: развитием рыхлой волокнистой соединительной ткани вокруг кровеносных сосудов, бронхов, гиперплазией альвеолярных клеток, дистелектазами.

Иммуногистохимические изменения в сосудах легких в течение 22 – 40 сут развития COVID-19

При изучении белков CD3 в легочной ткани отмечалась очаговая цитоплазматическая экспрессия как периваскулярно, так и в интерстиции. При этом при COVID-19 пневмонии CD45+ лимфоцитарная инфильтрация была умеренно выраженной, диффузной.

CD15+ моноцитарная инфильтрация была незначительной, представлена отдельными группами клеток, расположенными преимущественно периваскулярно, по ходу межалвеолярных перегородок. В то же время CD68+ макрофагальная инфильтрация была резко выраженной как в интерстициальной ткани по ходу сохранившихся межалвеолярных перегородок, так и преобладающей в фиброзных узелках.

Экспрессия белков – маркеров эндотелиальной дисфункции, CD31, vWF – в новообразованных кровеносных сосудах мелкого калибра была умеренно выраженной, расположенной диффузно при COVID-19 пневмонии. Экспрессия коллагена IV типа была выраженной в отдельных мелких артериях, на большем протяжении в легких экспрессия данного белка была негативной.

Таким образом, иммуногистохимическое исследование легких при COVID-19 пневмонии через 22 – 40 сут развития заболевания показало преобладание CD68+ макрофагов над другими клеточными элементами (CD3, CD45, CD15) как в структурах фиброзных узелков, так и в просветах альвеол, по ходу интерстиция. Отмечены явления перестройки сосудов микроциркуляторного русла с развитием неоангиогенеза, умеренная экспрессия CD31+ и vWF в новообразованных сосудах.

Компьютерная морфометрия и статистическая обработка данных легких при COVID-19 в разные сроки развития заболевания

Проведенное морфометрическое исследование легких при COVID-19 пневмонии показало своеобразные изменения в динамике заболевания. Так, в течение 0 – 14 сут COVID-19 пневмонии выявлены острые экссудативные изменения в легких, которые были представлены гиалиновыми мембранами стенок альвеол, преобладанием в просветах альвеол таких клеток воспаления, как CD68+ по сравнению с другими элементами. Анализ коэффициента площади окрашивания (КПО) продемонстрировал следующие показатели клеток воспаления: CD68 = 3,71 [3,55; 3,85]%, CD3 = 2,06 [2,01; 2,15]%, CD15 = 4,49 [4,13; 4,67]%, CD45 = 5,93 [5,37; 6,44]% (рис. 1, А).

Гиперэкспрессия сосудистых маркеров (КПО vWF = 4,25 [4,16; 4,33]%, КПО CD31 = 2,91 [2,84; 2,99]%) выявлялась в клетках эндотелия кровеносных сосудов легких, что отражало эндотелиальную дисфункцию и, вероятно, могло способствовать дисрегуляции свертывающей системы крови с началом тромбообразования (рис. 1, Б).

Через 15 – 21 сут от начала развития коронавирусной пневмонии наблюдалось незначительное уменьшение КПО CD68 в сравнении с аналогичным показателем в период 0 – 14 сут ($p < 0,05$). В эти же сроки КПО CD3 снизился в 1,6 раза ($p < 0,05$), экспрессия CD15 уменьшилась в 1,5 раза ($p < 0,05$), наконец, КПО CD45 уменьшился в 1,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 2, А). Интересными были иммуногистохимические изменения стенок сосудов легких при COVID-19 в течение 15 – 21 сут от начала заболевания. Так, экспрессия белка CD31 была в 2,5 раза выше аналогичной величины для первой группы ($p < 0,05$), а экспрессия vWF была в 1,9 раза ниже таковой в первой группе и колебалась от 2,01% до 2,35% площади среза

($p < 0,05$) (рис. 2, Б).

