

На правах рукописи

Омарова Жанна Рубеновна

**ПАТОМОРФОЛОГИЯ ЛЕГКИХ ПРИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ
ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-COV-2**

3.3.2 - Патологическая анатомия

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

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Самсонова Мария Викторовна

Официальные оппоненты:

Коган Евгения Алтаровна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАЕН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Референс-центр патоморфологических и иммуногистохимических методов исследований Института клинической морфологии и цифровой патологии, директор.

Забозлаев Федор Георгиевич - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», патологоанатомическое отделение, заведующий отделением.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета _____ при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1; и на сайте <https://rsmu.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1; <https://rsmu.ru>)

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Баранич Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы диссертации.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), каждый год более 2 млрд. человек страдают различными инфекционными заболеваниями, из которых 17 млн. заканчивается летальным исходом. В современном мире инфекционные болезни распространяются намного быстрее, чем ранее. С конца XX века ежегодно регистрируется одно новое инфекционное заболевание [Покровский В. И., Брико Н. И., 2010]. В конце 2019 года в провинции Китая Хубэй, город Ухань, была зарегистрирована вспышка новой коронавирусной инфекции, вызванная вирусом SARS-CoV-2, которая за короткий промежуток охватила весь мир. 11.03.20 ВОЗ ей был присвоен статус пандемии COVID-19.

Информация об эпидемиологии, клинической картине, методах профилактики и вариантах лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 постоянно обновляется, однако, вопросы патогенеза, особенности морфологических проявлений в разные сроки заболевания, нарушения коагуляции изучены не в полной мере [Забозлаев Ф.Г. и соавт., 2020; Рыбакова М.Г. и соавт., 2020; Коган Е.А. и соавт., 2020].

Течение вирусной инфекции характеризуется развитием вирусной интерстициальной пневмонии, типичным морфологическим проявлением которой является диффузное альвеолярное повреждение (ДАП), описанное при тяжелом остром респираторном синдроме (SARS), Ближневосточном респираторном синдроме (MERS), при гриппе А (H1N1), фазы которого совпадали с длительностью заболевания [Черняев А.Л. и соавт., 2010, Коган Е.А. и соавт., 2020; Gralinski L.E., et al., 2013; Li K et al. 2020]. ДАП также может встречаться при шоковых состояниях различных этиологий и при сепсисе [Белянин В.Т., Рыбакова М.Г., 2004].

Остаётся нерешенным вопрос о частоте тромбозов сосудов легких, существовании васкулита и эндотелиита. Непонятно, соответствуют ли стадии ДАП длительности заболевания. Встречаются единичные публикации о

частоте признаков ДАП в разные стадии болезни. В доступной литературе не приведено описание гистологических изменений в легких в фазу развития «цитокинового шторма». Существует лишь единичные публикации, где было проведено сравнение данных КТ и гистологических изменений легких [Grillo F. et al., 2021; Mauad T. et al., 2021].

Цель исследования.

Изучить патоморфологию легких при интерстициальной вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, и провести сопоставление КТ-симптомов поражения легких с гистологическими изменениями в них.

Задачи исследования:

1. Определить спектр коморбидных заболеваний при критически тяжелом течении вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2.
2. Оценить гистологические изменения в легких при вирусной интерстициальной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 с проведением полуколичественной оценки частоты встречаемости признаков диффузного альвеолярного повреждения лёгких в экссудативную и продуктивную фазы заболевания.
3. Провести иммуногистохимическое исследование для уточнения механизмов развития интерстициальной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, в разные фазы заболевания.
4. Описать морфологические изменения в легких при прицельном сопоставлении с КТ-признаками поражения.

Научная новизна исследования

В работе с помощью современных методов патологоанатомического исследования и сопоставления морфологических изменений с клинико-инструментальными данными при интерстициальной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, впервые:

- определен профиль пациентов с критически тяжелым течением новой коронавирусной пневмонии, включая пол, возраст и спектр коморбидных заболеваний;

- выявлены особенности морфофункциональных изменений легких при COVID-19 и морфогенез поражения органа;
- установлено, что структурные изменения в легких соответствуют вирусной интерстициальной пневмонии, характеризующейся диффузным альвеолярным повреждением; динамика этих изменений, по мере развития заболевания, носит стадийный характер;
- выявлено, что отличительной особенностью интерстициальной вирусной пневмонии, вызванной SARS-COV-2, является неполное соответствие между длительностью заболевания и фазами ДАП;
- установлены механизмы морфологических повреждений легких, среди которых доказано прямое воздействие вируса на различные структурные единицы легких, включая эндотелиоциты и перициты кровеносных сосудов, обуславливающие повреждения сосудов с развитием коагулопатии с распространенным тромбообразованием, играющим важную роль в танатогенезе;
- описаны микроскопические изменения в легких в фазу развития «цитокинового шторма»;
- установлено соответствие гистологической картины в легких с различными КТ-симптомами на разных стадиях развития вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2;
- продемонстрировано, что КТ-симптомы «матовое стекло» и «булыжная мостовая» чаще являются отражением гистологических изменений при экссудативной фазе ДАП; симптомокомплекс «организующейся пневмонии» свидетельствует о поздней, продуктивной фазе ДАП; консолидация при КТ-исследовании соответствовала участкам выраженных внутриальвеолярных кровоизлияний и/или организующейся пневмонии.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты проведенного комбинированного исследования при вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 уточняют данные о структурных изменениях в легких. Выявленные морфологические изменения

расширяют представления о вирусных интерстициальных пневмониях, о характере общепатологических процессов, лежащих в основе повреждений, позволяют установить динамику развития и характер течения патологического процесса при новой коронавирусной инфекции. Полученные данные дают представление о морфологическом субстрате различных КТ-симптомов в динамике течения заболевания. Данное исследование имеет важное прикладное значение – понимание процессов развития заболевания и динамических изменений на разных стадиях заболевания, что позволит клиницистам и фармакологам разрабатывать подходы к лечению на разных сроках с целью предупреждения прогрессирования инфекции и развития осложнений.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. На основании исследования морфологических изменений в разные фазы диффузного альвеолярного повреждения описана стадийность вирусной интерстициальной пневмонии, вызванной вирусом SARS-COV-2. Установлено, что имеет место неполное соответствие экссудативной и продуктивной фаз ДАП с длительностью заболевания.

