

УДК 616-091

Азбергенов Н.К., Комекбай Ж.Е.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ
ЛЕГКИХ УМЕРШИХ ОТ ВИРУС ИДЕНТИФИЦИРОВАННОЙ И НЕ
ИДЕНТИФИЦИРОВАННОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова,
Казахстан, г. Актобе

Вирус не идентифицированные случаи COVID-19 требуют морфологической дифференциальной диагностики и подтверждения. Наличие разницы гистопатологических картин при случаях смертей от вирус не идентифицированной и вирус идентифицированной коронавирусной болезни была подтверждена только по наличию статистически значимых различий по гистологическим критериальным признакам, такими как наличие или отсутствие светлоклеточной трансформации пневмоцитов ($p=0,038$), атипичных пневмоцитов ($p=0,001$) гиалиновых мембран в сравниваемых группах ($p=0,04$).

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, легкие, гистопатология, ПЦР

N.K. Azbergenov, Zh.E. Komekbay

**COMPARATIVE ANALYSIS OF HISTOPATHOLOGIC PATTERNS OF LUNGS OF
DECEASED FROM VIRUS IDENTIFIED AND UNIDENTIFIED CORONAVIRUS
INFECTION**

West Kazakhstan Marat Ospanov Medical University, Kazakhstan, Aktobe

Virus unidentified COVID-19 cases require morphologic difdiagnosis and confirmation. The presence of a difference in histopathologic patterns in cases of deaths from virus unidentified and virus identified coronavirus disease was confirmed only by the presence of statistically significant differences in histologic criterion features such as the presence or absence of pneumocyte luminal transformation ($p=0,038$), atypical pneumocytes ($p=0,001$) hyaline membranes in the compared groups ($p=0,04$).

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, lung, histopathology, PCR

Пандемия COVID-19 вызвала нагрузку в системе здравоохранения Казахстана. Как известно, первый случай заражения SARS-CoV-2 зарегистрирован в г. Ухань, провинция Хубэй, КНР, в декабре 2019 года [8]. В Казахстане первые случаи SARS CoV-2 зарегистрированы 13 марта 2020 года в городах Алматы и Нур-Султан. В июне с 2020г. по 2021г. в Казахстане отмечался резкий рост «атипичной» пневмонии неизвестной этиологии с клиникой, характерной картиной на КТ(картина матового стекла) схожими с COVID-19, но в то же время отрицательными результатами ПЦР тестирования. Регистрация же данных случаев с «COVID-19- подобной пневмонией» началась 1 августа 2020 года. Кодировать случаи «COVID-подобной пневмонии» начали с 4июля 2020г. Код МКБ U07.2- Коронавирусная инфекция COVID-19 (Вирус не идентифицирован) используется при ПЦР отрицательных тестах, и если COVID-19 диагностирован клинически, но лабораторные исследования неубедительны или недоступны. Код U07.1 (Вирус идентифицирован) используется, когда COVID-19 был подтвержден лабораторными исследованиями [9].

В настоящий момент ОТ-ПЦР является золотым стандартом диагностики SARS CoV-2, но существует вероятность ложноотрицательных результатов. Морфологические паттерны

характерные для COVID-19 хорошо изучены, но также известно, что морфологические особенности COVID-19 зачастую вызывает интерстициальную пневмонию, гиперплазию пневмоцитов и острое диффузное альвеолярное повреждение (DAD), наблюдаемые также при SARS-CoV, SARS-CoV-1, MERS, кори, вирусе гриппа. Гистологически экссудативная и пролиферативная фазы у вышеупомянутых вирусов совпадают с SARS CoV-2 [6, 18]. Не существует конкретных отличительных морфологических признаков, с помощью которых можно было бы уверенно отличить ДАП, связанный с COVID-19, от ДАП, вызванного другими причинами [11, 16]. Данные факты говорят о том, что требуется морфологическая дифференциальная диагностика SARS-CoV-2 при отрицательных ОТ-ПЦР тестах и в случаях подозрения на COVID-19.

