

К.В. Циганков¹, Л.Р. Шостакович-Корецька², В.М. Павленко¹, І.В. Кужевський¹,
В.О. Логвиненко³

ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЬ ЕНДОТОКСИКОЗУ В РОЗВИТКУ ТЯЖКИХ ФОРМ COVID-19: КЛІНІКО-ПАТОМОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Комунальне некомерційне підприємство «Міська клінічна лікарня № 4» Дніпровської міської ради,
²Державний заклад «Дніпровський державний медичний університет», ³Комунальне некомерційне підприємство «Міська клінічна лікарня № 21 імені професора Є.Г. Попкової» Дніпровської міської ради

Мета роботи – на підставі клініко-морфологічного дослідження особливостей уражень легень і шлунково-кишкового тракту на різних стадіях запального процесу обґрунтувати гіпотезу ендотоксикозу як ключового патогенетичного фактора системної ендотеліальної дисфункції і вторинного ураження легень при COVID-19.

Матеріали і методи. Дослідження базується на клініко-патоморфологічному вивченні 52 випадків смерті від COVID-19, з яких для ретельного гістологічного дослідження був відібраний аутопсійний матеріал від 18 померлих. У частині випадків був задіяний імерсійний метод мікроскопії, виконували імуногістохімічне дослідження.

Результати. Основним проявом альтеративного фактора розвитку дифузного альвеолярного пошкодження (ДАП) був мікротромбоз на фоні лейкоцитарних пасток, що формувались нетозом гіперактивованих поліморфноядерних лейкоцитів. Встановили відсутність ознак попереднього запального процесу і ознак міграції лейкоцитів через стінки капілярів у просвіт альвеол. Одночасно гістологічна картина змін в тонкій кишці відповідала гострому десквамативно-ерозивному запальному процесу вірусно-бактерійної етіології з ознаками активної транслокації ендотоксину. В запальному інфільтраті слизової оболонки тонкої кишки формувались гіперергічні вогнищеві лімфоїдні інфільтрати, як в стадії ранньої ексудації ($p < 0,005$), так і в стадії проліферації ДАП ($p < 0,001$).

Продемонстровано достовірно низький показник імунорегуляторного індексу (IPI) CD4/CD8 у гістологічних зразках запального інфільтрату легень порівняно з IPI у запальному інфільтраті тонкої кишки ($p < 0,001$). Запропоновано модель патогенезу COVID-19, згідно з якою ураження легень може виникати вторинно, за механізмом гепатопульмонального синдрому.

Висновки. Є підстави вважати, що вхідними воротами для збудника при тяжкому перебігу COVID-19, поряд з дихальною системою, є слизова оболонка дистальних відділів тонкої кишки. Виявлені морфологічні прояви тяжкої ендотеліальної дисфункції з пошкодженням ендотелію свідчать більше про ураження ендотоксином за механізмом параалергічної реакції, а не про пряме вірусне ураження.

Ключові слова: COVID-19, ендотеліальна дисфункція, тонка кишка, ендотоксикоз, гепатопульмональний синдром, судинна пневмопатія.

Наприкінці грудня 2019 р. новий вид коронавірусу під назвою SARS-CoV-2, який зумовлює тяжкий гострий респіраторний синдром, був офіційно ідентифікований у м. Ухань (Китай). У березні 2020 р. ВООЗ оголосила пандемію SARS-CoV-2, яка триває, незважаючи на всі безпрецедентні протиепідемічні й профілактичні заходи, що пропонуються регуляторами ВООЗ та реалізуються в країнах згідно з регіональними особливостями епідемічного процесу. SARS-CoV-2 характеризується досить високим репродуктивним числом R_0 , що призвело до спалаху нової гострої респіраторної вірусної інфекції під назвою «коронавірусна хвороба 2019» (COVID-19) у вигляді легких і тяжких форм. Легені виявилися найбільш схильними до серйозних уражень. Враховуючи те, що SARS-CoV-2 поширюється в першу чергу аерозольно-інгаляційним шляхом, зрозуміло, що верхні дихальні шляхи і легені підпадають під прямий вплив SARS-CoV-2. В той же час повідомляється і про позалегенові ознаки гострого захворювання, які свідчать на користь можливості проникнення вірусу через шлунково-кишковий тракт (ШКТ). Розробка відповідних терапевтичних підходів залежить від розуміння молекулярних і клітинних механізмів розвитку коронавірусної інфекції, тобто патофізіологічних особливостей COVID-19, які на тепе-

рішній час залишаються недостатньо з'ясованими. Сучасні дослідження свідчать про те, що респіраторні розлади при COVID-19 мають патофізіологічні особливості, які відрізняються від синдрому дихальної недостатності іншого походження. Приблизно у 15 % хворих хвороба має тяжкий ступінь з розвитком ураження легень, гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), септичного шоку та інших загрозливих життю ускладнень. Тому питання патогенезу COVID-19 і зокрема визначення чинників, які лише у невеликій кількості інфікованих людей спричиняють розвиток тяжких і критичних форм COVID-19, все ще є актуальними і залишаються предметом обговорення.

Сучасні погляди на патогенез COVID-19 базуються на доведеному факті, що SARS-CoV-2 використовує ангіотензинперетворювальний фермент (АПФ2) як рецептор для проникнення у клітини органів, які на своїй поверхні експресують цей рецептор [1]. Експресія рецептора АПФ2 виявлена в епітелії респіраторних шляхів, альвеолоцитах, альвеолярних макрофагах, ендотелії судин, епітелії шлунково-кишкового тракту, сечових шляхів та інших клітинах багатьох органів і тканин, включаючи міокард і деякі відділи центральної нервової системи (ЦНС) [2]. Однак кількість клітин, що експресують АПФ2, суттєво відрізняється в цих органах, і легені не є тим органом, який найбільше експресує АПФ2. Є дані про те, що кількість АПФ2 позитивних клітин в альвеолоцитах і респіраторному епітелії – від 1 до 2 %, в назальному і бронхіальному епітелії – менше 1 %, в той час як в епітелії клубової кишки – 30 % [3]. Значна присутність АПФ2 у кишкового епітелії пояснює можливість інфікування ШКТ і кишкового епітелію SARS-CoV-2, про що є відповідні повідомлення [4].

До речі, є повідомлення [5], що не всі інфіковані клітини експресують канонічний АПФ2 рецептор для SARS-CoV-2, можливі й інші рецептори, які використовує SARS-CoV-2 для входу в клітини, такі як гепарансульфат-протеоглікан (HSPG) і нейропілін-1 (NRP-1), що сприяють розвитку інфекції SARS-CoV-2. Вважається, що NRP-1 посилює АПФ2-опосередковану інфекцію SARS-CoV-2 в респіраторному та нюховому епітелії, сприяючи взаємодії спайкового білка з АПФ2. Також експериментально доведено, що спайк-білок SARS-CoV-2 здатний спричиняти анальгезуючий ефект при взаємодії з NRP-1 [6]. Але тільки взаємодія SARS-CoV-2 з АПФ2 викликає продуктивну інфекцію з реплікацією вірусу.

Морфологічними дослідженнями доведено, що рецептор лектину С-типу L-SIGN взаємодіє Ca^{2+} -залежним чином з N-гліканами високоманозного типу на спайковому білку SARS-CoV-2. Було знайдено, що L-SIGN експресується в значній кількості у синусоїдальних ен-

дотеліальних клітинах печінки людини і ендотеліальних клітинах лімфатичних вузлів, але не на ендотеліальних клітинах кровеносних судин. Взаємодія L-SIGN з SARS-CoV-2 робить значний внесок у розвиток COVID-19-асоційованої коагулопатії, яка є важливим компонентом тяжкого ступеня хвороби з розвитком вторинних уражень органів і систем, в тому числі й легень. В експерименті блокування L-SIGN приводило до скасування взаємодії із SARS-CoV-2. При цьому підтверджена відсутність ознак реплікації вірусу в печінці, з висновком, що синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки є мішенню для SARS-CoV-2 з непродуктивною інфекцією.

Завдяки тому, що тяжкий перебіг COVID-19 маніфестується ГРДС, більшість досліджень орієнтована на гіпотезу первинного ураження легень, так як вважається, що основною мішенню для SARS-CoV-2 є респіраторний тракт.