2. Представлена микроскопическая картина изменений в легких при «цитокиновом шторме» и установлена важная роль внутрисосудистой коагулопатии, как одного из ведущих патогенетических механизмов заболевания.

3. Описаны микроскопические изменения в легких при разных КТ-симптомах вирусной интерстициальной пневмонии с помощью прицельного морфологического исследования ткани легкого.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.3.2 - «Патологическая анатомия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 3.3.2 - «Патологическая анатомия», конкретно пунктам 1, 3, 4.

Степень достоверности и обоснованности результатов диссертационной работы.

Достоверность результатов исследования обосновывается научной постановкой цели и задач, использованием комплексного методологического подхода с включением клинических, инструментальных, морфологических, статистических методов исследования, достоверностью исходных данных и достаточным числом наблюдений (196 умерших).

Проведение диссертационного исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол №214 от 24 января 2022 года).

Апробация работы.

Результаты диссертации доложены и обсуждены на региональной конференции Российского респираторного общества (Нижний Новгород, 2020 г.), 30 конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2020 г.), конгрессе ATS (Сан-Франциско, США, 2021г), Общероссийской межведомственной научно-практической конференции с международным участием «Диагностика и лечение COVID-19» (Балашиха, 2021 г.), 31 конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2021 г.), VI съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022 г.), на заседании кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с участием сотрудников отдела фундаментальной пульмонологии ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России 28.04.2022г., протокол №9/22.

Внедрение результатов в практику.

Основные положения работы используются в практической деятельности ГКБ № 52 ДЗМ, ДГКБ святого Владимира ДЗМ, при подготовке семинарских занятий и лекционного курса кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Личный вклад автора.

Автору принадлежит основная роль в выполнении всех этапов исследования: анализ литературы, обоснование актуальности и степени разработанности темы исследования, разработка дизайна, выбор методов исследования, обработка исходных данных умерших, формирование целей и задач, определение научно-практической значимости работы, формирование положений, выносимых на защиту, статистическая обработка данных, написание глав диссертации, формулирование выводов, практических рекомендаций и подготовка публикаций, соответствующих теме работы, участие во внедрении полученных результатов в практику.

Публикации результатов исследований.

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя. Текст изложен на 114 страницах, иллюстрирован 4 таблицами и 73 рисунками. Список литературы включает 116 источников, из них 14 отечественных и 102 иностранных.

Материалы и методы исследования

Проанализированы медицинские карты стационарных пациентов, протоколы вскрытий и проведена оценка гистологических изменений в легких на материале аутопсий 196 умерших от новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 за период с марта 2020 по октябрь 2021 года. Материал был любезно предоставлен заведующими патологоанатомических отделений ГКБ №52, ГКБ им. Д.Д. Плетнева, ГКБ им. М.Е Жадкевича, клинической инфекционной больницы №2, Центральным научно-исследовательским институтом туберкулеза. Во всех наблюдениях прижизненно была подтверждена новая коронавирусная инфекция COVID-19 с помощью ПЦР-исследования материала назофарингеальных мазков. Из 196

умерших мужчин было 114 (58,2%), женщин - 82 (41,8%); (соотношение ж:м - 1:1,2). Средний возраст составил $70,4 \pm 13,6$ (29 – 94 лет), при этом бóльшая часть умерших (40%) принадлежали к возрастной группе 60-74 года.

Длительность заболевания с момента возникновения симптомов до наступления летального исхода составила 17 (3-75) суток, продолжительность госпитализации 9 (1-75) суток. 67% пациентам была проведена инвазивная вентиляция легких, медиана продолжительности которой составила 4 (1-30) суток.

Методы исследования.

1. Макроскопическую картину в легких оценивали на основании протоколов аутопсий при проведении прицельного взятия материала после фиксации легких.
2. Анализ микроскопических изменений в легких проводили на парафиновых срезах толщиной 3-5 мкм, изготовленных по общепринятой методике с последующей окраской гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Верхофф-Ван-Гизону, MSB по Лёндруму.
3. Для иммуногистохимического исследования с целью определения экспрессии различных антигенов использовали моно- и поликлональные антитела к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 (клон X155, XEMA Москва, Россия), FVIII, TNF α , CK7, CD68, CD4, CD8 Cell Marque (Rocklin, California, United States. Исследование проводили по общепринятой методике [Dako M. 2011]).
4. Проводили сравнительную оценку прижизненной рентгенологической картины с гистологическими изменениями на аутопсийном материале легких. Основным критерием включения пациента в исследования являлось выполнение КТ-исследования не ранее, чем за 5 суток до наступления летального исхода.

Нами была разработана методика прицельного взятия материала ткани легкого из участков, обозначенных при анализе прижизненного КТ-исследования.

Методика исследования.

КТ-исследования проводили с использованием стандартного протокола для органов грудной клетки и алгоритма high-resolution на мультidetекторном компьютерном томографе Toshiba aquilion prime (Япония). Был проведен анализ последних прижизненно проведенных КТ-исследований умерших пациентов с выделением всех имеющихся и ведущего КТ-симптомов, включая: “матовое стекло”, “булыжную мостовую”, консолидацию, симптомокомплекс организуемой пневмонии (зоны консолидации треугольной и полигональной формы, перилобулярную консолидацию, субплевральные тяжи консолидации, а также симптом “ободка” и “обратного ободка”). Градация выраженности симптомов осуществлялась по трехбалльной системе: 0 – симптом отсутствует, 1 – присутствует, 2 – выражен. На основании выделенных КТ-симптомов были выбраны прицельные точки взятия материала при помощи построения трехмерных реконструкций.