Вопросы есть ли характерные гистопатологические паттерны при вирус не идентифицированных случаях и различия с вирус идентифицированными случаями в Казахстане вызвали у нас большой интерес.

Цель работы

Провести сравнительный анализ гистопатологических изменений легких умерших от вирус идентифицированной и не идентифицированной коронавирусной инфекции.

Материал и методы

Наше исследование одобрено локальной комиссией по биоэтике НАО «ЗКМУ им. М.Оспанова». Материалы: аутопсийные блоки умерших ($n=40$) от вирус идентифицированной($n=20$) и не идентифицированной коронавирусной инфекции($n=20$) в период с 2020г. по 2021г., полученные из Областного патологоанатомического Бюро г. Актобе. Клинические и морфологические данные получены из посмертных эпикризов и протоколов (карта) патологоанатомического исследования. Окраску микропрепараторов гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван Гизону проводили согласно инструкции стандартным операционным процедурам (СОП). Микроскопическое исследование всех репрезентативных срезов тканей проводили на предметных стеклах общепринятыми методиками с помощью микроскопа «Axio Lab Al» (регистрационное удостоверение РК-MT7№009046), производитель CarlZeissMeditec. Фотографирование препаратов выполнено цифровой камерой AxioCam ERc5s с помощью программы IMAGE J. Критерии включения: умершие (старше 18 лет) от вирус идентифицированной и не идентифицированной коронавирусной инфекции; вызванной вирусом COVID-19. Критерии исключения: случаи когда COVID-19 являлся сопутствующим, конкурирующим диагнозом; случаи смерти от других видов пневмонии; смерти произошедшие дома; насильственная смерть, беременные и роженицы, дети (от 0 до 18лет). Статистический анализ выполнен с помощью программ SPSS 25 (Stat.Soft., Ins.Компании США). Проверку нулевой гипотезы об отсутствии различий

между наблюдаемым распределением признака и теоретическим ожидаемым нормальным распределением выполняли с использованием W-критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Количественные данные были выражены как среднее (SD) или медиана (IQR), а для качественных данных определены частота и доли (%) и 95% CI. Различия между группами считались достоверными при значение $p \leq 0,05$. Для сравнения двух групп по качественному признаку использован критерий χ^2 – Пирсона. Графические представления результатов проводились с использованием GraphPad PRISM 6 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США).

Результаты и обсуждение

Насколько нам известно, это исследование является первым в Казахстане, где проводилось сравнение гистопатологических характеристик вирус идентифицированных и не идентифицированных случаев коронавирусной болезни. Согласно данным литературы во всех случаях с прижизненным отрицательным ПЦР-тестом на COVID-19, повторный посмертный для уточнения диагноза проводили на мазках из верхних и нижних дыхательных путей, образцах полученных при бронхоскопии и ВАТС, образцах БАЛ, на залитой в парафин легочной ткани для подтверждения наличия вируса [3, 17]. В патологоанатомической практике РК в протоколах, инструкциях, рекомендациях от МЗ РК, не отражено обязательное проведение посмертного ПЦР тестирования при вирус не идентифицированных случаях COVID-19, что затрудняет диагностику, приводит к сомнениям и требует тщательного морфологического анализа. Принимая во внимание вышеуказанные моменты, для проверки нашей гипотезы мы разделили наблюдения на две группы. Iгруппу составили вирус не идентифицированные случаи, IIгруппу-вирус идентифицированные. В представленных случаях ($n=40$) соотношение мужчин и женщин составило 19(47,5%) и 21(52,5%) соответственно, а в сравниваемых группах: в Iгруппе ($n=20$) – М- 9(45%), Ж- 11(55%), во IIгруппе ($n=20$) - М- 10(50%), Ж-10(50%). Мы не выявили высокую частоту смертности у мужчин по сравнению с женщинами в группах сравнения, что отмечалось в предыдущих исследованиях [2].