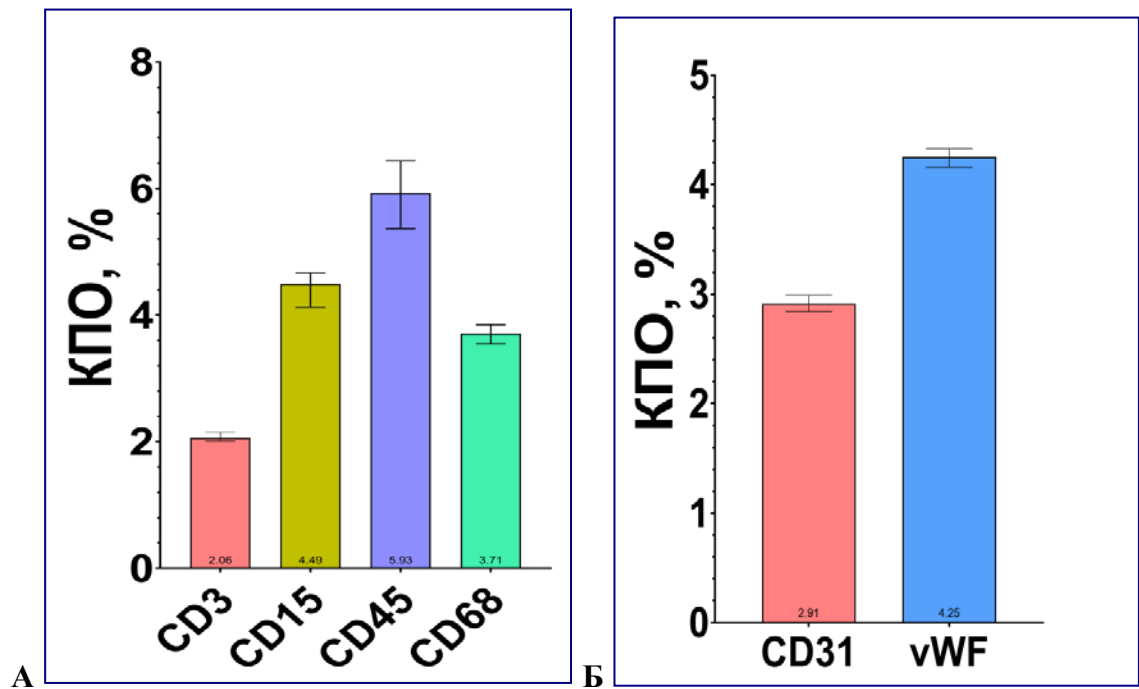


Рис. 1. Количественная характеристика воспалительного инфильтрата в легких (А) и компьютерная морфометрия маркеров CD31 и vWF (Б) при COVID-19 пневмонии в течение 0 – 14 сут.