На аутопсии легкие фиксировали целиком, не извлекая из плевральных полостей, путем введения 10% нейтрального формалина через трахею под давлением 18–20 мм водного столба до их полного расправления. После этого комплекс сердце-легкие помещали в раствор 10% нейтрального (на фосфатном буфере) формалина, пятикратно превышающий объем комплекса, на 24 часа. Затем каждое легкое разрезали фронтально и получали срезы толщиной 1 см (рис. 1). Это позволяло установить участки измененной ткани, обозначенные на томограммах рентгенологом, из которых вырезали от 1 до 3 кусочков размерами 2×1×0,5 см, заливали в парафин и обрабатывали по общепринятой методике срезов толщиной 3–5 мкм [Gu S.X. et al., 2021].

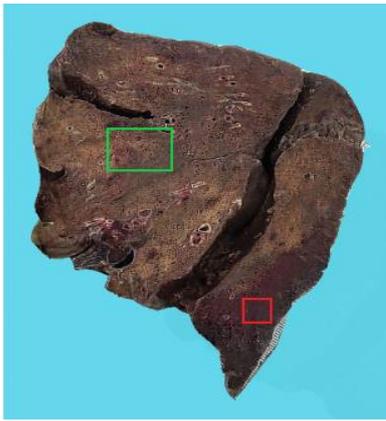


Рис.1. Мужчина 74 лет, 18 суток. Фронтальный разрез с выделением участков изменённой ткани, согласно КТ-навигации: верхний квадрат - чередование участков плотной и воздушной ткани легкого, нижний - фокус кровоизлияния.

Анализ материала проводили путем выявления всех имеющихся изменений и выделения ведущего из них по трехбалльной шкале: 0 – изменение отсутствует, 1 – присутствует, 2 – выражено. Оценивали следующие признаки: наличие в просветах полостей альвеол различных клеток/гиалиновых мембран; внутриклеточный фибрин; внутриальвеолярный отек; интерстициальное воспаление в виде лимфоидной инфильтрации, отека, отложения коллагена – неспецифическая интерстициальная пневмония (НСИП); наличие внутриальвеолярной грануляционной ткани; наличие эритроцитов в альвеолах; диффузные и/или очаговые внутриальвеолярные кровоизлияния, геморрагический инфаркт; наличие тромбов в артериях и/или в венах; метаплазия альвеолярного эпителия; десквамация альвеолярного эпителия. Таким образом, для каждого препарата была выявлена комбинация вышеперечисленных гистологических признаков с выделением ведущего.

Статистические методы

При описании количественных переменных применялись статистические параметры: число пациентов, среднее арифметическое значение, стандартное отклонение, 25 и 75 перцентили, медиана, таблица сопряжений. Статистически достоверными считались различия при уровне ошибки $p < 0,05$ [Гланц С., 1999; Ланг Т.А., 2011; Лукьянова Е.А., 2003]. Для статистической обработки данных на персональном компьютере (ПК) были использованы программа Microsoft Excel 2018 и версия статистического анализа Statistica 11.0. [Боровиков В., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-морфологическая характеристика гистологических изменений в легких при новой коронавирусной инфекции по материалу аутопсий.

По нашим данным, доля умерших старше 60 лет составила 77%, что согласуется с опубликованными данными [Bello-Chavolla O.Y. et al., 2020]. Среди умерших преобладали мужчины (114/82), на такое же соотношение указывают Mangia C. et al., 2020. Наиболее частыми сочетанными заболеваниями являлись ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертоническая болезнь (ГБ), сахарный диабет, ожирение, онкологические и гематологические заболевания, болезни органов дыхания (БОД) и другие (парапроктит, трансплантация, туберкулез). 91(48%) пациентов страдали ИБС, ГБ, 39 пациентов (21%)- сахарным диабетом, -19 (10%) ожирением, - 15 (8%) БОД-. Другие виды сочетанных заболеваний были обнаружены у 24 (13%) умерших, что совпадает с данными других авторов [Moore J.V. et al., 2020].

Были оценены основные клинико-лабораторные данные, макро- и микроскопические изменения легких у 196 умерших. Общее количество лейкоцитов составило $11,2 \pm 7,3$ ($1,4-31,4$) $\times 10^9$ /л, абсолютное число лимфоцитов - $0,6 \pm 0,4$ ($0-9$) $\times 10^9$ /л, концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови - 170 ± 67 ($15-431$) мг/л.

На аутопсии макроскопическая картина при COVID-19 характеризовалась резко выраженным полнокровием внутренних органов, иногда наблюдали множественные мелкоточечные кровоизлияния в париетальной и висцеральной плевре. Легкие занимали весь объем грудной полости. Масса легких составила в среднем 1550 ± 36 ($700-3200$) г. Макроскопически имела место типичная картина «шоковых легких». Были выявлены участки острого вздутия, чаще наблюдаемые в передне-верхних отделах, ателектазы (дистелектазы), геморрагические инфаркты, кровоизлияния различных размеров, местами сливающиеся между собой с наличием тромбов в ветвях легочных артерий и вен. На поздних сроках от

начала заболевания легкие были уплотнены, на разрезе наблюдали чередование участков темно-коричневого и серовато-желтоватого цвета.

Анализ гистологических изменений в легких был проведен двумя независимыми экспертами с учетом наличия каждого признака. При этом полное совпадение результатов оценки составило в среднем 70,1%, наименьшие уровни совпадений результатов зарегистрированы для признаков «цитотоксический эффект в альвеолоцитах» и «десквамация эпителия бронхиол», они составили в 48,5 и 54,4% соответственно.

