

Ламанов Алексей Николаевич

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ
КАПИЛЛЯРОВ МИОКАРДА ПРИ COVID-19**

3.3.2. Патологическая анатомия

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук

Савченко Сергей Владимирович
Айзикович Борис Исаевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Волков Александр Михайлович

(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, патологоанатомическое отделение, врач патологоанатом)

доктор биологических наук

Сорокина Ирина Васильевна

(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии имени академика Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук», отдел медицинской химии, лаборатория фармакологических исследований, ведущий научный сотрудник)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «_____» _____ 2024 г. в ____ : ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: 8 (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 229-10-83); <https://new.ngmu.ru/dissers/dissertation/4235>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. На современном этапе мультидисциплинарного изучения инфекционного заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, которое в 2020 году сопровождалось Всемирной пандемией и унесло около 7 миллионов (6 937 349) жизней, было установлено, что развивающаяся патология не ограничивается поражением органов дыхания (Zhou F. et al., 2020; Horton R. et al., 2020; Mezache L. et al., 2022; Jones E. et al., 2023; Albalbaki M. et al., 2024; Dubey M. et al., 2024). Для тяжёлого течения COVID-19 характерно развитие цитокинового шторма, который проявляется формированием васкулярной эндотелиальной дисфункцией, коагулопатией, тромбозами с наличием антител к фосфолипидам, с клинической картиной, напоминающей катастрофический антифосфолипидный синдром (Коган Е. А. и др., 2020; Коган Е. А. и др., 2021; Митрофанова Л. Б. и др., 2022). Развиваются выраженные микроциркуляторные расстройства, метаболическая интоксикация и гипоксия, которые приводят к полиорганной недостаточности и летальному исходу (Рыбакова М. Г. и др., 2020; Basso C. et al., 2020; Kim I. C. et al., 2020; Arévalos V. et al., 2021; de Roquetaillade C., et al., 2021; Tucker W. et al., 2023).

Повреждение эндотелия при COVID-19 получило название SARS-CoV-2 – ассоциированная эндотелиальная дисфункция, которая может быть вызвана как специфическим вирусным действием, так и цитокиновым штормом, которые проявляются эндотелиитом и синдромом гиперкоагуляции с формированием тромботической микроангиопатии лёгких, миокарда, головного мозга, почек и других органов (Amraei R. et al., 2020; Ackermann M. et al., 2020; Andrianto M. J et al., 2021; Ambrosino P. et al., 2021; Xu S. et al., 2023).

Известны респираторные осложнения новой коронавирусной инфекции (COVID-19). В то же время проведёнными исследованиями показано, что неблагоприятные исходы у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, могут быть связаны с развитием осложнений, обусловленных поражением сердца при прямом воздействии самого вируса (Shi S. et al., 2020; Guo T. et al., 2020; Liu P. P. et al., 2020; Italia L. et al., 2021). При развитии COVID-19 клинически часто наблюдается симптоматика, ассоциированная с острым повреждением сердца. Кардиальные симптомы при COVID-19 могут варьировать от полного отсутствия

у пациентов каких-либо изменений, при наличии повышенного уровня тропонина и изменений на ЭКГ и УЗИ, до развития тяжелых аритмий, острого коронарного синдрома и внезапной сердечной смерти (Коган Е. А. и др., 2020; Amraei R. et al., 2020; Коган Е. А. и др., 2021; Ackermann M. et al., 2020; Barnes B. J. et al., 2020; Adeghate E. A. et al., 2021; Angeles Montero-Fernandez M. et al., 2021; Andrianto M. J. et al., 2021; Ambrosino P. et al., 2021; Митрофанова Л. Б. и др., 2022; Kirkpatrick J. et al., 2023; Sakr A. et al., 2023).

По мнению Guervilly C. et al. (2020), Mancuso P. et al. (2020), Xu S. et al. (2023) возможным механизмом, приводившим к развитию недостаточности кровообращения при COVID-19 и сопровождавшимся летальными исходами, можно отнести расстройства микроциркуляции и эндотелиальную недостаточность, обусловленные изменениям структуры эндотелиальных клеток (Guervilly C. et al., 2020; Mancuso P. et al., 2020; Xu S. et al., 2023).

Для понимания патогенеза и особенностей развития различных осложнений при COVID-19 имеет важное значение исследование клеточной локализации SARS-CoV-2 в клетках органов и тканей пациентов, умерших от этой инфекционной патологии (Bullock H. A. et al., 2021). При этом информативным методом исследования может стать электронная микроскопия при условии соблюдения критериев морфогенеза вируса для корректной интерпретации цитоплазматических структур и вирусных частиц (Goldsmith C. S. et al., 2020; Miller S. E. et al., 2020; Dittmayer C. et al., 2020; Bullock H. A. et al., 2021; Krasemann S. et al., 2022).