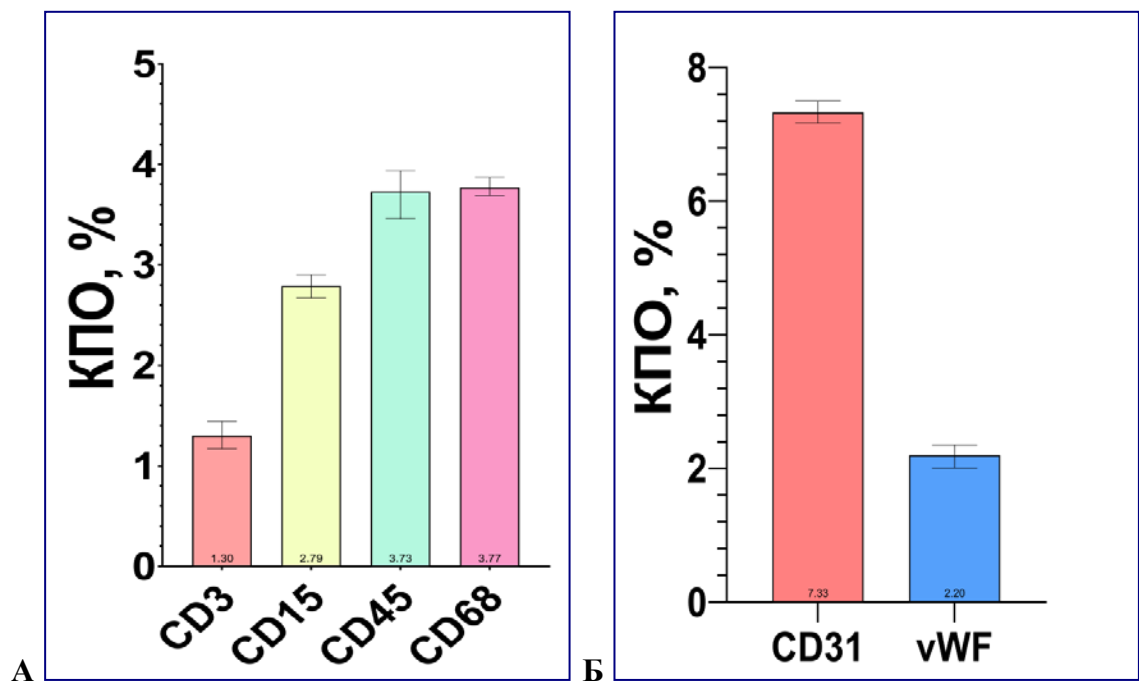


Рис. 2. Количественная характеристика воспалительного инфильтрата в легких (А) и компьютерная морфометрия маркеров CD31 и vWF (Б) при COVID-19 пневмонии в течение 15 – 21 сут.

В более поздние сроки развития COVID-19 пневмонии (в течение 22 – 40 сут) на основании компьютерной морфометрии также были получены количественные характеристики воспалительного инфильтрата и состояния сосудистого русла лёгких (рис. 3, А). Пре-

обладающим клеточным элементом были CD68-позитивные макрофаги. Их КПО увеличилось в 1,5 раза по сравнению с предыдущей группой ($p < 0,05$). Количество CD3-позитивных Т-лимфоцитов снизилось в два раза в сравнении с группой умерших через 15 – 21 сут ($p < 0,05$); также отмечено уменьшение КПО моноцитов (CD15+) в 2,2 раза ($p < 0,05$), в то время как экспрессия общего лейкоцитарного антигена CD45 уменьшилась в 1,3 раза ($p < 0,05$).