При гистологическом исследовании в легких были выявлены признаки вирусной интерстициальной пневмонии в виде диффузного альвеолярного повреждения. При анализе гистологических признаков десквамация эпителия альвеол встречалась у 136 умерших (69,4%), гиалиновые мембраны - у 132 (67,4%), внутриальвеолярный отек - у 126 (64,3%), эритроциты в альвеолах - у 116 (59,2%), фибрин в альвеолах - у 113 (57,7%), грануляционная ткань - у 86 (43,9%), метаплазия эпителия альвеол - у 77 (39,3%), интерстициальное воспаление - у 66 (33,7%), тромбы в артериях - у 62 (31,6%), цитотоксический эффект - у 58 (29,6%), тромбы в венах - у 23 (11,7%).

Экссудативная фаза ДАП была обнаружена у 93 (47,45%) умерших, медиана длительности заболевания составила 15 (4-37) суток. В эту фазу наблюдали выраженный внутриальвеолярный отек, гиалиновые мембраны, по контурам респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеол в виде полос разной толщины, признаки цитопатического повреждения эпителия с появлением уродливых альвеолоцитов, характеризующихся разнообразием форм, изменением ядер с появлением ядрышек, атипических митозов, иногда - просветлений вокруг ядра в виде гало, а также округлых частиц в цитоплазме единичных клеток.

При иммуногистохимическом исследовании с антителами против нуклеокапсида SARS-CoV-2 выявлена экспрессия в плазматических клетках, гиалиновых мембранах, альвеолоцитах. В просветах альвеол нередко

встречались небольшие симпласты, а у части умерших – многоядерные макрофаги, экспрессирующие CD68.

Наряду с изменениями альвеолярного эпителия, среди десквамированного бронхиального эпителия были обнаружены эпителиоциты с увеличенными ядрами. При ИГХ-исследовании вирус был обнаружен в альвеолоцитах I и II типа, в ядрах бронхиолярного эпителия (рис. 2).

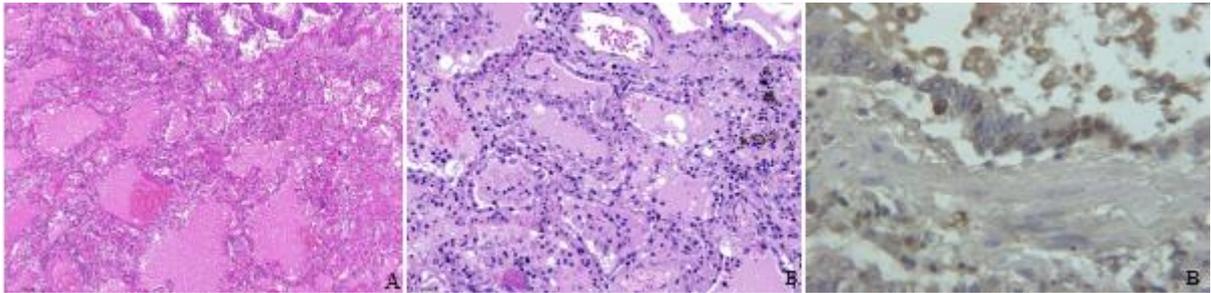


Рис. 2. А - Ж. 71 год, ДЗ 7 суток. Внутриальвеолярный отек, гиалиновые мембраны, выстилающие контуры альвеол. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$; Б - Ж. 64 года, ДЗ 12 суток. Внутриальвеолярный отек, скопления в просветах альвеол десквамированного альвеолярного эпителия и макрофагов, утолщенные межальвеолярные перегородки за счет отека и пролиферации альвеолоцитов II типа. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; В - Ж. 57 лет, ДЗ 8 суток. Экспрессия X155 в бронхиолярном, частично десквамированном эпителии. Иммуногистохимическое исследование с моноклональными мышными антителами X155 к нуклеокапсиду SARS-CoV-2, $\times 200$.

В экссудативную фазу было обнаружено полнокровие ветвей легочных артерий и вен, капилляров межальвеолярных перегородок с повреждением и десквамацией эндотелиоцитов, наличием сладжей эритроцитов, организуемых и фибриновыми тромбами, очагами периваскулярных кровоизлияний, внутрибронхиолярными и внутриальвеолярными скоплениями эритроцитов, у трети умерших были выявлены очаговые кровоизлияния и/или геморрагические инфаркты, что согласуется с данными литературы [Edler C. et al., 2020; Ackermann M. et al., 2020]. В нашем исследовании тромбы в ветвях легочной артерии, вен и капиллярах были обнаружены у 31,63%, 11,73% и 3,06% умерших соответственно. В большинстве наблюдений мы расценивали эти изменения в легких как тромбоз на месте, а не тромбоэмболию, учитывая при этом характер внутрисосудистого содержимого – от сладжей эритроцитов до фибриново-

эритроцитарных тромбов, а также сетчатого фибрина в просветах сосудов. Фибриновые тромбы в ветвях легочной артерии обнаружены в данном исследовании лишь в 2 наблюдениях. Наличие тромбов в артериолах и ветвях легочной артерии в части наблюдений сопровождалось фокусами периваскулярного отека, иногда с единичными гиалиновыми мембранами, в том числе и у умерших на поздних сроках, с признаками пролиферативной фазы ДАП. В эндотелии сосудов у пациентов с COVID-19 была обнаружена выраженная экспрессия FVIII. Varga Z. et al., 2020 указывают на наличие эндотелиита, в том числе лейкоцитарного, как причины повреждения эндотелия. В нашем исследовании истинного васкулита мы не наблюдали, лишь в части наблюдений была выявлена периваскулярная инфильтрация клетками лимфоидного ряда. По-нашему мнению, патогенез внутрилегочной коагулопатии связан с прямым действием вируса, влиянием цитокинов с последующим иммунным повреждением эндотелия, что согласуется с данными ряда авторов [Коган Е.А. и соавт., 2020; Varga Z. et al., 2020; McGonagle D. et al., 2020].