Але доведений факт наявності вірусу в альвеолярному епітелії і макрофагах [7] не означає, що респіраторні органи є єдиними вхідними воротами для збудника. Є підстави вважати, що легені при COVID-19 можуть уражатися вторинно під впливом інших механізмів. На чому може ґрунтуватися така гіпотеза? Підтвердженням можуть бути клінічні особливості розвитку тяжких і критичних форм COVID-19, а також морфологічні та імуногістохімічні дослідження аутопсійного матеріалу. Згідно з даними літератури, у більшості тяжкохворих і померлих пацієнтів не відзначалося тяжких клінічних симптомів на ранній стадії захворювання. Стан цих пацієнтів раптово погіршувався на пізніх стадіях недуги або в процесі одужання, що є свідченням того, що не тільки респіраторні органи є вхідними воротами [8]. Ознаки ураження легень з'являються в середньому на 9-11-у добу від початку захворювання, після епізоду підйому температури з тяжкою інтоксикацією, що може бути обумовлено вірусемією. Або вірусемією з мікст-інфекцією, ймовірно, бактерійного типу. У докладному патоморфологічному звіті, при дослідженні вірусного ізоляту SARS-CoV-2 з легень померлого, інкубованого з моношарами клітинної культури VeroE6, вірус продемонстрував активну реплікацію, що викликала загибель та лізис >95 % клітин-мішеней через 72 год. Показано, що найчастіше вірусна РНК локалізувалась у пневмоцитах і макрофагах, але її не було в епітелії бронхів і бокалоподібних клітинах. Відзначено, що тільки невелика частина пневмоцитів показала реплікацію вірусу, але більшість пневмоцитів продемонструвала значні цитопатичні ефекти у вигляді набряку цитоплазми, везикулярної дегенерації і ядерної атипії, що еквівалентно тяжким дистрофічним змінам. Обговорюється питання про здатність макрофагів, фагоцитуючих уламки клітин, що містять вірус, сприяти його поширенню [9].

На теперешній час визнано, що такі супутні захворювання, як ожиріння, цукровий діабет 2-го типу (ЦД), серцево-судинні захворювання, похилий вік, етнічна приналежність підвищують ризик несприятливого перебігу COVID-19 і смерті, але вони не є специфічними, відзначаються при грипі, MERS та інших інфекційних захворюваннях, і не повною мірою розкривають механізми цих кореляцій. Припускається, що всі ці супутні захворювання пов'язані між собою вірусно-бактерійними взаємодіями, ініційованими транслокацією бактерійних продуктів, таких як ліпополісахарид (ЛПС), з кишечника і кровоплин і розвитком ендотоксикозу [10].

Роль ендотоксикозу як вагомого патогенетичного компоненту при розвитку тяжких форм COVID-19 з численними проявами не тільки з боку легень, але й інших органів, має все більше наукових доказів. Дослідженнями виявлено підвищені рівні ЛПС і ЛПС-зв'язуючого білка в плазмі у хворих на ожиріння і цукровий діабет (ЦД), а також участь дисбіозу кишечника в патогенезі інсулінорезистентності. Помірний запальний процес, індукований транслокацією бактерійних продуктів, викликає васкулопатію, а рівень ЛПС модифікує кардіо-васкулярні порушення. При цьому рівні ЛПС [11] виявилися значно вищими в осіб похилого віку і розрізняються в різних етнічних групах, є найвищими у вихідців з Південної Азії, вони статистично нижчі у жінок, ніж у чоловіків [12]. Джерелом розвитку тяжких проявів і ускладнень у хворих на COVID-19 може бути порушення балансу кишкової мікрофлори в результаті пошкодження вірусом ентероцитів на фоні відомих коморбідних станів, таких, як ЦД 2-го типу, ожиріння, серцево-судинні захворювання, похилий вік [13]. Зараз представлено декілька клінічних звітів, які демонструють значне підвищення рівня ендотоксину у плазмі тяжко уражених хворих на COVID-19 [14]. Наявний та індукований ендотоксикоз є вирішальним фактором, який сприяє серйозним наслідкам COVID-19.

У наших попередніх патоморфологічних дослідженнях [15] аутопсійного матеріалу померлих пацієнтів з COVID-19 були виявлені суттєві ураження ШКТ, зокрема, дистального відділу тонкої кишки в поєднанні із захворюваннями, які сприяють виникненню портопупльмональної гіпертензії. Зроблено припущення, що ці порушення причетні до розвитку тяжких і критичних форм COVID-19, а пошкодження легень можуть розвиватися за допомогою механізму пневмопатії при гепатопупльмональному синдромі.

Є сучасні переконливі дані про те, що ендотеліальні клітини судин не експресують рецептор АПФ2 і стійкі до інфікування SARS-CoV-2, що у свою чергу вказує на непрямі механізми пошкодження ендотелію і васкулопатії при COVID-19 [16]. Можна припустити, що непрямий

механізм ендотеліального ушкодження запускається SARS-CoV-2-інфекцією інших АПФ2⁺ неендотеліальних клітин, таких як епітеліальні клітини кишечника з подальшим розвитком відповідних патофізіологічних процесів. Таким чином видається актуальним подальше уточнення ролі ШКТ як вхідних воріт для SARS-CoV-2 і джерела розвитку ендотоксикозу, мікроангіопатій та ендотеліальної дисфункції.

Мета роботи – на підставі клініко-морфологічного дослідження особливостей уражень легень і шлунково-кишкового тракту на різних стадіях запального процесу обґрунтувати гіпотезу ендотоксикозу як ключового патогенетичного фактора системної ендотеліальної дисфункції і вторинного ураження легень при COVID-19.

Матеріали і методи

Представлене дослідження є обсерваційним і базується на клініко-патоморфологічному вивченні випадків смерті від COVID-19, верифікованим методом полімеразної ланцюгової реакції. Аутопсійний матеріал для дослідження був отриманий з патологоанатомічного відділення КНП «Міської клінічної лікарні № 21 ім. проф. О.Г. Попкової» ДМР. Гістологічні та імуногістохімічні дослідження здійснювали в патологоанатомічному відділенні КНП «Міської клінічної лікарні № 4» ДМР.

Вивчення змін слизової оболонки ШКТ ускладнене на розтинах посмертним аутолізом [2], що унеможлиблює повноцінне гістологічне, а тим більше, імуногістохімічне дослідження. Тому для вивчення були вибрані випадки смерті від COVID-19 у зимовий період з грудня 2020 р. до лютого 2021 р. Перевагу надавали випадкам, коли тіла доставляли на розтин через 2-12 год після смерті. Таким чином була сформована група з 52 секційних спостережень. В усіх випадках виявляли ерозивні та ерозивно-некротичні пошкодження слизової оболонки тонкої кишки, особливо в дистальних її відділах. Після вивчення гістологічних препаратів було відібрано 18 випадків, в яких аутолітичні зміни слизової оболонки були мінімальними або їх практично не було.

Серед 18 померлих було 10 чоловіків і 8 жінок. Медіана віку в померлих становила 69 років, середній день захворювання при ушпиталенні був (9±5) діб, середній термін перебування у стаціонарі складав (16±6) діб. Показанням для ушпиталення був тяжкий ступінь недуги і наявність двобічної полісегментарної пневмонії з візуалізацією специфічного уражень легень (матове скло) на комп'ютерній томографії (КТ) органів грудної порожнини. Серед коморбідних захворювань відзнаали такі, як надлишок ваги з ІМТ >25 (7), гіпертонічна хвороба, ішемічна хвороба серця (12), атеросклероз (14), ЦД другого типу (5), жирова хвороба печінки (7). Більшість була ушпиталена зі значними порушеннями дихання й ознаками гіпоксії, з рівнем SpO₂ <90 % –

(81±12) %. У 2 померлих були ускладнення у вигляді артеріального тромбозу кінцівок з хірургічним втручанням. Ускладнений перебіг коронавірусної хвороби супроводжувався розвитком ГРДС у 5 померлих, септичного шоку у 3, а також поліорганичних порушень у всіх хворих, що підтверджувалось негативною динамікою запальних маркерів, біохімічних показників ниркової і печінкової функції, а також змінами у коагулограмі. В лікуванні хворих застосовували: дексаметазон, антикоагулянтну, антибактерійну, протигрибкову терапію, внутрішньовенний імуноглобулін, тоцилізумаб, неінвазивну та інвазивну ШВЛ, кисневу, симптоматичну терапію.

Разом з тим, у роботі ми зробили акцент на морфологічних змінах, виявлених у померлих на 1-4-ту добу після початку легеневої фази захворювання. У таких випадках альтеративні чинники і зміни морфологічно можуть бути ще не замасковані клітинами запального інфільтрату, а продуктивно-репаративні явища ще не було, або вони були мінімальними.