Проведение комплексного морфологического исследования с изучением гистологических, ультраструктурных и молекулярно-биологических изменений эндотелиальных клеток кровеносных капилляров миокарда при тяжелых формах COVID-19 может позволить выявить новые механизмы поражения сердца, а также даст возможность разработать пути своевременной профилактики и эффективного лечения тяжелых форм COVID-19 (Бгатова Н. П. и др., 2023).

Степень разработанности темы исследования. Анализ сведений, изложенных в специальной литературе, свидетельствует об отсутствии полноты данных, касающихся структурных изменений кровеносных капилляров миокарда при COVID-19, а также возможности вирусного инфицирования эндотелиоцитов,

что является необходимым для более полного понимания механизмов развития микроциркуляторных расстройств, лежащих в основе острого поражения сердца при этом инфекционном заболевании (Giustino G. et al., 2020; Ferro M. D. et al., 2021; Митрофанова Л. Б. и др., 2022). Это может быть полезным для разработки кардиопротекции с целью снижения летальности пациентов (Ferro M. D. et al., 2021). Вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить патоморфологические изменения и молекулярные биомаркеры эндотелия кровеносных сосудов миокарда, а также ультраструктурную перестройку эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при тяжелых формах COVID-19.

Задачи исследования

1. Изучить патоморфологические изменения миокарда при тяжёлых формах COVID-19 с нарушением функции левого желудочка сердца.
2. Оценить молекулярно-биологические характеристики эндотелиальных клеток кровеносных капилляров миокарда при тяжёлых формах COVID-19.
3. Изучить на ультраструктурном уровне возможности выявления морфологических признаков инфицирования эндотелиальных клеток капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2.
4. Исследовать ультраструктурную перестройку эндотелиальных клеток капилляров миокарда при COVID-19.

Научная новизна. Приоритетным является анализ морфологических основ развития дисфункции левого желудочка сердца при тяжелых формах COVID-19 с развитием острых расстройств кровообращения в сердечной мышце, образованием острых очаговых повреждений миокарда, десквамацией и пролиферацией эндотелия капилляров миокарда, а также снижением экспрессии эндотелиальных маркеров CD31 и CD34.

Впервые проведено сравнение выявленных при ультраструктурном анализе аутопсийного материала при COVID-19 морфологических признаков инфицирования эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2 с представленными в литературе данными, основанными на изучении культуры клеток Vero E6 при их вирусном инфицировании.

Впервые описаны особенности перестройки эндотелиоцитов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, с образованием характерных ультраструктурных изменений в виде возрастания объемной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибосом, комплекса Гольджи и липидных включений, наличия в цитоплазме эндотелиоцитов ЭР с застежкой-молнией (zippered endoplasmic reticulum), двумембранных структур и одномембранных вакуолей с вирусными частицами, наличия электронноплотного материала в цистернах комплекса Гольджи.

Приоритетными явились данные о перестройке структуры внутриклеточной мембраны в цитоплазме эндотелиальных клеток капилляров сердечной мышцы при COVID-19 и образовании двумембранных везикул из эндоплазматического ретикулума для обеспечения синтеза вирусной РНК при COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты исследования дают основу для дальнейшего изучения морфологических изменений эндотелиальных клеток капилляров сердечной мышцы при тяжелых формах COVID-19.

Выявленные патоморфологические, ультраструктурные и молекулярно-биологические изменения эндотелиальных клеток капилляров сердечной мышцы позволяют обосновать развитие клинически наблюдаемых симптомов острого повреждения сердца при тяжелых формах COVID-19.

Полученные данные о морфологических признаках инфицирования эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2, а также ультраструктурной перестройке клетки свидетельствуют о репликации вируса для обеспечения синтеза вирусной РНК при COVID-19.

Данные об особенностях изменений структуры эндотелия кровеносных капилляров миокарда и морфологии мышцы сердца могут быть использованы в практической работе врачами патологоанатомами и врачами судебно-медицинскими экспертами при проведении аутопсий в случаях COVID-19, а также могут помочь при разработке новых подходов терапии тяжелых форм COVID-19.