Пролиферативная фаза ДАП выявлена у 103 (52,55%) умерших с продолжительностью заболевания 19 (9-75) суток и характеризовалась появлением внутриальвеолярных скоплений фибрина разной степени зрелости, отеком межальвеолярных перегородок, с инфильтрацией их преимущественно лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами, единичными нейтрофилами, пролиферацией фибробластов, разрастанием фибробластической полиповидной ткани в просветах альвеол и респираторных бронхиол или в виде «клубочков» (рис. 3).

При иммуногистохимическом исследовании ткани лёгких с антителами против нуклеокапсида SARS-CoV-2 (X155) выявлена положительная реакция в бронхиальном и метаплазированном альвеолярном эпителии, миофибробластах, макрофагах, миоцитах стенок бронхов и сосудов.

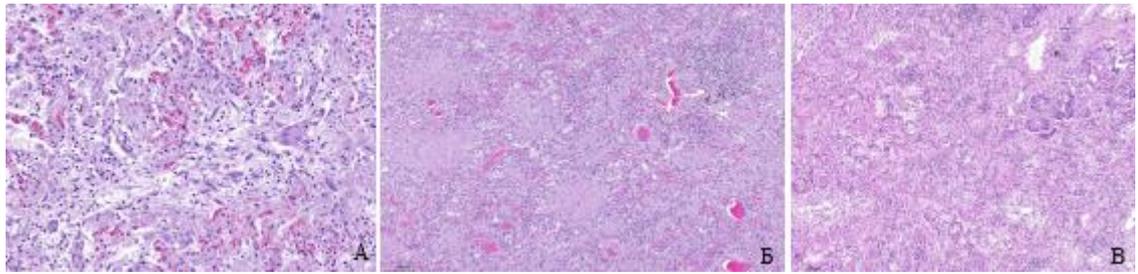


Рис.3. А - М. 72 лет, ДЗ 25 суток. Фибрин и пролиферация фибробластов в просветах альвеол. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; Б - М. 83 лет, ДЗ 30 суток. Внутриальвеолярная молодая соединительная ткань в виде клубочков. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$; В - М. 75 лет, ДЗ 23 сутки. Плоскоклеточная метаплазия альвеолярного эпителия. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 30$.

У 69 (35,2%) пациентов в одних участках имел место острый процесс с наличием отека и гиалиновых мембран, выраженная десквамация альвеолоцитов, в том числе с признаками цитопатических изменений, в других – были выявлены признаки пролиферативной фазы в виде организации фибрина, очагов организующейся пневмонии, иногда весьма распространенных, или очаги грануляционной ткани с сидерофагами в альвеолах и отложением железосодержащего пигмента в эндотелии сосудов. При иммуногистохимическом исследовании (X155) вирус SARS-CoV-2 в данной группе наблюдений не был обнаружен. Неполное соответствие длительности течения заболевания и фаз ДАП является особенностью новой коронавирусной пневмонии. Хорошо известно, что в течение заболевания в некоторых случаях временное улучшение состояния, а также клинических и лабораторных показателей сменяется повторным ухудшением, что, возможно, связано с волнообразным характером процесса репликации вируса в эпителии нижних дыхательных путей и альвеолярном эпителии. Этим, вероятно, можно объяснить тот факт, что у части пациентов в позднюю пролиферативную фазу ДАП наблюдалась десквамация альвеолярного эпителия с выраженными цитопатическими изменениями. Длительная персистенция вируса может являться триггером для повторного повреждения легких и прогрессии заболевания [Carsana L. et al., 2020; Zhou F. et al., 2020]. При этом в позднюю фазу течения болезни РНК вируса уже не определяется в материале нозофарингеальных мазков, однако в 72% наблюдений в нашей группе был обнаружен в аутопсийном материале легких. Такая временная гетерогенность

отличает COVID-19 от других вирусных пневмоний, в частности от вирусной инфекции, вызванной гриппом А(Н1N1), при которой морфологические изменения четко соответствовали продолжительности заболевания и фазам ДАП (Черняев А.Л. и соавт, 2010, Зайратьянц О.В. и соавт, 2010).

Появление внутриальвеолярных кровоизлияний, тромбов в ветвях легочных артерий и вен было обнаружено при всех фазах заболевания. У 5 пациентов, умерших на 5-25 сутки от начала заболевания, при наличии признаков тромбоза капилляров межальвеолярных перегородок, а также ветвей легочной артерии различного калибра, признаки острого повреждения были минимальны и характеризовались лишь небольшими участками внутриальвеолярного отека при отсутствии признаков повреждения альвеолоцитов.

6 пациентов мужского пола, средний возраст которых составил $41,0 \pm 4,5$ года, с длительностью заболевания от 3 до 6 суток, умерли при наличии клинико-лабораторных признаков «цитокинового шторма». При поступлении состояние всех пациентов было расценено как тяжелое, имели место жалобы на одышку в покое и слабость. Частота дыхания (ЧД) составляла 28-32 в минуту, сатурация крови при вдыхании атмосферного воздуха (SpO_2) была 87-91%, температура тела - $38,6-39,2^\circ\text{C}$. Тяжесть состояния больных обусловлена дыхательной недостаточностью и интоксикационным синдромом. При КТ легких у всех пациентов имели место субплевральные участки уплотнения легочной ткани по типу «матового стекла» и обширные зоны консолидации высокой интенсивности с ретикулярными изменениями, захватывающие от 52 до 80% объема лёгких. При анализе результатов лабораторных исследований было выявлено увеличение интерлейкина-6 (ИЛ-6) от 4956 до 5558 пг/мл (норма - 7 пг/мл), С-реактивного белка (СРБ) от 395 до 520 мг/л (норма - 0-5,0 мг/л), ферритина от 1024,3 до 2007,8 мкг/л (норма - 30-400 мкг/л), фибриногена от 5,1 до 6,45 г/л (норма - 3,5-4,5 г/л), прокальцитонина от 34,2 до 85,7 нг/мл (норма - 0-0,046 нг/мл), Д-димера от 3496 до 5199 нг ФЭЕ/мл (норма - 0-650,0 нг ФЭЕ/мл), а также снижение лимфоцитов до $0,1 \times 10^9/\text{л}$ (1,2-3,0) и

тромбоцитов до $46 \times 10^9/\text{л}$ (180-320). В связи с тяжестью состояния больные были интубированы и переведены на искусственную вентиляцию легких.