Согласно данным исследований одной из важных детерминант смертности также является старший возраст [11, 23]. В ПЦР отрицательной группе средний возраст составил 59,30 лет ($59,30 \pm 14,35$), медиана 60 лет; в ПЦР положительной - 61,05 ($61,05 \pm 13,24$), медиана 60,5 лет. Согласно нашим результатам, доля умерших старше 60 лет составила (19/40) 47,5% из общей выборки($n=40$), а в сравниваемых группах: в I группе (9/20) 45%, во II группе (10/20) 50%. Мы не выявили значимые различия в сравниваемых группах по данному значению. ($p=0,695$). Наши результаты не согласуются с опубликованными ранее данными [1,7]. Предыдущие исследования, также показали уязвимость молодых людей с

сопутствующими заболеваниями к COVID-19. Наши результаты согласуются с предыдущими данными, поскольку некоторые случаи смерти в наших сериях произошли у пациентов моложе 40 лет ($4/40=10\%$) [10]. Во многих исследованиях сообщалось, что наличие хронических заболеваний, является критерием неблагоприятного прогноза при ковиде [5]. Самыми частыми сопутствующими заболеваниями в наших сериях случаев являлись: атеросклероз в I группе ($5/20, 20\%$); в II группе ($10/20, 50\%$); артериальная гипертензия ($9/20, 45\%$) и ($1/20, 45,5\%$) соответственно, что совпадает с данными других авторов [1, 10]. Самыми частыми причинами смерти были ТЭЛА в I группе ($6/20, 30\%$); во II группе ($7/20, 35\%$) и сердечная недостаточность в I группе ($7/20, 35\%$); во II группе ($6/20, 30\%$), что также согласуется с данными других исследований [8, 13].

При гистопатологическом анализе в большинстве случаев в обеих сравниваемых группах нами обнаружено ДАП на различных фазах (экссудативной, пролиферативной, фиброзной (фибротической)). ДАП был представлен образованием гиалиновых мембран, гиперплазией пневмоцитов 2 типа, гиперплазией интерстициальных клеток и внутриальвеолярной организацией, как описано в предыдущих исследованиях [4, 20].

Наличие и значение многоядерных гигантских клеток остаются невыясненными. Но известно, что особенностью ДАП при COVID-19 является обнаружение многоядерных симпластов. Многоядерные гигантские клетки и атипичные увеличенные пневмоциты с выраженным ядрышками могут свидетельствовать о вирусном цитопатическом эффекте.

При микроскопическом исследовании обращают на себя внимание, прежде всего, поражения, связанные с непосредственным воздействием коронавируса. Это макрофаги с появлением как вирусных включений в увеличенных ядрах, так и двухъядерных клеток и небольших разрастаний клеток [19]. Так, например, частота встречаемости такого гистологического признака как светлоклеточная трансформация в наших группах сравнения существенно различались: в I группе выявлены 3(15%) и 9 случаев (45%) во II группе ($p=0,038$). См. Диаграмма 1, Рис.1.

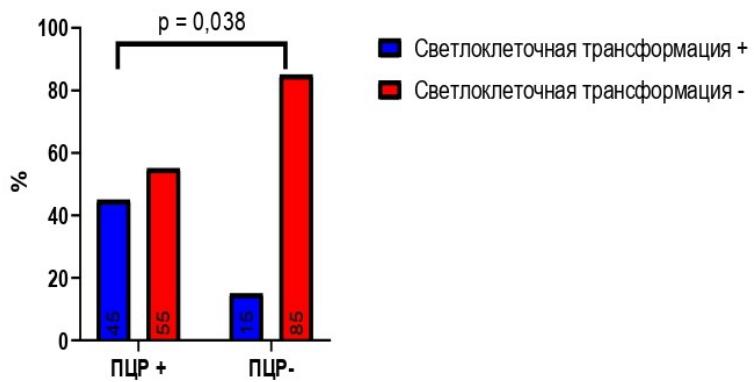


Диаграмма. 1. Частота встречаемости светлоклеточной трансформации в вирус идентифицированных (ПЦР+) и вирус не идентифицированных случаях (ПЦР-). Статистически значимые различия ($p=0,038$) по наличию или отсутствию светлоклеточной трансформации в двух группах.