Для аналізу аутопсійного матеріалу були використані зразки тканини легень, тонкої кишки з ділянками її брижі, які відбирали в 20-30 см від ілеоцекального кута, ділянки стінок великих вен портальної системи, а також ділянки непарної вени, яка є порто-кавальним анастомозом, разом з прилеглою клітковиною середостіння. Для морфологічних досліджень застосовували 10 % розчин нейтрального формаліну, який забезпечує порівняно добру фіксацію шматочків тканин і окремих клітин. Основні етапи гістологічної обробки: фіксація біоптатів (час фіксації тканин – не менше 72 год); дегідратація (зневоднення об'єктів в абсолютизованому ізопропанолі) і заливка в парапласт; приготування зрізів товщиною 4-5 мкм; забарвлення препаратів гематоксилін-еозином.

Вивчали і фотографували гістологічні препарати під мікроскопом Zeiss «Primo Star», фотокамерою DCM 500. У частині випадків був задіяний імерсійний метод мікроскопії, виконували імуногістохімічне (ІГХ) дослідження. Для встановлення особливостей запального інфільтрату використовували моноклональні мишачі антитіла до CD3, clone SP7; CD4, clone 4B12; CD8, clone SP16; CD20, clone L26; CD23, clone SP23; CD45, clone PD7/26/16+2B11; CD56, clone 56C04; CD68, clone KP1; CD138, clone MI15 (Thermo Scientific, США); CD14, clone EP128 (Vitro, Іспанія) в рекомендованих виробником розведеннях. Для вивчення морфологічних проявів ендотеліальної дисфункції як первинні антитіла використовували CD31, clone JC/70A; CD34, clone QVEnd/10; CD45 (Thermo Scientific, США). Для імуногістохімічного дослідження зрізи товщиною 4 мкм наносили на адгезивні предметні скла Super Frost Plus. Після стандартної депарафінізації і дегідратації здійснювали демаскування антигенних детермінант у цитратному буфері з pH=6,0 в Thermo Scientific PT модулі при температурі 100 °C про-

тягом 20 хв. Надалі зрізи інкубували у вологих камерах з первинними антитілами впродовж 45 хв. Для виявлення реакції використовували полімерну систему візуалізації Quanto (Thermo Scientific, США) з хромогеном 3-діамінобензидин тетрахлорид (DAB) (Thermo Scientific, США). Зрізи також дофарбовували гематоксиліном. В запальних інфільтратах встановлювали процентне співвідношення CD20⁺ В-лімфоцитів і CD3⁺ Т-лімфоцитів. Середню кількість CD4⁺-Т-лімфоцитів, CD8⁺-Т-лімфоцитів визначали після підрахунку в 10 полях зору, при збільшенні ×400 та встановлювали імунорегуляторний індекс (IPI) як співвідношення CD4/CD8 (референтне значення: М – 2,0, коливання 1,5-2,6). Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного продукту Statistica v. 6.1® (StatSoft, США, серійний номер AGAR909E415822FA). Відповідно до обсерваційного характеру дослідження, в роботі застосовували переважно методи описової статистики з розрахунком середніх значень, медіани, стандартного відхилення та помилки. Також для оцінки змін IPI у тонкій кишці та легенях аналізували середні показники співвідношення CD4/CD8 із застосуванням Т-критерію з визначенням довірчих інтервалів (95 % CI).

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження легень представляло особливий інтерес у зв'язку з тим, що клінічна картина при прогресуванні захворювання супроводжувалась ознаками стійкої дихальної недостатності та візуалізацією поширеного процесу у легенях при КТ або рентгенографії. У 6 померлих з 18 (33 %) була гістологічна картина стадії ексудації ДАП, з них у 2 випадках зміни в легенях відповідали раннім проявам ДАП. Найбільшу частку склали померлі з ознаками ДАП в стадії проліферації – 11 випадків з 18 (61 %).

Гістологічне дослідження тканини легень померлих з ранніми проявами ДАП показало, що основним проявом дії альтеративного фактора розвитку ДАП був мікротромбоз капілярів міжальвеолярних перетинок (МАП) на фоні лейкоцитарних пасток, що формувались нетозом гіперактивованих поліморфноядерних лейкоцитів (ПЯЛ) (фото 1а). При цьому не відзначали ознак міграції лейкоцитів через стінки капілярів у просвіт альвеол. У просвіті деяких артерій дрібного і середнього калібру виявляли тромби з фібрину і коагульованої плазми, у складі яких перебували злуцений ендотелій, дистрофізовані клітини з пікнотичними ядрами, апоптотичні тільця, зерна гемосидерину (фото 1б) за відсутності ознак попередніх інфільтративних процесів у стінках судин і тканині легень. Десквамація альвеолярного епітелію була мінімальною, клітин альвеолярного епітелію з характерними для вірусного ураження цитопатичними змінами виявлено не було.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

При ІГХ дослідженні, у просвіті капілярів МАП знаходили CD45⁺ лейкоцити, які були представлені переважно ПЯЛ і моноцитами. Серед них виявляли клітини, що експресували рецептор ліпополісахариду CD14 (фото 1в). Серед лейкоцитів CD3⁺, CD4⁺-Т-лімфоцитів не було. CD8⁺-Т-лімфоцити і CD20⁺-В-лімфоцити були поодинокими і виявлялися тільки в деяких полях зору, що унеможливило їх підрахунок. CD68⁺-клітини були

переважно альвеолярними макрофагами, що були розташовані на поверхні або у просвіті альвеол поодинокі, а на ділянках дистелектазів формували невеликі скупчення у просвіті альвеол. Таким чином, гістологічна картина свідчила про неспецифічність механізмів розвитку ДАП, за винятком тромбозу судин дрібного і середнього калібру.

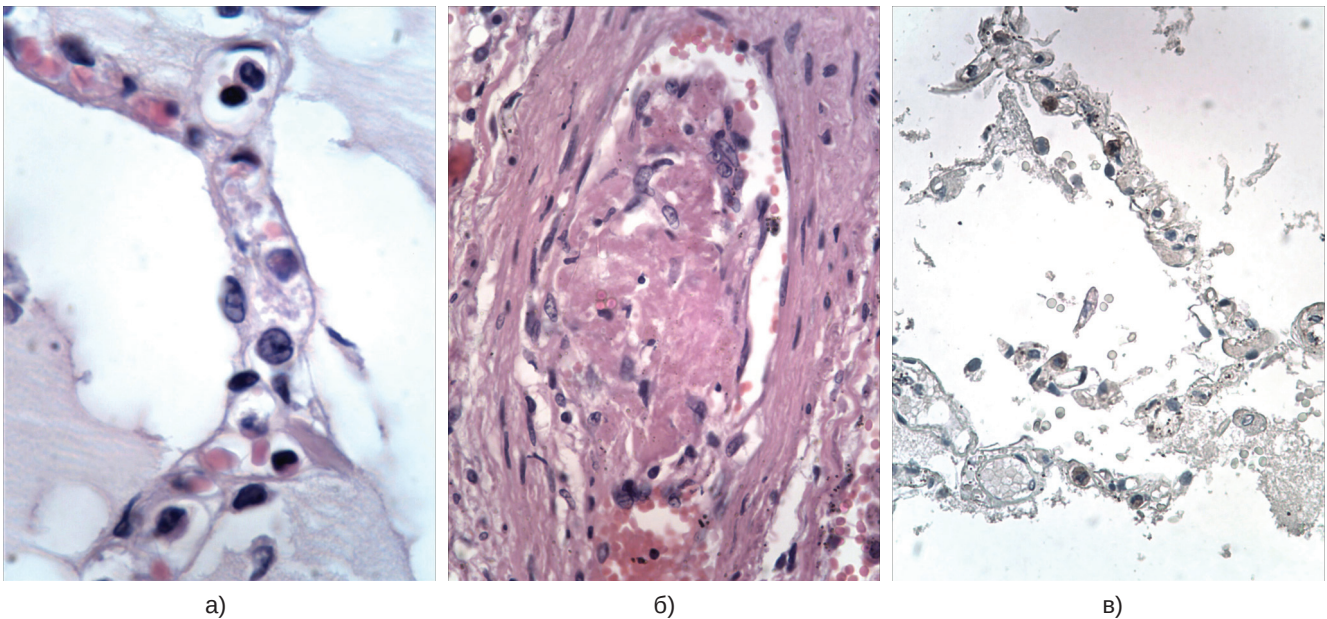


Фото 1. ДАП, ранні прояви: а) формування тромбу на фоні лейкоцитарних пасток у просвіті капіляра ($\times 1000$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) тромб у дрібній гілці легеневої артерії, складається з фібрину, злущеного ендотелію, клітинних уламків ($\times 400$, забарвлення гематоксилін і еозин); в) CD14⁺-клітини в просвіті капілярів міжальвеолярних перетинок ($\times 400$, ІГХ реакція з CD14).