При микроскопическом исследовании у всех умерших с клинико-лабораторными признаками «цитокинового шторма» межальвеолярные перегородки были незначительно утолщены, в значительном числе альвеол определялись массивные скопления клеток, представленные преимущественно макрофагами, часть из которых с признаками фагоцитоза клеточных фрагментов и эритроцитов, клеточными фрагментами в виде апоптозных телец, а также единичными Т-лимфоцитами (CD8⁺). Единичные CD4⁺ Т- лимфоциты локализовались преимущественно периваскулярно. В фазу «цитокинового шторма» вирус был обнаружен преимущественно в капиллярах межальвеолярных перегородок, макрофагах и в единичных альвеолоцитах, эндотелиоцитах, перицитах. Экспрессия TNF α определялась в фагосомах альвеолярных макрофагов (рис. 4).

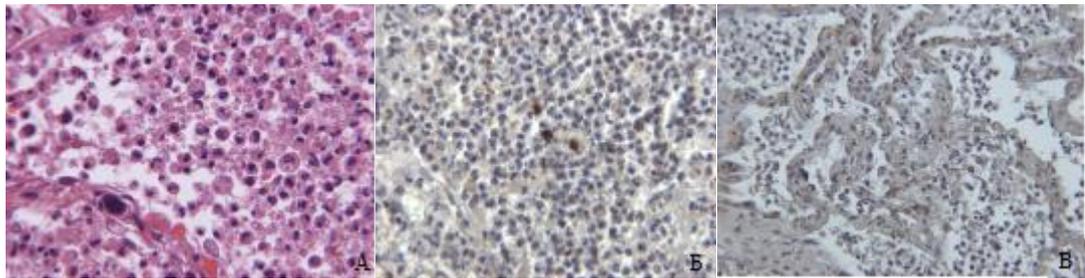


Рис 4. М. 32 лет, ДЗ 4 сутки. «Цитокиновый шторм»: А - в просвете альвеолы фагоцитирующие макрофаги и апоптозные тельца. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; Б - экспрессия TNF α в макрофагах и апоптозных тельцах (фагосомах). ИГХ с антителами к TNF α , $\times 200$; В - М. 34 лет, ДЗ 3 сутки. «Цитокиновый шторм»: экспрессия X155 в межальвеолярных перегородках и единичных альвеолоцитах. ИГХ с антителами к нуклеокапсиду SARS-CoV-2, $\times 100$.

Межальвеолярные перегородки в этих участках утолщены за счет интерстициального отека, выраженного полнокрывия капилляров. В части капилляров обнаружены сладжи эритроцитов и фибриновые тромбы.

Таким образом, у пациентов со стремительным течением COVID-19 и клинико-лабораторными признаками «цитокинового шторма» впервые были описаны гистологические изменения в лёгких.

Основными проявлениями интерстициальной пневмонии COVID-19 при тяжелых формах заболевания являются ДАП с развитием в экссудативную фазу “цитокинового шторма” и синдром легочной внутрисосудистой коагулопатии [Josea R.J. et al., 2020; McGonagle D. et al., 2020; Shimizu M. et al., 2020; Tang N. et al., 2020], требующие, вероятно, различных терапевтических подходов в разные периоды течения болезни. По нашим данным, КТ-картина этих двух состояний различна. “Цитокиновый шторм” в рамках экссудативной фазы ДАП проявляется преимущественно изменениями по типу “матового стекла” или “бульжной мостовой”, а синдром внутрисосудистой коагулопатии, вероятнее всего, может соответствовать кровоизлияниям, определяемым на КТ как участки консолидации, в том числе зоны сливной лобулярной консолидации.

У 57 умерших, из которых 48 находились на ИВЛ, была выявлена бактериальная пневмония.

В рамках сравнительного рентгено-морфологического исследования были проанализированы 45 прицельно взятых кусочков ткани легкого от 14 умерших (7 мужчин/7 женщин), средний возраст умерших составил $77,1 \pm 12,9$ (49–90) года. Среди них 9 пациентов скончались в отделении реанимации и интенсивной терапии, из них 8 (58%) перед наступлением смерти находились на ИВЛ. Летальный исход наступил на 1–5-е сутки после последней КТ (медиана 2,0 дня [0–3,5]).

Во всех наблюдениях встречалась комбинация указанных выше гистологических признаков, соответствующих экссудативной и пролиферативной фазам (рис. 5). Частота встречаемости признаков: матовое стекло при экссудативной фазе в 44,4%, при пролиферативной – в 28,9%, бульжная мостовая – в 40,0% и 28,9%, организуемая пневмония - 24,4% и 15,65%, консолидация – 31,1% и 24,4% соответственно.