Методология и методы диссертационного исследования. В основу диссертационной работы вошло изучение литературы по теме научной работы,

использованы принципы системного анализа со статистической обработкой полученных патоморфологических изменений. Для научного исследования были использованы общенаучные, специальные и логические методы научного познания. Изучены данные медицинских карт больных, получавших лечение в стационарных условиях, умерших от COVID-19 ($n = 73$), проведены световая и поляризационная микроскопия, иммуногистохимическое исследование, электронная микроскопия с изучением ультраструктуры эндотелиоцитов капилляров сердечной мышцы. Работа выполнена с соблюдением правил биоэтики и полностью согласуется с принципами проведения научных исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Морфологические изменения сердечной мышцы и молекулярно-биологические характеристики эндотелия кровеносных капилляров миокарда при тяжёлых формах COVID-19 представлены расстройствами кровообращения с образованием острых очаговых повреждений миокарда, десквамацией и пролиферацией эндотелиальных клеток, а также выраженным снижением экспрессии молекул адгезии (CD31 и CD34).

2. Ультраструктурные признаки инфицирования эндотелиальных клеток капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2 характеризуются наличием вирусных частиц в двухмембранных структурах и в одномембранных клеточных вакуолях цитоплазмы клеток, в просвете кровеносных капилляров и в перикапиллярных пространствах.

3. Ультраструктурные изменения эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при тяжёлых формах COVID-19 связаны с инфицированием и перестройкой клеток обусловленных репликацией вируса SARS-CoV-2, что сопровождается перестройкой структуры внутриклеточной мембраны эндотелия, образованием двумембранных везикул возрастанием объёмной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибосом, комплекса Гольджи и липидных включений, а также появлением в цитоплазме эндотелиоцитов эндоплазматического ретикулума с застёжкой-молнией (zippered endoplasmic reticulum), двумембранных структур и одномембранных вакуолей с вирусными частицами, электронноплотного материала в цистернах комплекса Гольджи.

Степень достоверности. Большая по объему выборка умерших от COVID-19 в количестве 73 пациентов, проведенный анализ всех медицинских карт, а также достаточное количество морфологических исследований на современном диагностическом оборудовании (световая микроскопия, микроскопия с иммуногистохимическим окрашиванием, микроскопия в поляризационном свете, электронная микроскопия и морфометрическое исследование) обеспечивают достоверность полученных результатов. Методы статистической обработки полученных данных соответствуют поставленным целям и задачам, что свидетельствует о достоверности проведенной научной работы. Выполненная работа соответствует паспортам научных специальностей: 3.3.2. Патологическая анатомия и 1.5.22. Клеточная биология.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования были доложены: на заседании Новосибирского областного научного общества патологоанатомов (Новосибирск, 2021); на 13-й Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/системная биология» (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology) (Новосибирск, 2022); на межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 120-летию Городской инфекционной клинической больницы № 1 города Новосибирска (Новосибирск, 2024).

Материалы диссертации обсуждены на заседании сотрудников патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России (Новосибирск, 2022).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2024).

Диссертация выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Изучение закономерностей развития нормальных и патологических процессов в организме

при действии факторов экзо- и эндогенной природы: межклеточные и межсистемные взаимодействия при остром и хроническом воспалении, репаративной регенерации, онкогенезе, фиброзировании, дисплазии соединительной ткани; возможности диагностики, профилактики, лечения», номер государственной регистрации 121061500014-3.

Внедрение результатов работы в практику. Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, внедрены в практику работы патологоанатомических отделений ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1», ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России.

Новые данные по материалам диссертации используются в учебном процессе на кафедре патологической анатомии, на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина и на кафедре инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации по теме диссертационного исследования. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 статей в научных журналах и изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 4 статьи в журналах категории K1, входящих в список изданий, распределённых по категориям K1, K2, K3, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования CA(pt), Scopus, Web of Science, PubMed и Springe.

Объем и структура диссертации. Диссертационное исследование изложено на 142 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований с их обсуждением, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 27 рисунками. Библиография представлена 370 источниками, из которых 289 – в зарубежных изданиях.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен анализ научных публикаций по теме, сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн исследования, проведен забор аутопсийного материала для морфологических исследований. Диссертационное исследование выполнено лично автором.

Автор выражает большую благодарность доктору биологических наук, профессору, заведующей лабораторией ультраструктурных исследований НИИКЭЛ–филиала ИЦиГ СО РАН Наталье Петровне Бгатовой за бесценный опыт совместной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования проанализированы результаты 73 случаев патологоанатомического вскрытия тел больных двусторонней вирусной полисегментарной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, с летальным исходом, находившихся на лечении в ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», в ходе выполнения которого основной причиной смерти был назван COVID-19. Все патологоанатомические вскрытия были выполнены с полным соблюдением всех необходимых регламентирующих требований по работе с особо опасными инфекциями СП 1.3.3118-13 (Бгатова Н. П. и др., 2023).