У той же час, гістологічна картина змін в тонкій кишці відповідала вірусному ентериту. Слизова оболонка була малокровною, спостерігалась десквамація епітелію, оголені ворсини були скорочені, потовщені, з дифузно-вогнищевою інфільтрацією стромі лімфоцитами, макрофагами, ПЯЛ з наявністю еозинофілів і домішкою поодиноких плазматичних клітин, підслизовий шар був набряклим (фото 2а, б). Значна частина запального інфільтрату була представлена CD68⁺-макрофагами, які накопичувались у стромі біля поверхні оголених ворсинок слизової оболонки (фото 2в). Клітини, що експресували рецептор ЛПС CD14, накопичувались у стромі ворсин нижче скупчень CD68⁺-клітин, на межі верхньої і середньої третини ворсин (фото 2г). Частка CD20⁺-В-лімфоцитів складала (23,2 \pm 5,4)%, CD3⁺-Т-лімфоцити становили (76,8 \pm 11,0) % лімфоїдного інфільтрату. В щільних фолікулоподібних вогнищевих інфільтратах CD23⁺ фолікулярних дендритичних клітин не було ви-

явлено. Середня кількість CD4⁺-Т-лімфоцитів становила (84,0 \pm 17,6) в п/з, CD8⁺-Т-лімфоцитів – (27,3 \pm 8,3) в п/з. IPI=(3,2 \pm 0,5). У дифузному інфільтраті стромі слизової оболонки середня кількість CD4⁺-Т-лімфоцитів становила (21,8 \pm 1,1) в п/з, CD8⁺-Т-лімфоцитів – (13,7 \pm 1,1) в п/з. IPI=(1,6 \pm 0,34) (фото 2д). Спостерігалась невелика кількість CD56⁺ NK клітин та поодинокі плазматичні CD138⁺-клітини з нерівномірною мембрано-цитоплазматичною реакцією.

При збільшенні $\times 1000$ у ворсинках слизової оболонки тонкої кишки відзначено спустошення капілярів. У просвіті капілярів можна було побачити клітинні уламки і детрит, виявляли десмолітичні зміни стромі на фоні інфільтрації ПЯЛ, переважно з ознаками гіперактивації і клітинної загибелі у вигляді нетозу. Спостерігались групи еозинофілів з набухлою широкою цитоплазмою, а також виявляли фрагменти їх цитоплазми. Велика частина інфільтрату була представлена фагоцитуючими

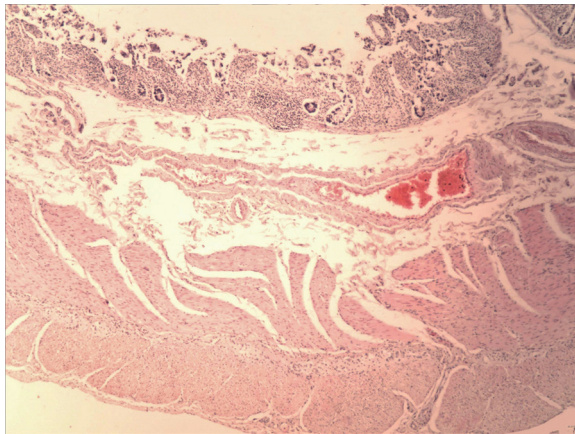
макрофагами, у цитоплазмі яких можна було виявити фрагменти клітин (аутоцитофагія), вакуолі, що надавали цитоплазмі пінистого вигляду (фото 3а, б).

Такі зміни у слизовій оболонці тонкої кишки, на нашу думку, можуть бути спровоковані комбінованою дією SARS-CoV-2 та ендотоксину кишкового походження, що призводить до гіперактивації макрофагів і ПЯЛ [17].

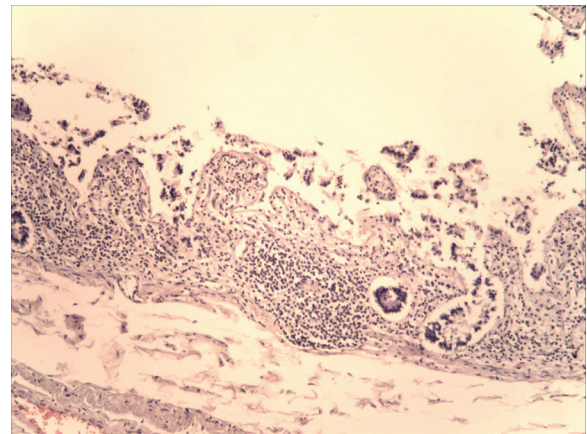
Відсутність лімфоїдного інфільтрату й ознак вірусного цитопатичного ефекту в тканині легень при ранніх проявах ДАП схиляють до думки про невірусну причину

розвитку ДАП. Пошкоджуючим фактором може бути ендотоксинова агресія, що зазвичай діагностується як ендотоксичний, або септичний шок «неясного генезу».

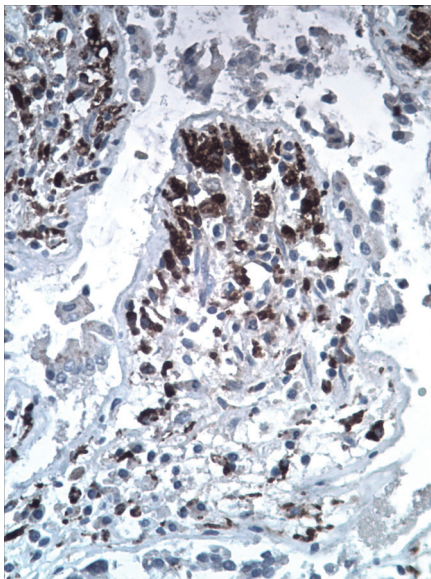
Вірусний цитопатичний ефект в альвеолярному епітелії надійно спостерігався у померлих пацієнтів з ДАП в стадії пізньої ексудації (5-10-та доба), в яких картина ураження легень була морфологічно схожа з картиною «шокових легень» при ГРДС. Відзначали інтраальвеолярний набряк із домішком в набряковій рідині еритроцитів, лімфоцитів і макрофагів, відшарова-



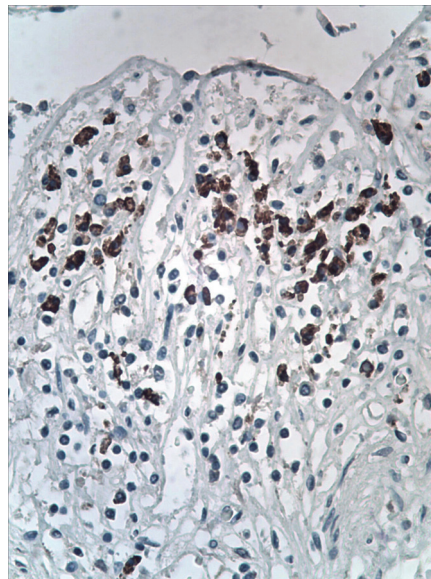
а)



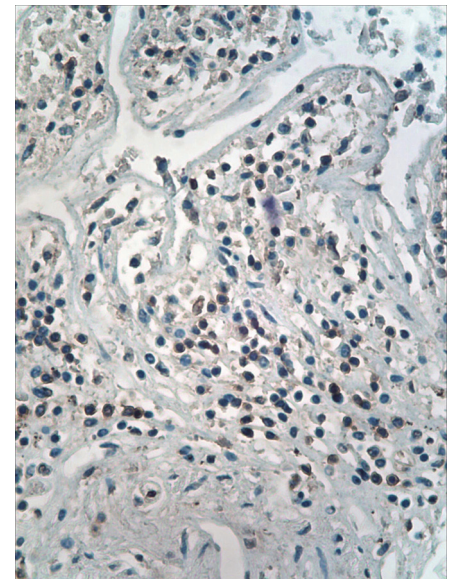
б)



в)



г)



д)

Фото 2. Тонка кишка: а) десквамація епітелію, ворсини скорочені, потовщені, дифузно-вогнищева лімфоїдно-макрофагальна інфільтрація. Набряк підслизового шару ($\times 40$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) те саме. Малокров'я слизової оболонки. Вогнищевий фолікулоподібний лімфоїдний інфільтрат ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); в) накопичення макрофагів у стромі біля поверхні оголених ворсин слизової оболонки ($\times 400$, ІГХ реакція з CD68); г) CD14+-клітини у стромі ворсинок слизової оболонки ($\times 400$, ІГХ реакція з CD14); д) CD4+-лімфоцити у стромі оголених ворсинок слизової оболонки ($\times 400$, ІГХ реакція з CD4).