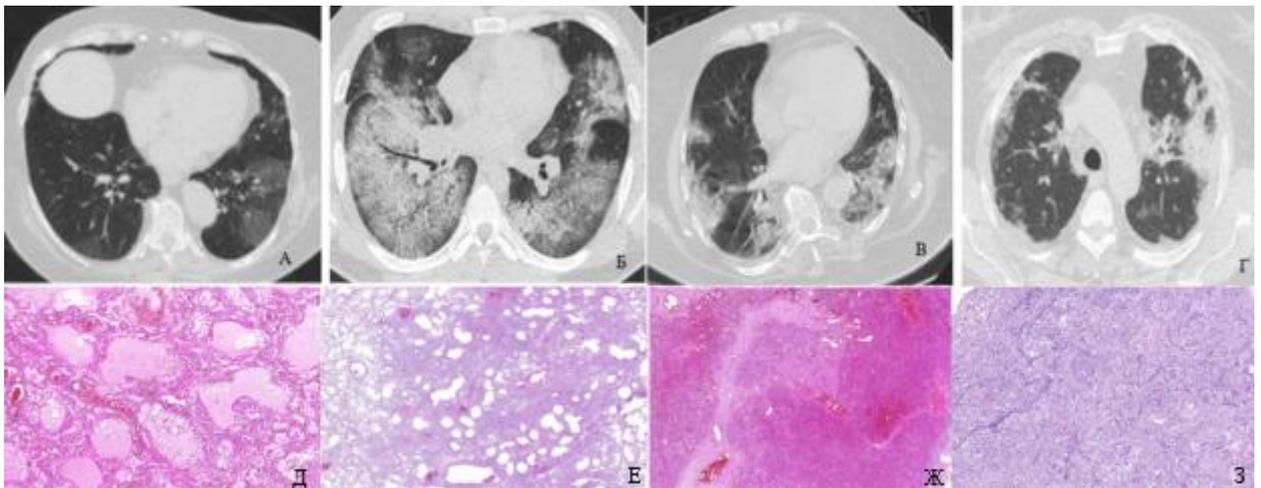


Рис 5. КТ-симптомы и гистологические признаки, окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$. А – «матовое стекло», Б- «булыжная мостовая», В- консолидация, Г- паттерн организующейся пневмонии, Д -внутриальвеолярный отек, Е -заполненные и аэрированные альвеолы, Ж -внутриальвеолярное скопление эритроцитов (альвеоло-геморрагический синдром), З- полиповидная фибробластическая ткань в альвеолах (организующаяся пневмония).

При КТ-симптоме «матового стекла» при гистологическом исследовании внутриальвеолярная клеточность встретилась в 57,1%, в сочетании с внутриальвеолярным фибрином (42,9%) и отеком (28,6%), что соответствует экссудативной фазе ДАП и согласуется с данными Yang Q. et al., (2020). На более поздних сроках заболевания зоны «матового стекла» характеризовались интерстициальной инфильтрацией или утолщением альвеол по типу НСИП в 14,3 и 28,6% соответственно. Данные литературы свидетельствуют о том, что первичным КТ-симптомом в подавляющем большинстве случаев является «матовое стекло», а все остальные описанные в литературе легочные симптомы в определенной последовательности являются следствием его развития [Кармазановский Г.Г. и соавт., 2020; Kanne J.P. et al., 2020; Pan F. et al., 2020; Shi H. et al., 2020; Wang Y. et al., 2020].

Симптом «булыжной мостовой» во всех наблюдениях характеризовался комбинацией признаков, включая внутриальвеолярное заполнение отечной жидкостью, клеточными скоплениями, в том числе эритроцитами или фибрином при наличии в соседних участках, аэрированных или гипервоздушных альвеол. Симптом «булыжной мостовой» наиболее сложен для интерпретации, в том числе при исследовании легких у пациентов с

COVID-19. При прицельном посмертном взятии материала из участков, обозначенных как зоны “бульжной мостовой”, были выявлены мозаичные гистологические изменения с чередованием заполненных альвеол (внутриальвеолярный отек, скопления эритроцитов, макрофагов, лимфоцитов) и воздушных альвеол (острое вздутие или аэрированные альвеолы). Такая мозаичность изменений дает картину “матового стекла” с ретикулярными изменениями, т.е. симптом “бульжной мостовой”.

При симптомокомплексе организующейся пневмонии наиболее частыми гистологическими признаками оказались очаговые дистелектазы, внутриальвеолярная грануляционная ткань в сочетании со скоплением гиалиновых мембран, встретившихся с равной частотой в 42,9%. По данным Rogatchnik V.P. et al. (2020), изменения на КТ в виде перилобулярной консолидации морфологически соответствовали организующейся пневмонии, что наблюдали и в нашем исследовании. J. Kanne и соавт. (2020) отметили, что разрешение вирусной пневмонии происходит через стадию организующейся пневмонии с последующим сохранением остаточных изменений в виде участков “матового стекла”.

При наличии симптома консолидации на КТ в гистологических срезах наиболее часто выявляли массивные кровоизлияния (особенно при наличии облаковидных консолидатов при КТ) - в 45,5%, а также признаки организации в виде скопления фибрина (36,4%), грануляционной ткани (18,2%) или участков дистелектазов (18,2%).

Таким образом, описано разнообразие гистологических признаков в экссудативную и пролиферативную фазы ДАП при различных КТ-симптомах. При анализе полученных нами данных необходимо принимать во внимание разницу во времени между последней прижизненной КТ и днем смерти (медиана 2,0 дня [0; 3,5]), что может повлиять на точность наших данных. Мы предполагаем, что наши результаты могут иметь ценность в определении прогноза и тактики ведения пациентов с COVID-19.

ВЫВОДЫ

1) При критически тяжелом течении COVID-19 доля умерших старше 60 лет составила 77%, преобладали мужчины, среди сочетанных заболеваний наиболее часто встречались ИБС и/или артериальная гипертензия - в 48% наблюдений, сахарный диабет – в 21%, ожирение – в 10%, болезни органов дыхания - в 8%, злокачественные новообразования – в 8%, другие заболевания – в 5%.

2) При COVID-19 развивается вирусная интерстициальная пневмония в виде диффузного альвеолярного повреждения, у четверти умерших - с выраженным альвеолярно-геморрагическим синдромом, распространенными тромбозами ветвей легочной артерии, вен и капилляров межальвеолярных перегородок.

3) При новой коронавирусной пневмонии имеет место неполное соответствие фаз диффузного альвеолярного повреждения длительности заболевания, а также – у 35,2% умерших – сочетание признаков экссудативной и пролиферативной фаз ДАП, что связано с персистенцией вируса в ткани легких.