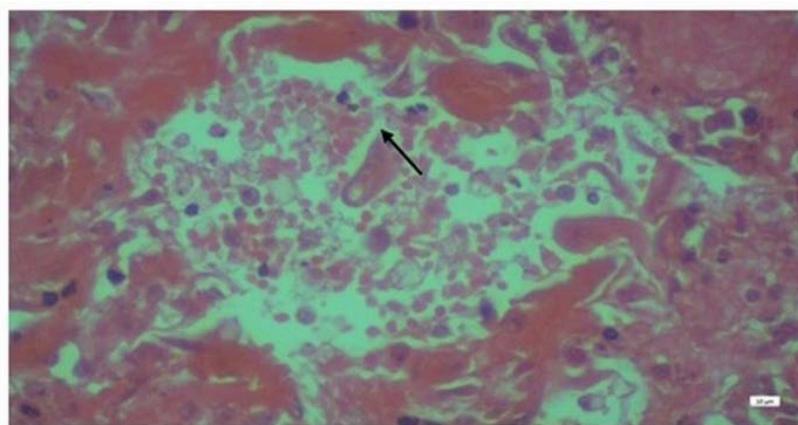


Рис. 1. Светлоклеточная трансформация. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.400.

Атипичные пневмоциты достоверно чаще встречались во II группе, что составило 18 случаев (90%) на 7(35%) в I группе. См. Диаграмма 2, Рис.2. Мы выявили статистически значимые различия ($p=0,001$) по наличию или отсутствию атипичных пневмоцитов. Наличие гиалиновых мембран считается основным признаком ДАП, а другие патологические признаки используются для определения стадии диффузного альвеолярного повреждения [12]. Образование ГМ происходит в острой стадии ДАП [14]. Наличие гиалиновых мембран имело значимые различия в сравниваемых группах. В I группе выявлено наличие ГМ в 5 случаях (25%), тогда как во II группе 11 (55%). Нами выявлены значимые различия по данному гистологическому признаку ($p=0,04$). См. диаграмма 3, Рис.3

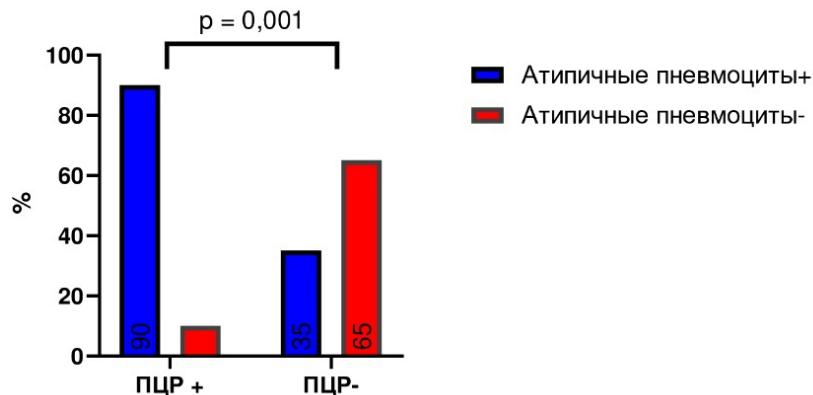


Диаграмма. 2. Частота встречаемости атипичных пневмоцитов в вирус идентифицированных (ПЦР+) и вирус не идентифицированных случаях (ПЦР-). Статистически значимые различия ($p=0,001$) по наличию или отсутствию атипичных пневмоцитов в двух группах.