Патологоанатомическое вскрытие проводилось на основании Федерального закона № 323 – трупы лиц, умерших от инфекционного заболевания или при подозрении на него, обязательно подлежат вскрытию в целях получения данных о причине смерти человека и диагнозе заболевания на основании (ст. 67 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации»).

Перед патологоанатомическим вскрытием осуществлялось изучение клинических, анамнестических и лабораторных данных из медицинской карты стационарного больного, так как для проведения патологоанатомического вскрытия вместе с телом умершего (мертворожденного, плода) направляется медицинская документация умершего – медицинская карта стационарного больного, медицинская карта амбулаторного больного и пр., что регламентируется приказом Министерства здравоохранения Российской

Федерации от 06 июня 2013 г. № 354н «О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий».

В качестве контрольной группы использован материал 15 судебно-медицинских экспертиз лиц, умерших от внезапной коронарной смерти, проведенных в танатологическом и Болотнинском районном отделениях ГБУЗ НСО «НОКБ СМЭ». Перед проведением судебно-медицинской экспертизы трупов осуществлялось ознакомление с вынесенным постановлением и данными представленных на экспертизу медицинских документов, на основании ст. 10 «Объекты исследований» Федерального закона от 31 мая 2001 г. № 73-ФЗ «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации» (с изменениями от 30 декабря 2001 г.).

Судебно-медицинские экспертизы трупов и забор материала производились на основании Приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», в частности ст. 38: «Экспертиза трупа может быть начата лишь после появления ранних трупных изменений...»; ст. 72.1: «... в обязательном порядке производится взятие объектов трупа и его частей и направление их для судебно-гистологической экспертизы в случаях наступления смерти в организациях здравоохранения»; ст. 49: «...для проведения лабораторных и (или) инструментальных экспертных исследований из трупа могут быть взяты какие-либо его части, внутренние органы и ткани...»; ст. 50: «...перечень и количество биологических объектов, виды инструментальных и (или) лабораторных исследований определяет эксперт...».

Патолого-анатомические вскрытия и забор материала проводились на основании приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06 июня 2013 г. № 354н «О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий», в частности ст. 24: «При проведении патолого-анатомического вскрытия гистологический, биохимический, микробиологический и другие необходимые методы исследований отдельных органов, тканей умершего или их частей являются неотъемлемой частью диагностического процесса в целях выявления причин смерти человека, осложнений основного заболевания и

сопутствующего заболевания, его состояния. Волеизъявление умершего, высказанное при его жизни, либо письменное заявление супруга, близкого родственника (детей, родителей, усыновленных, усыновителей, родных братьев и родных сестер, внуков, дедушки, бабушки), а при их отсутствии иных родственников либо законного представителя умершего о проведении таких исследований не требуется».

При работе с телами умерших строго соблюдались требования и условия Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000) и Федерального закона «О погребении и похоронном деле», ст. 5: «Волеизъявление лица о достойном отношении к его телу после смерти...».

Вторым этапом проводилась микроскопия – световая, в поляризационном свете и с окраской ОКГ по Д. Д. Зербино (для определения давности образования фибрина) – фрагментов сердечной мышцы из области передней стенки левого желудочка сердца.

Далее проводилось исследование «случай–контроль» с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и иммуногистохимического метода.

Для исключения аутолитических изменений тканей и клеток миокарда, забор материала для трансмиссионной электронной микроскопии, как при проведении патологоанатомических вскрытий, так и при проведении судебно-медицинских экспертиз проводился до 2–3 часов после констатации биологической смерти медицинской организацией, для чего использовался метод ранних аутопсий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка клинико-функциональных и лабораторных данных при COVID-19. При выполнении исследования проводился анализ данных медицинских документов для оценки клинико-функциональных проявлений и лабораторных показателей у пациентов с COVID-19, предшествующий терминальному состоянию. Согласно данным КТ и рентгенографического исследования легких у всех пациентов с тяжелыми формами COVID-19 было выявлено обширное поражение легких, превышающее во всех наблюдениях 70 % суммарной площади органов. У пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекции отмечали статистически значимое повышение

С-реактивного протеина, показатель которого возрастал более чем в 100 раз относительно нормальных референсных значений (Таблица 1).

У каждого третьего пациента в последние 3–5 суток пребывания в стационаре до наступления летального исхода наблюдалась стойкая резистентная артериальная гипотония, при которой средние показатели АД < 50 мм рт. ст., несмотря на использование вазопрессорных препаратов. Это было связано со снижением сократительной способности миокарда и периферического сосудистого сопротивления.