4) При иммуногистохимическом исследовании вирус SARS-CoV-2 был выявлен в альвеолоцитах, эпителиоцитах бронхиол, эндотелии и гиалиновых мембранах в экссудативную фазу; в миофибробластах, бронхиолярном и метаплазированном эпителии и миоцитах стенок бронхов и сосудов – в пролиферативную.

5) При наличии клинико-лабораторных показателей «цитокинового шторма» гистологически обнаружены активированные макрофаги, признаки апоптоза в виде внутриальвеолярных и фагоцитированных апоптозных телец, вирус SARS-CoV-2 выявлен в капиллярах межальвеолярных перегородок. Косвенным свидетельством апоптоза является экспрессия TNF α в фагосомах макрофагов.

6) Внутрисосудистая легочная коагулопатия является одним из ведущих проявлений новой коронавирусной пневмонии, в патогенезе которой

играет роль вирус-опосредованное повреждение эндотелия сосудов - эндотелиоцитов и перицитов.

7) При прицельном рентгено-морфологическом сопоставлении было обнаружено, что КТ-симптом «матового стекла» соответствует ранним изменениям при экссудативной фазе ДАП в виде внутриальвеолярного отека, гиалиновых мембран при наличии внутриальвеолярного и интерстициального воспаления и очаговых кровоизлияний, а при симптоме «булыжной мостовой» имеет место мозаичное распределение описанных выше изменений.

8) При КТ-симптомах организующейся пневмонии гистологические изменения соответствовали пролиферативной фазе ДАП с наличием внутриальвеолярной грануляционной ткани и/или фибрина в сочетании с участками дистелектазов. Консолидация при КТ легких соответствовала морфологическим участкам выраженных внутриальвеолярных кровоизлияний и/или организующейся пневмонии.

9) Вторичная (нозокомиальная) очаговая или очагово-сливная бактериальная пневмония у умерших от COVID-19 была выявлена в 29,1% наблюдений и развивалась после длительной ИВЛ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты анализа морфологических изменений при разных КТ-симптомах новой коронавирусной пневмонии могут быть использованы при назначении и коррекции терапии на разных стадиях вирусной интерстициальной пневмонии.

2. Сочетание различных фаз диффузного альвеолярного повреждения может свидетельствовать о длительной персистенции вируса SARS-CoV-2 в ткани легкого, что позволяет пересматривать подходы к продолжительности патогенетической противовирусной терапии.

3. Учитывая отсутствие признаков диффузного альвеолярного повреждения и наличие микрососудистого поражения у части пациентов с дыхательной недостаточностью, появляется необходимость разработки новых

терапевтических стратегий, направленных на коррекцию коагуляции и тромбообразования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) **Омарова Ж.Р.** Сопоставление рентгенологической и патоморфологической картины легких у пациентов с COVID19-инфекцией / Першина Е.С., Черняев А.Л., Самсонова М.В, Варясин В.В., Омарова Ж.Р, Перешивайлов С.О., Бережная Э.Э., Паршин В.В., Михайличенко К.Ю., Шилова А.С., Щекочихин Д.Ю., Гиляров М.Ю. // Медицинская визуализация. 2020. - № 24 (3). - С. 37-53.

2) **Омарова Ж.Р.** Особенности патологической анатомии легких при COVID-19 / Самсонова М.В., Черняев А.Л., Омарова Ж.Р., Першина Е.А., Мишнев О.Д., Зайратьянц О.В., Михалева Л.М., Калинин Д.В., Варясин В.В., Тишкевич О.А., Виноградов С.А., Михайличенко К.Ю., Черняк А.В. // Пульмонология. 2020. - № 30(5). - С. 519–532.

3) **Omarova J.R.** Targeted Study of Pulmonary Pathology and Chest Computed Tomography (CT) Findings in COVID-19. / Samsonova M.V, Pershina E.S., Schekochikhin D.J., Shilova A.S, Mikhajlichenko K.J., Zayratyants O.V., Berezhnaya E.E., Parshin V.V., Omarova J.R., Cherniaev A.L. // Am J Respir Crit Care Med. 2021. - №203. - A3820

4) **Омарова Ж.Р.** Цитокиновый шторм при COVID-19: аутопсийное наблюдение. / Самсонова М.В., Белоцерковская М.М., Черняев А.Л., Талалаев А.Г., Омарова Ж.Р., Лебедин Ю.С. // Практическая пульмонология. 2021. - № 3. - С. 33-39.

5) **Омарова Ж.Р.** Прицельная морфологическая характеристика легких при COVID-19 на основании компьютерной томографии. / Омарова Ж.Р., Першина Е.С., Самсонова М.В., Щекочихин Д.Ю., Перешивайлов С.О., Черняев А.Л., Бережная Э.Э., Паршин В.В., Туманов В.П. // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2022. - №19 (1). – С. 22-27.

6) **Омарова Ж.Р.** Изменения легких при сочетании ВИЧ-инфекции и COVID-19 / Пархоменко Ю.Г., Черняев А.Л., Ведяпин П.А., Мозгалева Н.В., Омарова Ж.Р., Тишкевич О.А., Гомзикова Е.А., Самсонова М.В., Жиленкова А.С., Лебедин Ю.С. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2022. - № 2 (11). - С. 71-77.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ДАП – диффузное альвеолярное повреждение
- КТ – компьютерная томография
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ИЛ – интерлейкин
- SARS – тяжелый острый респираторный синдром
- MERS – ближневосточный респираторный синдром
- СРБ – С-реактивный белок
- TNF α – фактор некроза опухоли α
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ГБ – гипертоническая болезнь
- БОД – болезни органов дыхания
- ИВЛ – искусственная вентиляция лёгких
- ПК – персональный компьютер
- ДЗ – длительность заболевания
- ЧД – частота дыхания
- НСИП – неспецифическая интерстициальная пневмония
- CD4 – кластер дифференцировки 4
- CD8 – кластер дифференцировки 8
- ФЭЕ - фибрин-эквивалентные единицы