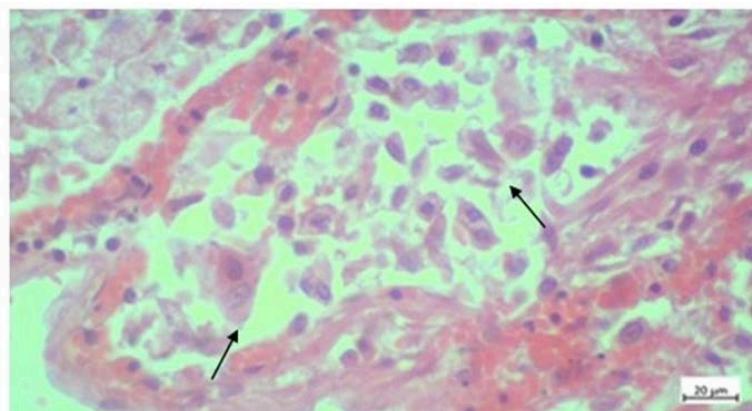


Рис. 2. Атипичные пневмоциты. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.400.

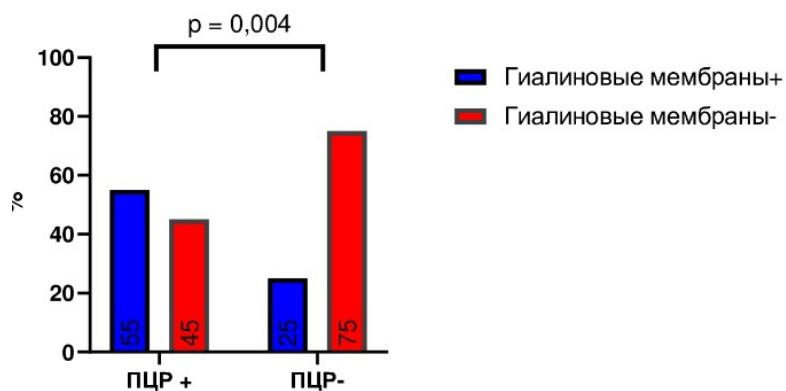


Диаграмма. 3. Частота встречаемости гиалиновых мембран в вирус идентифицированных (ПЦР+) и вирус не идентифицированных случаях (ПЦР-). Статистически значимые различия ($p=0,004$) по наличию или отсутствию гиалиновых мембран в двух группах.

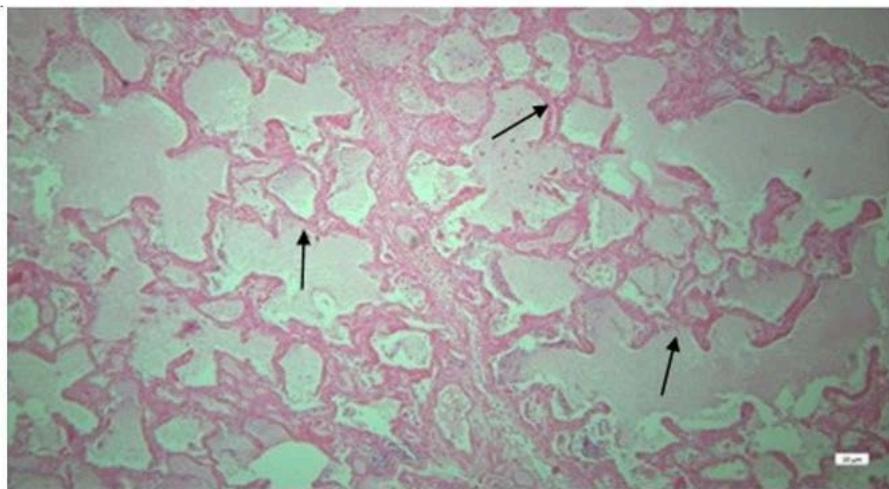


Рис. 3. Гиалиновые мембранны. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.400.