ного альвеолярного епітелію. По внутрішній поверхні альвеол спостерігали гіалінові мембрани різної товщини й поширеності. В капілярах МАП, а також дрібних судинах відзначали фібринові та гіалінові тромби. Виявляли великі, неправильної форми альвеолоцити з великими

ядрами, грубозернистим хроматином і чіткими ядерцями, що місцями формували симпласти. У деяких судинах середнього калібру спостерігали наявність тромбів (тромбоемболів?). Ознаки фібропластичних реакцій були слабкими.

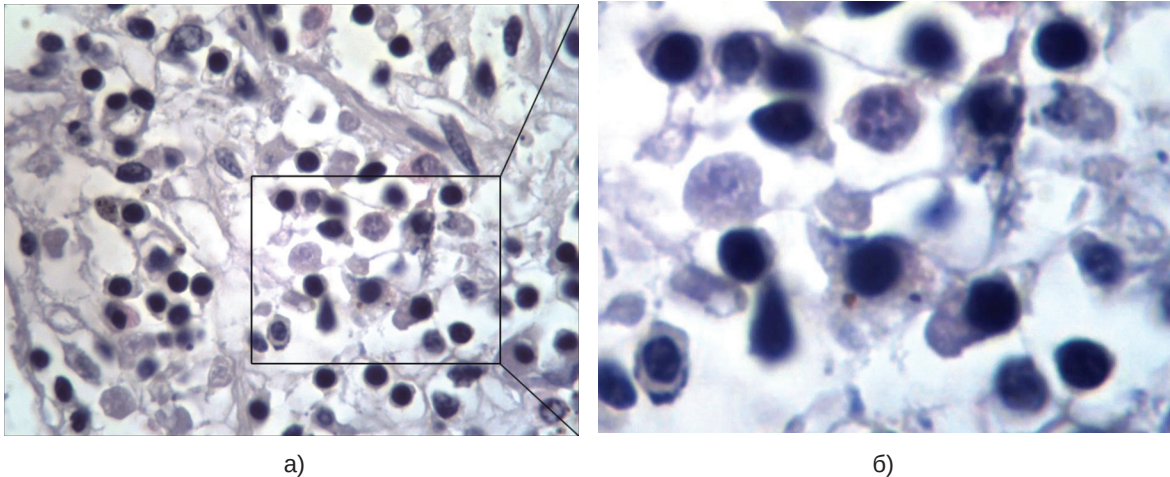


Фото 3. Ворсина тонкої кишки: а) фагоцитуючі макрофаги, аутоцитотофагія ($\times 1000$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) деталь фото – фагоцитуючий пінистий макрофаг, ПЯЛ, лейкоцитарні пастки.

Вивчення стану тонкої кишки померлих зі змінами в легенях, що відповідали стадії пізньої ексудації, показало наявність ознак ентериту з десквамативно-ерозивними пошкодженнями слизової оболонки.

В стадії проліферації (11-20-та доба) відзначали невідповідність стадій ДАП тривалості захворювання. Спостерігали постійне поєднання персистуючих ознак ексудативної стадії у вигляді фокусів внутрішньоальвеолярного набряку і гіалінових мембран, що з'являються знову (фото 4а), з гіперпластичними, реактивними і дисрегенераторними змінами, початковими ознаками розвитку фіброзу (фото 4б).

Запальний інфільтрат у ушкоджених ділянках легень складався переважно з $CD68^+$ альвеолярних макрофагів, що були дифузно розташовані серед дегенеруючих елементів тканини легені й домішкою $CD14^+$ -клітин. Макрофаги часто були гіпертрофовані, багатоядерні, заповнювали пошкоджені альвеоли або формували гранулоподібні скупчення (фото 4в, г).

Лімфоїдний компонент інфільтрату був дуже скупим. Лімфоцити на ділянках консолідованої тканини легені були поодинокими або формували невеликі, переважно периваскулярні скупчення. Частка $CD20^+$ -В-лімфоцитів становила $(20,6 \pm 5,9) \%$, $CD3^+$ -Т-лімфоцитів – $(79,4 \pm 20,0) \%$. Лімфоцити, що розташовувались у просвітах судин, не враховувались. Т-лімфоцити були представлені переважно $CD8^+$ -лімфоцитами – $(7,1 \pm 2,0)$

в п/з. $CD4^+$ -лімфоцити були поодинокими або відсутні – $(1,71 \pm 0,4)$ в п/з, $IPI = (0,43 \pm 0,1)$. $CD56^+$ NK клітин і $CD138^+$ плазматичних клітин не було. Така ІГХ картина може свідчити про імунний дисбаланс, зокрема, про виснаженість Т-лімфоцитів (фото 4д, е).

Морфогенез змін у легенях при COVID-19 в проліферативну і фібротичну стадію потребує подальшого з'ясування, але в рамках цієї роботи ми звертаємо увагу на такі морфологічні патерни як: персистування ексудації, бідність складу клітинного запального інфільтрату, ознаки імунного дисбалансу.

В 9 випадках при ДАП у стадії проліферації (11-20-та доба), в слизовій оболонці тонкої кишки спостерігали ерозивно-некротичні пошкодження, частина яких була покрита щільними фібринозно-некротичними масами. Також визначали ділянки і циркулярні ураження, де на фоні полів глибоких ерозивно-некротичних дефектів формувались щільні лімфоїдні інфільтрати у стромі слизової оболонки і розповсюджувались на підслизовий шар з чітким огрубінням строми (фото 5а, б). Фолікулярних дендритних клітин, що експресують $CD23$, серед інфільтрату не було. Переважали $CD20^+$ -В-лімфоцити – $(80,0 \pm 6,4) \%$, $CD3^+$ -Т-лімфоцити становили $(20,0 \pm 5,8) \%$, $CD4^+$ переважали над $CD8^+$ -Т-лімфоцитами (фото 5в, г, д). У щільних інфільтратах середня кількість $CD4^+$ -Т-лімфоцитів становила $(119,6 \pm 6,7)$ в п/з, $CD8^+$ -Т-лімфоцитів – $(35,8 \pm 4,5)$ в п/з. $IPI = (3,3 \pm 0,1)$.