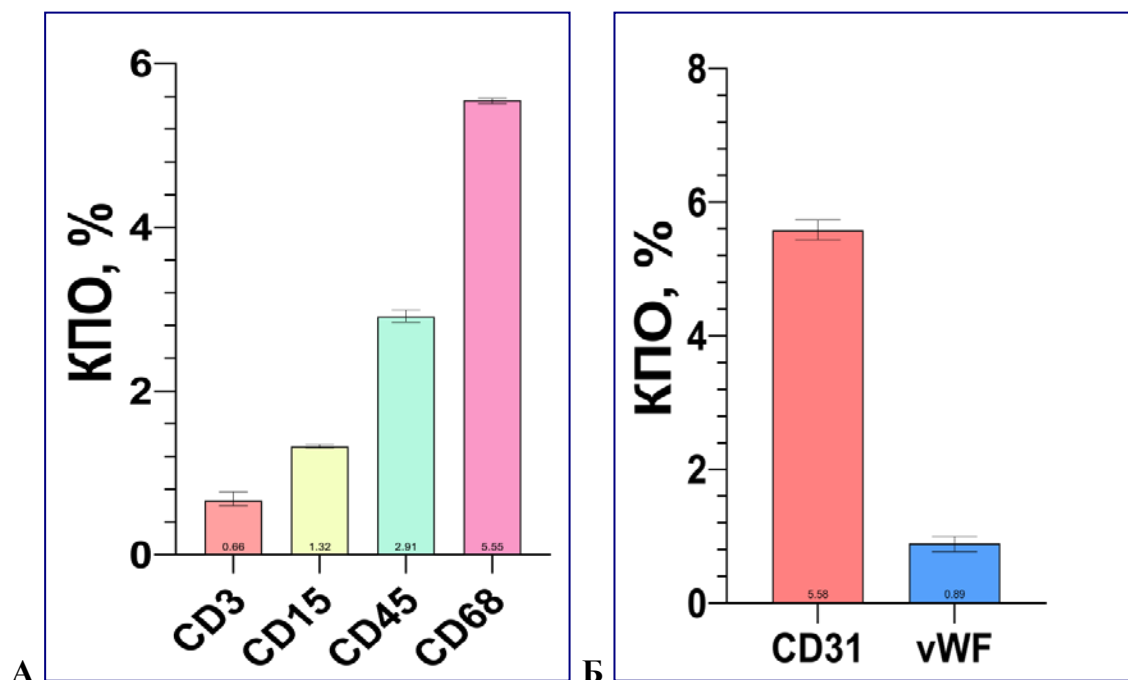


Рис. 3. Количественная характеристика воспалительного инфильтрата в легких (А) и компьютерная морфометрия маркеров CD31 и vWF (Б) при COVID-19 пневмонии в течение 22 – 40 сут.

Экспрессия молекул клеточной адгезии (CD31) снизилась в 1,3 раза по сравнению с предыдущей группой ($p < 0,05$). Коэффициент площади окрашивания фактора Виллебранда также снизился относительно группы умерших через 15 – 21 сут – в 2,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 3, Б). Гистологическое и гистохимическое исследование сосудов и легочной паренхимы при COVID-19 пневмонии в разные сроки заболевания выявило различные патологические процессы (рис. 4). На основании проведенного иммуногистохимического исследования легких в разные сроки COVID-19 пневмонии, статистического анализа полученных данных путем компьютерной морфометрии нами были получены следующие результаты (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение историй болезни и протоколов вскрытий 80 умерших в ковидных госпиталях в разные сроки заболевания, оценка результатов патологоанатомических исследований секционного материала COVID-19 пневмонии, рутинное гистологическое исследование позволило выявить различные морфологические изменения сосудов легких. Учитывая тот факт, что в современной литературе, посвященной изучению патологоанатомической характеристики сосудов легких при COVID-19, не приведено подробного описания их состояния в различные сроки заболевания, мы решили выполнить данное исследование с использованием методов иммуногистохимии и компьютерной морфометрии.

На основании полученных данных нами были выделены три хронологические группы COVID-19 пневмонии: 1) 0 – 14 сут; 2) 15 – 21 сут; 3) 22 – 40 сут.