В патогенезе COVID-19, без сомнения, важнейшую роль играют поражения микроциркуляторного русла, в генезе которых вероятнее всего играют важную роль как прямое вирусное повреждение, так и иммуноопосредованные механизмы. Тромбоз в сосудах можно связать с повреждением эндотелия. В нашем исследовании тромбоз встречался I группе в 20 случаях (100%), во II группе 19(95%), что также согласуется с результатами из литературы [15]. Мы не выявили значимых различий по наличию тромбоза в сравниваемых группах. ($p=0,311$). Сравнение частоты встречаемости остальных основных гистопатологических признаков COVID-19 не выявило значимых различий в сравниваемых группах. Данные о частотах встречаемости гистопатологических признаков представлены и обобщены в таблице 1.

Таблица 1**Данные о частотах встречаемости гистопатологических признаков**

Переменные		Основная (n=20) ПЦР+	Контрольная (n=20) ПЦР-	p
Вирусная трансформация эпителиальной выстилки				
Светлоклеточная трансформация	есть	9(45%)	3 (15%)	0,038*
	нет	17(85%)	11(55%)	
Десквамация	есть	20 (100%)	20 (100%)	-
	нет	-	-	
Атипичные пневмоциты	есть	18 (90%)	7 (35%)	0,001*
	нет	2(10%)	13(65%)	
Многоядерные гигантские клетки	есть	10 (50%)	7 (35%)	0,337
	нет	10 (50%)	13(65%)	
Диффузное альвеолярное повреждение				
Гиалиновые мембранны	есть	11(55%)	5(25%)	0,04*
	нет	9(45%)	15(75%)	
Плоскоклеточная метаплазия	есть	3(15%)	4 (20%)	0,677
	нет	17(85%)	16(80%)	
Фиброз, склероз	есть	6(30%)	4 (20%)	0,465
	нет	14(70%)	16 (80%)	
Интерстициальный отек	есть	20(100%)	19 (95%)	0,311
	нет	0(0%)	1(5%)	
Местная клеточная реакция				
Нейтрофильная инфильтрация	есть	16 (80%)	15 (75%)	0,705
	нет	4(20%)	5(25%)	
Лимфогистиоцитарная инфильтрация	есть	20 (100%)	18(90%)	0,147
	нет	0(0%)	2(10%)	
Изменения кровеносных сосудов				
Полнокровие	есть	19 (95%)	19 (95%)	1,0
	нет	1(5%)	1(5%)	
Стаз, тромбоз	есть	19 (95%)	20 (100%)	0,311
	нет	1(5%)	0(0%)	
Васкулит	есть	12 (60%)	9 (45%)	0,342
	нет	8(40%)	11(55%)	
Дополнительные признаки				
Лейкоцитарная инфильтрация (бронхопневмония)	есть	6 (30%)	5 (25%)	0,723
	нет	14(70%)	15(75%)	
Внутриальвеолярный отек	есть	14(70%)	18(90%)	0,114
	нет	6(30%)	2(10%)	

Примечание: значение p рассчитывали с помощью критерия Хи-квадрат;

* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

Заключение и выводы

Наличие разницы гистопатологических картин при случаях смертей с кодами U07.1 и U07.2 по МКБ-10 в основном заболевании была подтверждена только по наличию