Таблица 1 – Характеристика клинико-функциональных и лабораторных показателей у пациентов с тяжелой формой COVID-19

Показатель	Нормальные значения	Тяжелые формы COVID-19
СР протеин (мг/л)	0–5	137,03 [95 %]*
Тропонин I (нг/мл)	0–1	3,70 [95%]*
D-димер (нг/мл)	250	420,00 [95 %]*
Поражение легких (в %)	—	73,10 [95 %]*
УЗИ сердца ФЛЖ (в%)	55–70	43,50 [95 %]*
Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с нормальными значениями.		

При оценке показателей, характеризующих развитие нарушений функциональной способности сердца у пациентов с тяжелой формой COVID-19, было отмечено возрастание более чем в 3 раза тропонина I. Это свидетельствовало об остром повреждении миокарда. Информативным показателем снижения сократительной способности миокарда левого желудочка явились данные ЭХО-кардиографического исследования, при котором отмечали снижение фракции выброса левого желудочка на 32 %. По данным ЭКГ-контроля функциональной деятельности сердца у всех пациентов отмечали нарушение реполяризации. Более чем в 70 % случаев на ЭКГ наблюдали различные аритмические нарушения, среди которых превалировала фибрилляция предсердий.

По мере прогрессирования COVID-19 с повторными цитокиновыми атаками возрастал в несколько раз показатель D-димера, как информативный

лабораторный показатель повреждения эндотелия у пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекции.

Оценка патоморфологических изменений миокарда при COVID-19.

Развитие тяжелых форм новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у пациентов с летальным исходом сопровождается патогистологическими изменениями в миокарде, выявляемыми при световой микроскопии срезов, окрашенных гемотоксилином и эозином. Были выявлены признаки острых расстройств кровообращения в виде паретически расширенных, полнокровных вен, спазмированных интрамуральных артерий с вертикальным вытягиванием эндотелиоцитов в просвет, стазов эритроцитов, местами с явлением сладж-феномена. Эндотелиальные клетки кровеносных капилляров были резко набухшими, во многих полях зрения с признаками пролиферации. Наблюдала диapedезные и очаговые кровоизлияния, образование которых было связано с нарушением проницаемости сосудистой стенки. В просвете сосудов были обнаружены лейкостазы, местами – краевое стояние лейкоцитов и их миграция в окружающую ткань. Кроме того, наблюдали появление в просвете сосудов фибриновых масс, что было обусловлено процессом внутрисосудистого тромбообразования. При окраске срезов миокарда ОКГ (по Д. Д. Зербино) отмечали окрашивание фибрина в различные тона, позволяющее судить о давности образования тромбов.

Описанные патогистологические изменения сопровождались ишемией мышцы сердца и образованием острых очаговых повреждений миокарда, выявляемых при поляризационной микроскопии. У пациентов умерших от тяжелых форм COVID-19 было отмечено наличие в миокарде множественных сегментарных контрактур кардиомиоцитов, а также контрактур I, II и III степени. Наблюдала не менее 2–3 контрактуры в одном поле зрения, которые чаще выявляли в субэндокардиальных слоях миокарда левого желудочка сердца. Наряду с контрактурами, просматривались единичные кардиомициты или небольшие группы клеток с миоцитолизисом или первичным глыбчатым распадом. Кроме того, был выявлен липофусциноз в виде мелких жировых включений в отдельных группах кардиомиоцитов. Липофусциноз, также как и все

вышеуказанные патоморфологические изменения, был выявлен во всех наблюдениях COVID-19 и был связан с дистрофическими изменениями миокарда.

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при COVID-19. На современном этапе электронная микроскопия является золотым стандартом при исследовании инфекционных заболеваний, учитывая, что данный метод позволяет визуализировать вирусные частицы в тканях и внутри клеток и выявлять клетки-мишени вирусной инфекции, поэтому на следующем этапе работы был проведен ультраструктурный и морфометрический анализ ультраструктурной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при COVID-19.

При анализе аутопсийного материала сердца, полученного от пациентов с COVID-19, и обосновании ультраструктурных особенностей эндотелия кровеносных капилляров миокарда мы основывались на работах исследований, выполненных на культуре клеток Vero E6 при их вирусном инфицировании.

При COVID-19 наблюдали гетерогенность ультраструктурной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров. Эндотелиальные клетки находились в состоянии отека-набухания шириной до 0,8 мкм на периферии. Отличительной чертой цитоплазмы эндотелиальных клеток при COVID-19 было повышенное содержание мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и свободных лизосомальных комплексов рибосом.