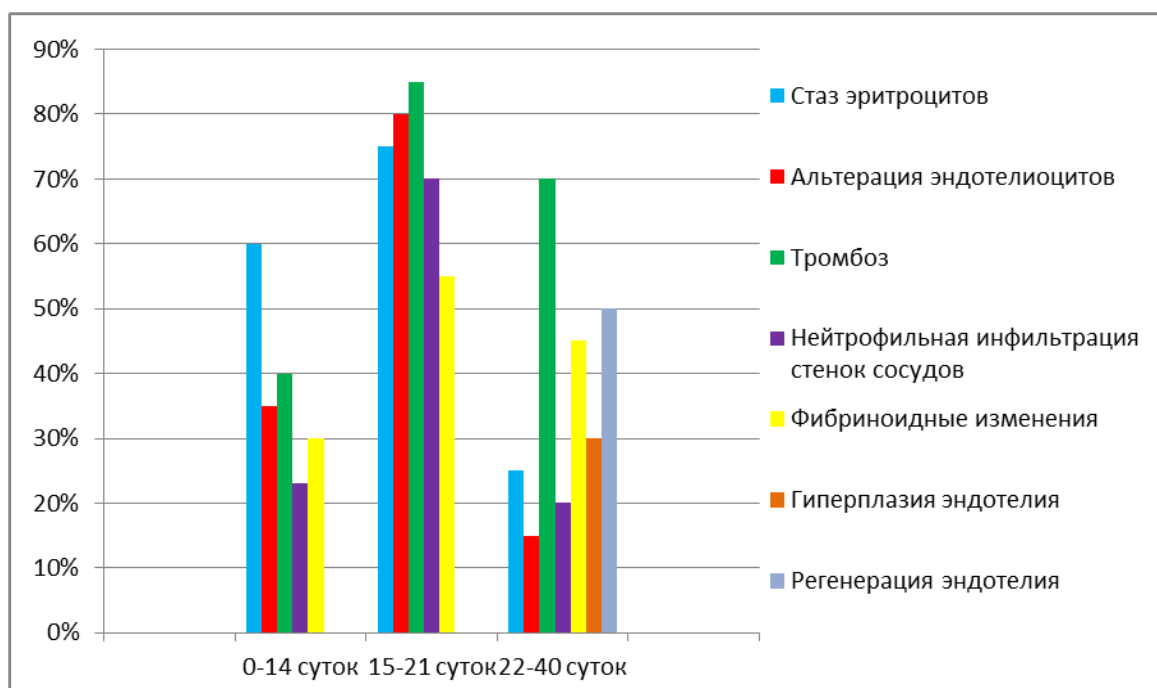


Рис. 4. Патоморфологические изменения сосудов легких при COVID-19 в разные сроки развития заболевания.

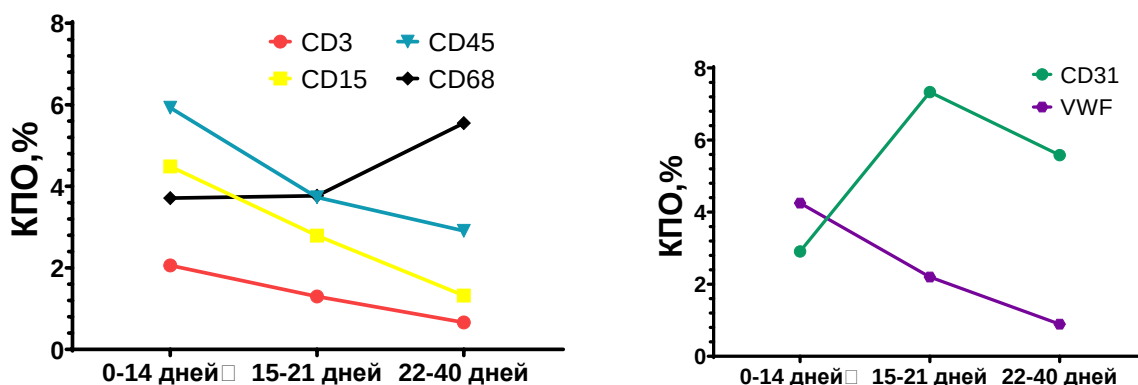


Рис. 5. Соотношения CD3, CD15, CD45, CD68 (А) и распределение CD31, vWF (Б) при COVID-19 в разные сроки развития заболевания.

Было установлено, что в течение 21 сут развития COVID-19 пневмонии в легких возникают экссудативные и экссудативно-некротические изменения как паренхимы, так и сосудов. В легких отмечался внутриальвеолярный отек, гиалиновые мембраны стенок альвеол, нейтрофильная инфильтрация, некроз отдельных межальвеолярных перегородок. В сосудах микроциркуляторного русла, артериях мелкого и среднего калибра легких имелись признаки повышенной проницаемости, плазматическое пропитывание, фибриноидное набухание и некроз в сочетании с фибриновыми, смешанными тромбами.