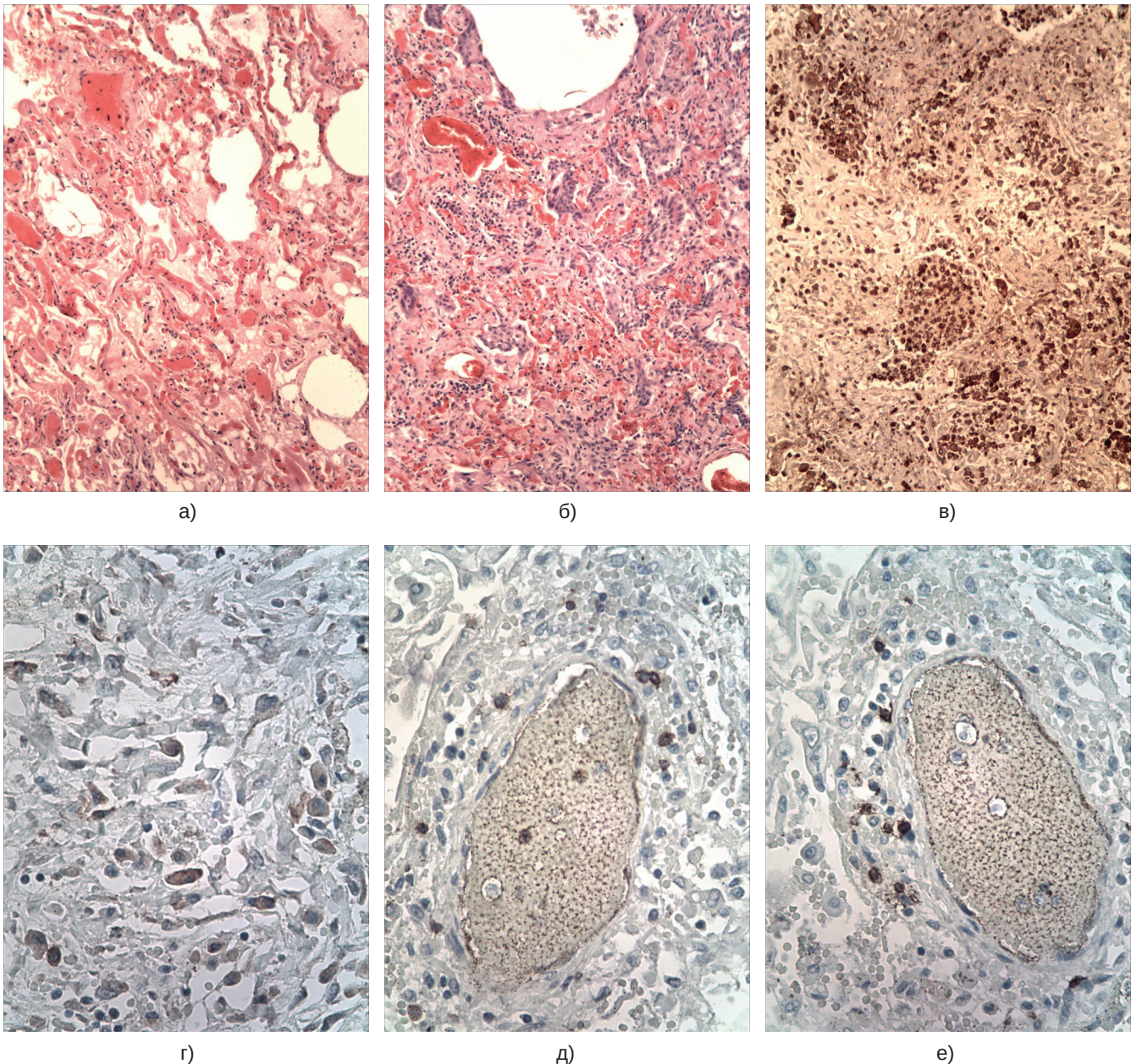
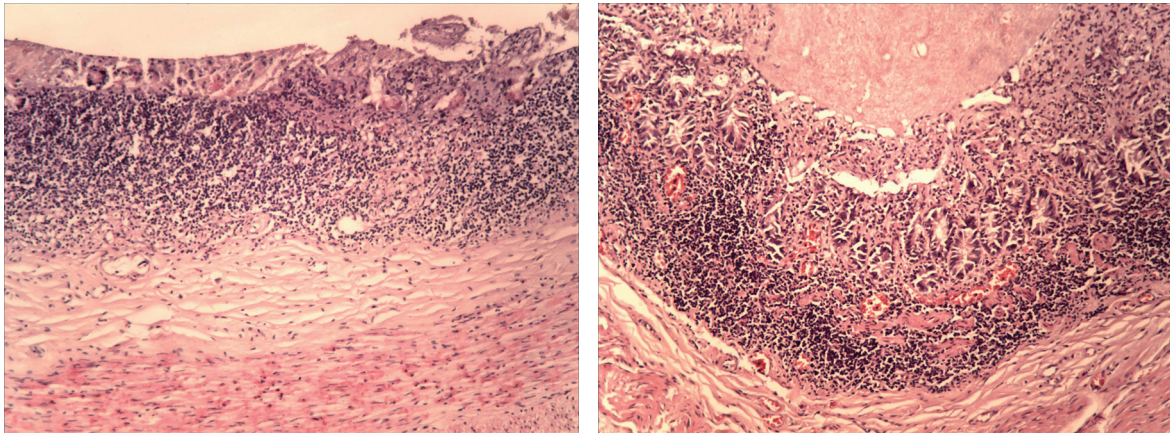


Фото 4. Легені. ДАП. Стадія проліферації: а) персистування ексудативної стадії ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) фіброз, велика кількість капілярів, вогнища плоскоклітинної метаплазії бронхіолярного епітелію ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); в) CD68⁺-макрофаги, що формують гранулоподібні скупчення ($\times 100$, ІГХ реакція з CD68); г) CD14⁺-клітини у складі інфільтрату ($\times 400$, ІГХ реакція з CD14); д) периваскулярне скупчення CD8⁺-лімфоцитів ($\times 400$, ІГХ реакція з CD8); е) тає саме. Периваскулярне скупчення CD20⁺-лімфоцитів ($\times 400$, ІГХ реакція з CD20).

Лімфоїдна інфільтрація стромі слизової оболонки на інших ділянках була дифузною, нерівномірною, подекуди скупю. Кількість CD4⁺-Т-лімфоцитів становила ($15,8 \pm 4,9$) в п/з, CD8⁺-Т-лімфоцитів – ($12,5 \pm 4,7$) в п/з. ІРІ=($1,20 \pm 0,04$). Спостерігали невелику кількість CD56⁺-клітин з нерівномірною мембрано-цитоплазматичною

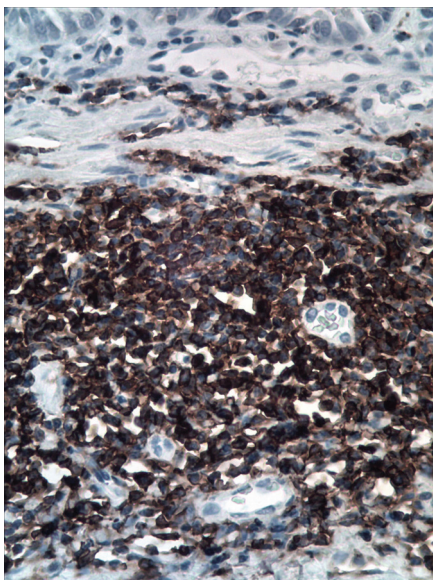
реакцією. Клітин, що експресують CD138, не визначали.

У стромі оголених ворсинок слизової оболонки і під ерозивно-некротичними дефектами виявляли скупчення CD68⁺-макрофагів та CD14⁺-клітин. У 2 випадках спостерігали підгостре пошкодження, де відзначали поля потовщених, оголених ворсин з фібропластною

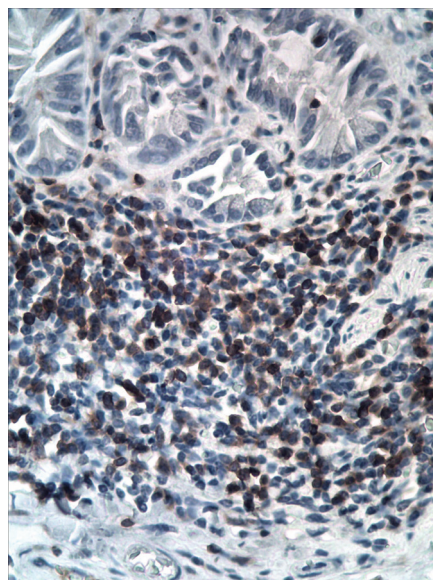


а)

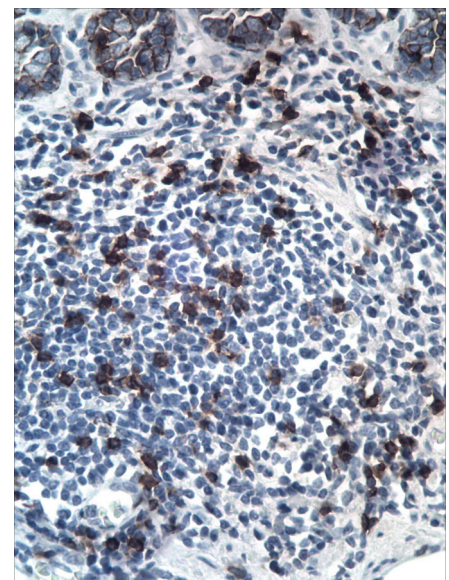
б)



в)



г)



д)

Фото 5. Тонка кишка: а) глибокий ерозивно-некротичний дефект, покритий фібринозно-некротичними масами, підслизовий шар з чітким огрубінням строми, щільна лімфоїдна інфільтрація у стромі слизової оболонки ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) те саме. Ділянки грануляційної тканини, щільна лімфоїдна інфільтрація у стромі слизової оболонки ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); в) переважання CD20⁺-лімфоцитів у запальному інфільтраті ($\times 400$, ІГХ реакція з CD20); г) CD4⁺-лімфоцити в запальному інфільтраті ($\times 400$, ІГХ реакція з CD4); д) CD8⁺-лімфоцити в запальному інфільтраті ($\times 400$, ІГХ реакція з CD8).