статистически значимых различий по критериальным признакам, такими как наличие или отсутствие светлоклеточной трансформации пневмоцитов ($p=0,038$), атипичных пневмоцитов ($p=0,001$) гиалиновых мембран в сравниваемых группах ($p=0,04$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Забозлаев Ф. Г. [и др.]. Патологическая анатомия легких при новой коронавирусной инфекции (covid-19). Исследований pulmonary pathology of the new coronavirus disease (covid-19). The preliminary analysis of post-mortem findings 2020. С. 21–37.
2. Савченко С. В. [и др.]. Клинико-анатомический анализ летальности от COVID-19 при скоропостижной смерти и у умерших в лечебно-профилактических учреждениях 2021.
3. Arslan M.N.[и др.].COVID-19autopsies of Istanbul//Irish Journal of Medical Science.2020.№ 2 (191).
4. Angeles Montero-Fernandez M., Pardo-Garcia R.Histopathology features of the lung in COVID-19 patients // Diagnostic Histopathology. 2021. Т. 27. № 3.
5. Attoh S. [и др.]. COVID-19 autopsy reports from the ga-east municipal and the 37 military hospitals in Accra, Ghana // Ghana Medical Journal. 2020. № 4 (54).
6. Bradley B. T. [и др.]. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series // The Lancet. 2020. № 10247 (396).
7. Caramaschi S. [и др.]. Histopathological findings and clinicopathologic correlation in COVID-19: a systematic review // Modern Pathology. 2021. Т. 34. № 9.
8. Elsoukkary S. S. [и др.]. Autopsy Findings in 32 Patients with COVID-19: A Single-Institution Experience // Pathobiology. 2021. № 1 (88).
9. Gaipov A. [и др.]. SARS-CoV-2 PCR-positive and PCR-negative cases of pneumonia admitted to the hospital during the peak of COVID-19 pandemic: analysis of in-hospital and post-hospital mortality // BMC Infectious Diseases. 2021. № 1 (21).
10. Greuel S. [и др.]. COVID-19: Autopsy findings in six patients between 26 and 46 years of age // International Journal of Infectious Diseases. 2021. (108).
11. Hammoud H. [и др.]. Histopathological Findings in COVID-19 Cases: A Systematic Review // Cureus. 2022.
12. Heinrich F. [и др.]. Germany's first COVID-19 deceased: a 59-year-old man presenting with diffuse alveolar damage due to SARS-CoV-2 infection // Virchows Archiv. 2020. № 3 (477).
13. Himwaze C. M. [и др.]. Post-mortem examination of Hospital Inpatient COVID-19 Deaths in Lusaka, Zambia - A Descriptive Whole-body Autopsy Series // International Journal of Infectious Diseases. 2021. (108).
14. Liu Q. [и др.]. Pathological changes in the lungs and lymphatic organs of 12 COVID-19 autopsy cases // National Science Review. 2020. № 12 (7).
15. Mao Y. [и др.]. Clinical and pathological characteristics of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): a systematic reviews 2020. С. 1–31.
16. Merdji H. [и др.]. Histopathological features in fatal COVID-19 acute respiratory distress syndrome // Medicina Intensiva. 2021. № 5 (45).
17. NHI NGUYEN B., RAMESH N. HISTOPATHOLOGY CONSISTENT WITH COVID-19 INFECTION DESPITE MULTIPLE NEGATIVE COVID-19 PCR TESTS IN A MALE WITH ARDS // Chest. 2021. № 4 (160).

18. Pandey P., Agarwal S., Rajkumar Lung pathology in COVID-19: A systematic review // International Journal of Applied and Basic Medical Research. 2020. № 4 (10).
19. Pannone G. [и др.]. Lung histopathological findings in COVID-19 disease – a systematic review // Infectious Agents and Cancer. 2021. Т. 16. № 1.
20. Sadegh Beigee F. [и др.]. Diffuse alveolar damage and thrombotic microangiopathy are the main histopathological findings in lung tissue biopsy samples of COVID-19 patients // Pathology Research and Practice. 2020. № 10 (216).

Сведения об авторах статьи:

Азбергенов Нурбек Кожахметулы – ассистент, НАО Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова, Казахстан, г. Актобе, e-mail: dr.pathologist@mail.ru.

Көмекбай Жанат Есқарақызы – к.м.н., руководитель кафедры гистологии НАО Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова, Казахстан, г. Актобе.