В более поздние сроки (в течение 22 – 40 сут) развития COVID-19 пневмонии возникали пролиферативные и фибротические процессы, которые характеризовались развитием интерстициального фиброза, фиброзно-макрофагальных узелков, состоящих из CD68+ макрофагов, фибробластов. В сосудах легких в эти сроки отмечалось ремоделирование артерий мелкого и среднего калибра за счет гиперплазии эндотелиоцитов, перекалибровки

просветов сосудов, тромбов с признаками организации. В легких развивался неоангиогенез с выраженной экспрессией белков CD31, vWF.

Значимыми оказались взаимоотношения между CD31 и vWF в разные сроки COVID-19 пневмонии. В течение 0 – 14 сут соотношение CD31/vWF равнялось 0,68, в сроки 15 – 21 сут – 3,33, через 22 – 40 сут – 6,27. По-видимому, данные иммуногистохимические особенности обусловлены альтерацией эндотелиоцитов кровеносных сосудов легких и ремоделированием, что объясняет разную степень выраженности экспрессии эндотелиальных маркеров.

На основании полученных результатов исследования можно считать, что экспрессия CD31 и vWF, начиная с 3-й недели развития COVID-19 пневмонии, отражает состояние свертывающей и противосвертывающей систем крови, что имеет большое практическое значение в прогнозировании сосудистых осложнений у больных.

Соотношение пула клеток CD15/CD68 в легких в течение 0 – 14 сут составило 1,21, через 15 – 21 сут – 0,74, через 22 – 40 сут – 0,24 ($p < 0,05$ при попарном сравнении выборок). Полученные данные отражают динамику активности макрофагов в разные сроки заболевания с преобладанием CD68+ клеток через 22 – 40 сут заболевания.

ВЫВОДЫ

1. По данным комплексного патоморфологического исследования, в сосудах легких при COVID-19 в зависимости от длительности заболевания регистрируются разные по характеру и выраженности гемодинамические нарушения: стаз эритроцитов, полнокровие, альтерация эндотелиоцитов, плазматическое пропитывание (0 – 14 сут), деструктивные и реологические изменения (15 – 21 сут), фибриноидное набухание и некроз, нейтрофильная инфильтрация стенок, фибриновые тромбы), гиперпластические процессы – гиперплазия и регенерация клеток эндотелия (22 – 40 сут).

2. Маркеры эндотелиальной дисфункции (CD31, vWF) через 2 нед экспрессированы в сосудах микроциркуляторного русла и в более крупных артериях. Через три недели регистрируется линейно-дискретная экспрессия vWF в эндотелиоцитах мелких кровеносных сосудов, что может быть связано с развитием гиперкоагуляционного состояния с тромбообразованием.

3. По данным иммуногистохимического анализа и компьютерной морфометрии, при COVID-19 в сосудах легких по мере увеличения сроков заболевания прогрессирует эндотелиопатия, оцениваемая по увеличению соотношения CD31/vWF (от 0,68 через 0 – 14 сут до 6,27 через 22 – 40 сут).

4. В первые две недели COVID-19 пневмония характеризуется экссудативными, а спустя три недели – экссудативно-некротическими процессами: отеком, гиалиновыми мембранами стенок альвеол с некрозами, нейтрофильной инфильтрацией, плазматическим пропитыванием, фибриноидным набуханием и некрозом стенок сосудов с образованием фибриновых тромбов. CD15+ и CD68+ клетки локализуются как внутриальвеолярно, так и вокруг сосудов микроциркуляторного русла.

5. Через 22 – 40 сут заболевания COVID-19 в легких манифестируют пролиферативные (гиперплазия альвеолярного эпителия) и фибротические процессы (интерстициальный фиброз, фиброзно-макрофагальные узелки), тромбы с признаками организации. Происходит ремоделирование сосудов мелкого и среднего калибра за счет гиперплазии эндотелиоцитов, перекалибровки просветов сосудов; выражены ангиоматоз и неоангиогенез.