реакцією строми, деякі ворсини були спаяні одна з одною, мали вигляд поліпоподібних виростів з частковою епітелізацією поверхні.

Аналіз змін ІРІ (табл. 1) показав досить специфічні зміни.

Таблиця 1 демонструє достовірно низький ІРІ у гістологічних зразках запального інфільтрату легень порівняно з ІРІ у запальному інфільтраті тонкої кишки, в якій спостерігали гіперергічні вогнищеві лімфоїдні ін-

фільтрати як в стадії ранньої ексудації, так і в стадії проліферації ДАП. У дифузному інфільтраті відзначали нормергічні показники ІРІ в стадії ранньої ексудації, які дещо знижувались у стадії проліферації.

Основним патоморфологічним патерном змін у тонкій кишці є гострий десквамативно-ерозивний запальний процес вірусно-бактерійної етіології на фоні ознак виснаження CD138⁺-плазмочитів і присутності маркера ендотоксину – CD14. Надалі ураження стають

Таблиця 1

Порівняння показників імунорегуляторного індексу CD4/CD8 у гістологічних зразках тонкої кишки і легень у різні стадії ДАП

Критерій		Тонка кишка		Легені
1. Загальне середнє значення (M±m)		2. Ранні прояви ДАП (M±m)		4. ДАП у стадії проліферації* (M±m)
CD4/CD8	2,3±0,2	2,1±0,2		0,4±0,1
Інфільтрат		Щільний	Дифузний	Щільний
CD4/CD8		3,2±0,5	1,6±0,3	3,3±0,1
Порівняння показників		95 % CI: 0,9-1,5 P _{щ-д} <0,005		95 % CI: 1,1-2,6 P ₃₋₄ <0,001 95 % CI: 0,9-1,5 P ₁₋₄ <0,001

Примітка. * – дані при ранніх проявах ДАП у стадії ексудації не підлягали підрахунку внаслідок відсутності лімфоїдного компоненту інфільтрату; щ – щільний; д – дифузний.

підгострими з ознаками імунного дисбалансу: на фоні продуктивно-запальних змін слизової оболонки визначали ділянки і поля ерозивно-некротичних пошкоджень з формуванням гіперпластичних лімфоїдних інфільтратів, склеротичні зміни підслизового шару. Такі прояви можуть свідчити про хронізацію запалення з автоімунним механізмом і формування сегментарного ерозивно-некротичного автоімунного єюноілеїту.

Наявність гіперактивованих фагоцитуючих CD68⁺-макрофагів і клітин, які експресують рецептор CD14 в запальних інфільтратах слизової оболонки тонкої кишки, свідчить про активні процеси транслокації ендотоксину. Відсутність експресії рецептора CD23, який є лектином С-типу, може свідчити про відсутність фолікулярних дендритних клітин у лімфоїдних утвореннях, або про суттєві зміни в структурі рецептора. Показано, що ЛПС-індукована активація ядерного фактора активованих Т-клітин через CD14 може спричиняти апоптотичну загибель термінально диференційованих дендритних клітин [18]. Є повідомлення, що пригнічення фолікулярних дендритних клітин провокує утворення масивних лімфоцитарних інфільтратів, які, ймовірно, здатні запускати автоімунний процес [19]. Також CD23 діє як фактор росту і активації В-клітин, сприяє диференціюванню в плазматичні клітини.

Зменшення кількості аж до повної відсутності CD138⁺-плазматичних клітин у запальних інфільтратах і слизових оболонках може свідчити про початкову недостатність і виснаження плазматичних клітин протягом захворювання. Цей факт викликає особливу цікавість, бо відомо, що в пов'язаних зі слизовою оболонкою лімфоїдних тканинах плазматичні клітини секретують антитіла IgA. Основною функцією IgA є зв'язування бактерій і вірусів на поверхні слизових оболонок, що перешко-

джає попаданню патогенів у внутрішнє середовище організму. Ці ж імуноглобуліни беруть участь у нейтралізації бактерійних токсинів [20].

Особливості запального інфільтрату в дистальних відділах тонкої кишки померлих в різні терміни захворювання свідчать про значний внесок грамнегативних бактерій у розвиток синдрому ендогенної інтоксикації при COVID-19. Оформлений склад запальних інфільтратів, наявність у слизовій оболонці тонкої кишки підгострих пошкоджень з фібропластичною реакцією стромы, або ознаками хронізації запалення, можуть свідчити про раніше ураження тонкої кишки, порівняно зі змінами у тканині легень.

Судини тонкої кишки. В судинах підслизового шару померлих з ранніми проявами ДАП виявляли десквамацію ендотелію як у венозних судинах, так і артеріальних. Запальної інфільтрації в стінках судин не було. У просвіті венозних судин в різній кількості виявляли гіпо- та анізохромні еритроцити, шизоцити, часто макрофаги, що містили зерна гемосидерину. Вільно розташовані зерна гемосидерину виявляли також у просвіті і стінках вен. В дрібних венах підслизового шару тонкої кишки спостерігали набухання ендотелію, адгезію ПЯЛ з ознаками нетозу до ендотелію, формування лейкоцитарних пасток (фото 6а). У судинах слизової оболонки і підслизового шару, що добре візуалізувались при ІГХ реакції з CD31, відзначали набухання і масивну десквамацію ендотелію (фото 6б).

Вени портальної системи і ділянки непарної вени з прилеглою клітковиною середостіння. Вивчення судин малого, середнього і великого калібру показало наявність ознак десквамації ендотелію в усіх досліджених зразках. Ендотелій вен експресував CD31 і CD34 антигени. CD34⁺-клітини були у всіх шарах стінок вен з най-

більшою кількістю в адвентиції. Експресія CD34 в ендотелії і стінках вен свідчить про активні процеси репарації ендотелію за участю циркулюючих CD34⁺-клітин-попередників ендотелію [21] і периваскулярних стовбурових CD34⁺-клітин, ймовірно, за допомогою міграції через стінку судини (фото 6в).

Слід зазначити, що дослідження судин мало значні обмеження, пов'язані з великою протяжністю судинного русла. Тому виявлення тромбозів було випадковим. Однак, навіть при неприцільному взятті зразків, тромботичні прояви в гістологічних препаратах судин були знайдені в 5 випадках (27,7 %).

Так, у брижовій вені померлого з проявами ДАП в стадії проліферації був виявлений пристінковий тромб з ознаками організації (фото 6г).

У 2 випадках з проявами ДАП у стадії ексудації у великих венах портальної системи крім десквамації ендотелію можна було виявити нерівномірний набряк інтими із запальною інфільтрацією, наявністю апоптотичних тілець серед клітин інфільтрату. Були помітні пухко пов'язані зі стінкою вени тромби і бляшкоподібні потовщення інтими з поліморфноклітинною запальною інфільтрацією (фото 6д, е).

При дослідженні ділянок непарної вени, тромбів не було. Але в прилеглій клітковині в одному випадку з ранніми проявами ДАП спостерігали явища тромбозу в дрібних венозних і артеріальних судинах без запальної інфільтрації в стінках. Тромби склались переважно зі склеєних еритроцитів, відзначалась анізохромія еритроцитів, аж до втрати гемоглобіну. Постійним компонентом тромбів були клітинні уламки, «клітини-тіні», злущений ендотелій, зерна гемосидерину, гемосидерофаги. Іноді виявляли тромби, представлені гіаліноподібними фібриноідними масами (фото 7а, б). В одному випадку при ДАП в стадії проліферації у клітковині поряд з непарною веною була виявлена невелика вена з наявністю поліподібного пристінкового тромбу.

В непарну вену впадають бронхіальні вени, тому тромбоз судин у прилеглій клітковині може свідчити про їх залучення у тромботичний процес через бронхопупльмональні венозні анастомози.