В просвете капилляров и перикапиллярном пространстве наблюдали вирусы, которые представляют собой единичные или небольшие группы электронноплотных частиц от округлой до овальной формы, размерами 60–170 нм, с видимыми поверхностными выступами. Внутренняя структура вирусов представляла собой неоднородные гранулярные профили рибонуклеопротеида (РНП), в виде круглых или продолговатых электронноплотных структур, размерами 6–12 нм.

В просветах капилляров и перикапиллярном пространстве отмечали контакты вируса с микроворсинками и клеточной мембраной эндотелиальных клеток.

В качестве особенностей при изучении ультраструктуры эндотелиальных клеток кровеносных капилляров сердечной мышцы при COVID-19 нужно отметить наличие большого количества вакуолей в околоядерной зоне, которые

отсутствовали в контроле. Цистерны комплекса Гольджи расширены, округлой или овальной формы, содержат электронноплотный материал. В цитоплазме наблюдалась различная степень накопления везикулярных структур. В цитоплазме эндотелиоцитов обнаружены липидные включения разной степени выраженности, больше в парануклеарном пространстве, которые в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда в контроле не обнаружены.

В цитоплазме эндотелиальных клеток контрольной группы, двумембранные структуры не обнаружены, в цитоплазме эндотелиальных клеток умерших от тяжелых форм COVID-19 наблюдали наличие двумембранных структур, которые имели круглую или овальную форму, разных размеров (до 300×500 нм), иногда собранные в кластеры.

Цитоплазма эндотелиоцитов, кроме двумембранных структур, содержала закрученные спирально мембраны эндоплазматического ретикулума, часть из них связаны с двумембранными структурами и эндоплазматическим ретикуломом, образуя дезорганизованные ретикулярные структуры, размером до 500×800 нм.

Внутри клетки отмечали вирусные частицы, которые находились либо в двумембранных везикулах, либо в одномембранных структурах без непосредственного контакта вириона с цитозолем. Вирусные частицы, таким образом, образовывали от небольших компартментов с одной вирусной частицей и электронноплотным материалом до очень больших компартментов с десятками частиц, замкнутых в двумембранных структурах овальной или округлой форм, размерами до 400×600 нм, а также в одномембранных вакуолях размерами до 250×500 нм. Иногда компартменты прикреплялись к внутренней поверхности мембран люминальной или аблюминальной поверхности эндотелиальной клетки.

В исследовании преобладающими структурами в эндотелии кровеносных капилляров миокарда у умерших от тяжелых форм COVID-19 были мембраны эндоплазматического ретикулума с застежкой-молнией (zippered endoplasmic reticulum (ER) с рибосомами, т. е. отсутствовало просветное пространство цистерн. Отмечали вакуоли с вирусными частицами, набухшие митохондрии, в которых не выявлялись кристы.

Таблица 2 – Результаты морфометрии эндотелиоцитов кровеносных капилляров с преобладанием рибосом и мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума ($M \pm SD$)

Параметры	Контроль	COVID-19
Кавеолы люминальные, V_v	$3,46 \pm 1,18$	$2,81 \pm 1,75$
Кавеолы аблюминальные, V_v	$10,88 \pm 2,79$	$(5,92 \pm 2,43)^*$
Транспортные везикулы, V_v	$12,18 \pm 2,74$	$(4,67 \pm 2,19)^*$
Митохондрии, V_v	$5,75 \pm 1,75$	$6,43 \pm 4,11$
ГЭР, V_v	$6,11 \pm 1,48$	$(12,94 \pm 4,26)^*$
Рибосомы, V_v	$5,22 \pm 1,32$	$(10,88 \pm 4,62)^*$
Лизосомы, V_v	$2,56 \pm 1,08$	$3,51 \pm 2,35$
Аппарат Гольджи, V_v	$2,14 \pm 1,39$	$(4,33 \pm 1,52)^*$
Липиды, V_v	0	$(5,52 \pm 0,71)^*$
Примечание: V_v – объемная плотность структур (%); ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум; * – отличия от соответствующих значений в контроле $p \leq 0,05$.		

При морфометрическом анализе ультраструктуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда левого желудочка сердца у больных умерших от COVID-19 были выявлены статистически значимые морфологические изменения в сравнении с эндотелиальными клетками контрольной группы (см. таблицу 2).