6. По данным иммуногистохимического анализа, количество CD45+ клеток во все сроки развития COVID-19 больше, чем CD3+ лимфоцитов, что отражает недостаточную активность последних в процессах клеточной регуляции в ответ на воспаление. При COVID-19 в легких отмечается нарастание количества CD68 макрофагов в динамике заболевания, что подтверждается снижением соотношения CD15/CD68 с 1,21 через первые

две недели до 0,24 через 22 – 40 сут, что свидетельствует об активации макрофагального звена иммунитета.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При патоморфологическом исследовании легких при COVID-19 необходимо обращать внимание на изменения в сосудах, возникающих в различные сроки от момента начала заболевания.
2. Патоморфологическое исследование легких при COVID-19 в различные сроки от момента начала заболевания целесообразно дополнять иммуногистохимическими исследованиями с использованием маркеров CD3, CD15, CD31, CD68, vWF для определения степени выраженности поражений паренхимы и сосудов легких.
3. Для клинической и патологоанатомической диагностики эндотелиальной дисфункции сосудов легких при COVID-19 пневмонии важно изучать CD31, vWF, которые служат индикаторами нарушений свертываемости крови.

ПЕРСПЕКТИВА ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На основании полученных в ходе исследования результатов целесообразно дальнейшее изучение маркеров эндотелиальной дисфункции (CD31, vWF) в поздние сроки развития COVID-19 пневмонии и при развитии постковидного синдрома. Предполагается разработка и оптимизация протоколов морфометрического анализа изображений клеток и тканей для стандартизации патологоанатомических и иммуногистохимических исследований при COVID-19 пневмонии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- КПО – коэффициент площади окрашивания
 ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром
 РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
 vWF – фактор Виллебранда
 ФНО-а – фактора некроза опухоли альфа

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тодоров С.С., Дерибас В.Ю., Казьмин А.С. и др. Патоморфологические изменения в сосудах легких в разные сроки летальных исходов больных при COVID-19 // Медицинский вестник Юга России. – 2021. – Т. 12, № 2. – С. 54-61. – DOI 10.21886/2219-8075-2021-12-2-54-61.
2. Фомченкова Ю.М., Тодоров С.С., Казьмин А.С. Морфологические особенности поражения сосудов легких в ранние сроки развития у больных COVID-19 // 8-я итоговая научная сессия молодых ученых РостГМУ: Сборник материалов. – Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет, 2021. – С. 17-19.
3. Тодоров С.С., Тодоров С.С., Казьмин А.С. Эндотелиопатия сосудов легких в динамике развития COVID-19 // **Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2022. – Т. 19, № 2. – С. 18-22.**
4. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерибас В.Ю., Тодоров С.С. Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19 // **Клиническая и экспериментальная морфология. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 6-12. – DOI 10.31088/CEM2022.11.2.6-12. (Scopus)**

5. Тодоров С.С., Тодоров С.С. (мл.), Казьмин А.С. Патоморфологические особенности поражения сосудов легких в динамике развития COVID-19 пневмонии // VI съезд российского общества патологоанатомов. – Новосибирск, 2022. – С. 168-169.

6. Тодоров С.С., Тодоров С.С. (мл.), Казьмин А.С. Компьютерный анализ количества лимфоцитов CD3, CD45 в динамике развития COVID-19 // VI съезд российского общества патологоанатомов. – Новосибирск, 2022. – С. 166-167.

7. Тодоров С.С., Тодоров С.С., Казьмин А.С. Экспрессия белков CD31, фактора Виллебранда в разные сроки COVID-19 пневмонии // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2022. – Т. 19, № 3. – С. 165-173. – DOI 10.19163/1994-9480-2022-19-3-165-173.

8. Тодоров С.С., Тодоров С.С., Казьмин А.С. Морфоиммуногистохимические особенности поражения сосудов легких при COVID-19 в ранние сроки заболевания // Материалы Международного молодёжного форума. Неделя науки, 2022. – Ставрополь: СтГМУ, 2022. – С. 81-83.

Соискатель

А.С.Казьмин