Объемная плотность аблюминальных кавеол в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда передней стенки левого желудочка основной группы была меньше в 1,8 раза, чем объемная плотность аблюминальных кавеол в эндотелиоцитах контрольной группы. Объемная плотность транспортных везикул в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда основной группы была меньше в 2,6 раза, чем объемная плотность транспортных везикул в эндотелиоцитах контрольной группы. Объемная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулума в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда основной группы была больше в 2,1 раза, чем объемная плотность ГЭР в эндотелиоцитах контрольной группы. Объемная плотность рибосом в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда основной группы была больше в 2,1 раза, чем объемная плотность рибосом в эндотелиоцитах контрольной группы. Объемная плотность аппарата Гольджи в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда основной группы

была больше в 2 раза, чем объемная плотность аппарата Гольджи в эндотелиоцитах контрольной группы. Объемная плотность транспортных липидов в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда основной группы была больше в 5,5 раза, чем объемная плотность липидов в эндотелиоцитах контрольной группы, так как липидные капли в контрольной группе отсутствовали.

Оценка иммуногистохимических изменений миокарда при COVID-19.

Выявленные особенности поражения эндотелия COVID-19 коррелировали с данными, полученными при проведении иммуногистохимического исследования, которое проводилось с целью определения уровня экспрессии моноклональных антител к эндотелиальному фактору CD31 и CD34. Экспрессия эндотелиоцитами кровеносных сосудов миокарда при тяжелом течении COVID-19 характеризовалась выраженным снижением уровня белков-маркеров кровеносных сосудов CD31(PECAM-1) и CD34, что является молекулярно-биологическим обоснованием развития эндотелиальной дисфункции при COVID-19 обусловленной альтерацией эндотелиоцитов (Таблица 3).

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что воспалительная реакция при COVID-19 является важным фактором для развития выраженных микроциркуляторных расстройств, сопровождающихся альтерацией эндотелиоцитов, эндотелиально-мезенхимальным переходом, эндотелиальной дисфункцией и эндотелиальной деструкцией, с наличием выявляемых циркулирующих эндотелиальных клеток.

Таблица 3 – Иммуногистохимическое исследование объемной плотности (V_v , %) сосудов миокарда при экспрессии эндотелиального фактора CD31 и эндотелиального фактора CD34 в группе пациентов с COVID-19 и контрольной группе ($M \pm SD$)

Параметры исследования	Контрольная группа	Основная группа
CD31	$4,11 \pm 1,59$	$(1,69 \pm 1,33)^*$
CD34	$6,12 \pm 1,78$	$(2,35 \pm 2,00)^*$
Примечание: * – $p < 0,0005$ при сравнении с контрольной группой.		

ВЫВОДЫ

1. При тяжелых формах COVID-19 патоморфологические изменения миокарда характеризуются острыми расстройствами кровообращения, очаговыми кровоизлияниями, отеком, десквамацией и пролиферацией эндотелия кровеносных сосудов, также образованием острых очаговых повреждений миокарда и липофусцинозом кардиомиоцитов, что связано с эндотелиальной дисфункцией и сопровождается снижением сократительной способности мышцы сердца левого желудочка.

2. Развитие тяжелых форм COVID-19 сопровождается изменением молекулярных характеристик эндотелия кровеносных капилляров миокарда и характеризуется снижением экспрессии маркеров мембранных белков клеточной адгезии CD31 и CD34, это отражает развивающиеся нарушения межклеточного взаимодействия эндотелиоцитов, барьерной функции эндотелия и его прогрессирующую дисфункцию.

3. Ультраструктурное исследование аутопсийного материала при тяжелых формах COVID-19 с летальным исходом позволило выявить морфологические признаки инфицирования эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2, что характеризовалось обнаружением вирусных частиц внутри клетки как в двухмембранных структурах, так и в одномембранных клеточных вакуолях, а также располагающихся внеклеточно – в просвете кровеносных капилляров и в перикапиллярных пространствах.

4. Инфицирование эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда вирусом SARS-CoV-2 сопровождалось перестройкой клеток, которая характеризовалась возрастанием объемной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибосом, комплекса Гольджи и липидных включений, образованием в цитоплазме эндотелиоцитов эндоплазматического ретикулума с застежкой-молнией (zippered endoplasmic reticulum), двухмембранных структур и одномембранных вакуолей с вирусными частицами, а также появлением электронноплотного материала в цистернах комплекса Гольджи.

5. Перестройка эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда у пациентов с тяжелым течением COVID-19, связанная с последующей репликацией вируса SARS-CoV-2 для обеспечения синтеза вирусной РНК, сопровождается изменением структуры внутриклеточной мембраны в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда, а также образованием двухмембранных везикул из эндоплазматического ретикулума.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты микроскопического и иммуногистохимического исследования могут быть использованы в практической работе патологоанатомических отделений лечебно-профилактических учреждений и судебно-гистологических лабораторий бюро судебно-медицинской экспертизы для выявления патоморфологических изменений миокарда и повреждений эндотелия кровеносных капилляров мышцы сердца в случаях COVID-19.

2. Данные о структурных изменениях эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда являются морфологическим обоснованием развития острого повреждения сердца при тяжелых формах COVID-19 и могут быть положены в основу методических подходов для изучения механизмов развития сердечной недостаточности при новой коронавирусной инфекции.

3. Полученные новые знания о патоморфологических, ультраструктурных и молекулярно-биологических особенностях эндотелия кровеносных капилляров миокарда при инфицировании SARS-CoV-2 могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах патологической анатомии и кафедрах гистологии, эмбриологии и цитологии медицинских вузов, а также при подготовке клинических ординаторов и повышении квалификации врачей по специальности «Патологическая анатомия».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клинико-анатомический анализ летальности COVID-19 при скоропостижной смерти и у умерших в лечебно-профилактических учреждениях / С. В. Савченко, В. А. Грицингер, В. В. Тихонов, [и др., в том числе **А. Н. Ламанов**] // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2021. – Т. 64, № 3. – С. 5–10.

2. Морфологические изменения сердца и сосудов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 / С. В. Савченко, **А. Н. Ламанов**, В. П. Новоселов [и др.] // **Вестник судебной медицины**. – 2021. – Т. 10, № 2. – С. 40–45.
3. Ультраструктурная перестройка эндотелиоцитов легочных кровеносных капилляров при COVID-19 / Н. П. Бгатова, С. В. Савченко, **А. Н. Ламанов** [и др.] // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2023. – № 175. – С. 667–672.
4. Intracellular organelles remodeling in myocardial endotheliocytes in COVID-19: an autopsy-based study / N. Bgatova, S. Savchenko, **A. Lamanov** [et al.] // **Ultrastruct Pathol**. – 2024. – Vol. 48 (1). – P. 66–74.
5. Структурная реорганизация миокарда при COVID-19 / **А. Н. Ламанов**, Б. И. Айзикович, С. В. Савченко [и др.] // **Journal of Siberian Medical Sciences**. – 2024. – № 3. – С. 3–8.
6. Морфологические изменения у пациентов, умерших в ЛПУ от COVID-19 / **А. Н. Ламанов**, А. А. Мигел, В. А. Грицингер, В. В. Тихонов // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики. – 2021. – Томск, STT. – С. 90–95.
7. Морфологические изменения у лиц, умерших на дому от COVID-19 / **А. Н. Ламанов**, А. А. Мигел, В. А. Грицингер, В. В. Тихонов // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики. – 2021. – Томск, STT. – С. 95–100.
8. Examination of myocardium and adrenal glands structure in patients with COVID-19 / N. Bgatova, S. Savchenko, **A. Lamanov** [et al.] // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022) : the thirteenth International multiconference, 04–08 Jule 2022. – Novosibirsk, Russia, 2022. – С. 764.
9. **Ламанов, А. Н.** Изменения структуры эндотелия кровеносных сосудов миокарда при COVID-19 / **А. Н. Ламанов**, О. М. Степина, А. Н. Гредунова // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы междунар. морфологической конкурс-конф. студентов и молодых ученых, 7 дек. 2023 г. – Новосибирск, 2023. – С. 254–256.

10. **Ламанов, А. Н.** Особенности внутриклеточных мембран эндотелия кровеносных капилляров миокарда при COVID-19 / **А. Н. Ламанов, К. П. Щепеткова** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы междунар. морфологической конкурс-конф. студентов и молодых ученых, 7 дек. 2023 г. – Новосибирск, 2023. – С. 257–259.

11. Засмолина, О. А. Исследование структурной организации миокарда в условиях инфицирования SARS-CoV-2 / О. А. Засмолина, **А. Н. Ламанов** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы междунар. морфологической конкурс-конф. студентов и молодых ученых, 7 дек. 2023 г. – Новосибирск, 2023. – С. 177–179.

12. Оценка патоморфологических изменений эндотелия кровеносных сосудов миокарда при COVID-19 / **А. Н. Ламанов, Б. И. Айзикович, С. В. Савченко** [и др.] // Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика : материалы научн.-практ. конференции, 12–13 сент. 2024 г. – Улан-Удэ, 2024. – Вып. 10 – С. 140–143.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД	артериальное давление
ГБУЗ НСО	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«НОКБСМЭ»	Новосибирской области «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы»
ГЭР	гранулярный эндоплазматический ретикулум
КТ	компьютерная томография
РНК	рибонуклеиновая кислота
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЭКГ	электрокардиограмма
ЭР	эндоплазматический ретикулум
COVID-19	Corona Virus Disease 2019 (коронавирусная болезнь 2019 года)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
Vv	объемная плотность структур