Ранні прояви ДАП при COVID-19 характеризувались утворенням мікротромбів у просвіті капілярів внаслідок нетозу ПЯЛ з формуванням лейкоцитарних пасток [22]. Тромби виявляли не тільки в судинах мікроциркуляторного русла, що характерно для ГРДС будь-якої етіології, але і в просвіті судин дрібного і середнього калібру. Слід зазначити відсутність запальної інфільтрації в стінках судин легень, що спонукає до думки про позалегенові причини тромбоутворення. Тромби склались зі склеєних еритроцитів, фібрину, відзначали явища стазу, сладж еритроцитів, формування гіалінових тромбів. Виявляли ознаки гемолізу еритроцитів. Постійним ком-

понентом тромбів були злущений ендотелій, клітинні уламки, «клітини-тіні», зерна гемосидерину, часто макрофаги із зернами гемосидерину. Такий склад тромбів може свідчити про тяжку інтоксикацію.

В судинах слизової оболонки, підслизового шару і брижі тонкої кишки виявляли значну десквамацію ендотелію як у венозних, так і артеріальних судинах. У великих венах портальної системи були помітні ознаки нерівномірного ураження інтими у вигляді вогнищового ендодфлебиту, формування пристінкових тромбів.

Таким чином, тяжкий перебіг COVID-19 супроводжується тяжкою ендотеліальною дисфункцією з пошкодженням ендотелію, можливістю поширеного тромбоутворення вже на ранніх стадіях хвороби, не тільки в судинах легень, але й у позалегенових судинах як венозного, так і артеріального типу. Тромбоз артерій можна пояснити лише наявністю відкритих артеріовенозних шунтів.

Цікавим видається виявлений факт відсутності запальної інфільтрації в стінках судин досліджених об'єктів, ознак міграції лейкоцитів через стінки капілярів у просвіт альвеол легень, що має відбуватись вже до кінця першої доби від початку захворювання. Лейкоцити мігрують завжди за градієнтом концентрації хемоаттрактантів. У легенях спостерігали ексудацію при відсутності міграції лейкоцитів. Це може означати або блокаду міграції, або те, що хемоаттрактанти знаходяться в просвіті судин. Тобто агент, що викликає активацію лейкоцитів, знаходиться безпосередньо в крові, а не у просвіті альвеол.

Зниження міграційної здатності ПЯЛ спостерігається при значній активації в них метаболічних процесів і гіперадгезивності [23]. Явище блокування міграції активованих ліпополісахаридом ПЯЛ з капілярного русла у просвіт альвеол описано при інстиляції анестетиків [24]. Тут доречно вказати, що спайк-білок SARS-CoV-2 здатний надавати анальгезуючий ефект при взаємодії з NRP-1 [6]. Таким чином можна припускати, що порушення міграції лейкоцитів через стінки капілярів (крім гіперактивності) може бути одним із проявів зниження реактивності сенсорної системи на пошкодуючі стимули при COVID-19.

Масова загибель, нетоз ПЯЛ, ізольованих у просвіті судин, з вивільненням протеаз, лізосомальних ферментів, радикалів кисню, призводять до пошкодження ендотелію і базальних мембран, аномальної ексудації, тромбоутворення, гіперактивності тканинних (резидентних), зокрема альвеолярних макрофагів з наступним пошкодженням стромальних і паренхіматозних елементів, переважно за рахунок механізмів апоптозу. Такий процес, вірогідно, й обумовлює формування пошкоджень з імунодефіцитним характером запального інфільтрату при ДАП, що в подальшому забезпечує гіперпластичні і дисрегенераторні зміни в тканині легень.

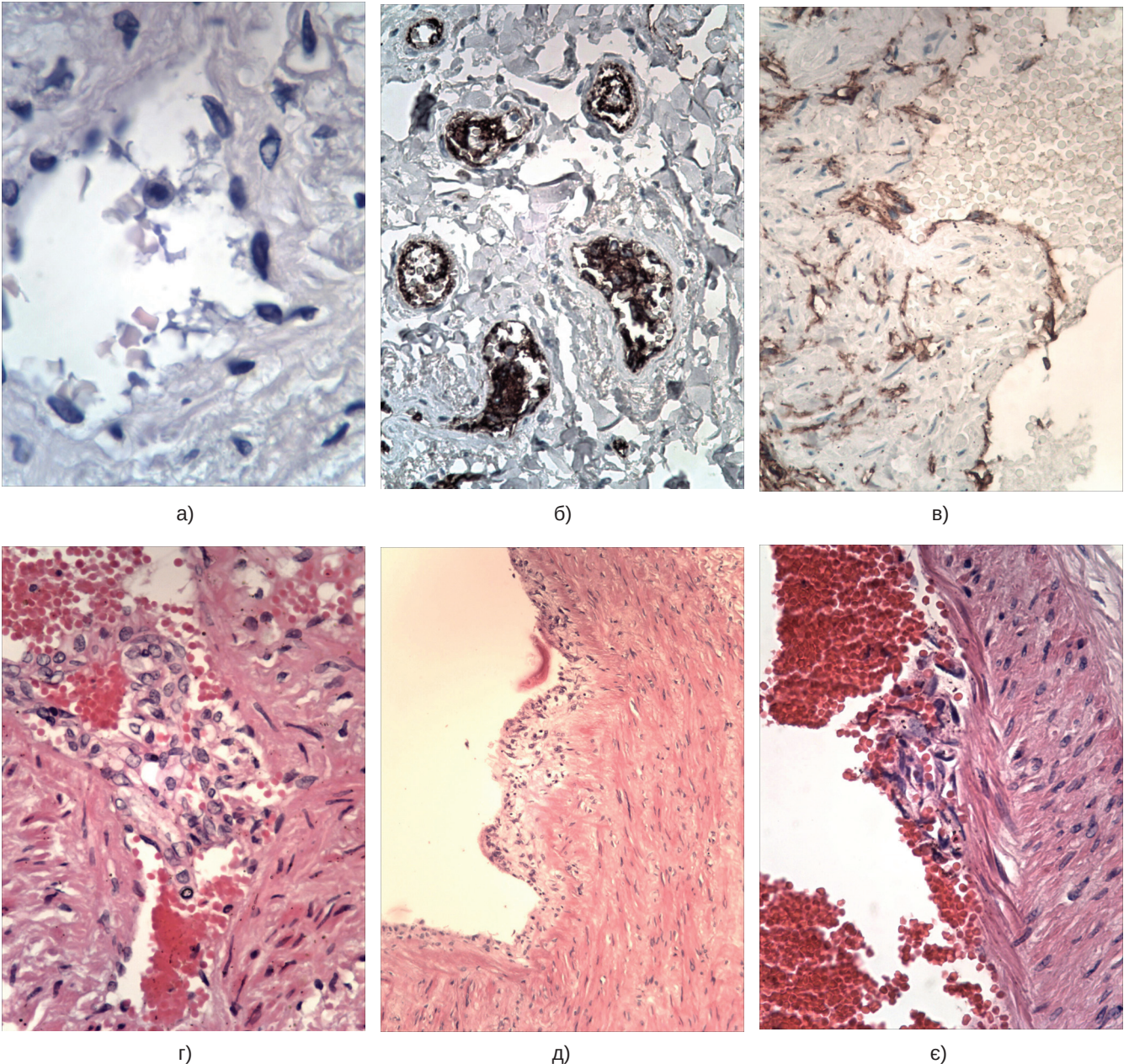


Фото 6. Судини тонкої кишки: а) вена підслизового шару тонкої кишки. Набухання ендотелію, нетоз ПЯЛ з формуванням лейкоцитарних пасток ($\times 1000$, забарвлення гематоксилін і еозин); б) масивна десквамація ендотелію в судинах підслизового шару ($\times 400$, ІГХ реакція з CD31); в) стінка великої вени. Репарація ендотелію за рахунок міграції CD34+ клітин ($\times 400$, ІГХ реакція з CD34); г) вена брижі тонкої кишки, пристінковий тромб з ознаками організації ($\times 400$, забарвлення гематоксилін і еозин); д) велика вена. Набряк інтими із запальною інфільтрацією, наявністю апоптотичних тілець ($\times 100$, забарвлення гематоксилін і еозин); е) формування пристінкового тромбу зі злущеним ендотелієм ($\times 400$, забарвлення гематоксилін і еозин).

Відомо, що десквамація ендотелію в судинах при інфекційних захворюваннях більш характерна для інтоксикацій, обумовлених ЛПС грамнегативних бактерій, і розвивається після адгезії до ендотелію активованих

ЛПС ПЯЛ, які при контакті з ендотоксином набувають автоагресивних властивостей [17, 25]. Пряме ураження ендотелію при вірусних захворюваннях частіше супроводжується лізісом ендотеліальних клітин і розвитком

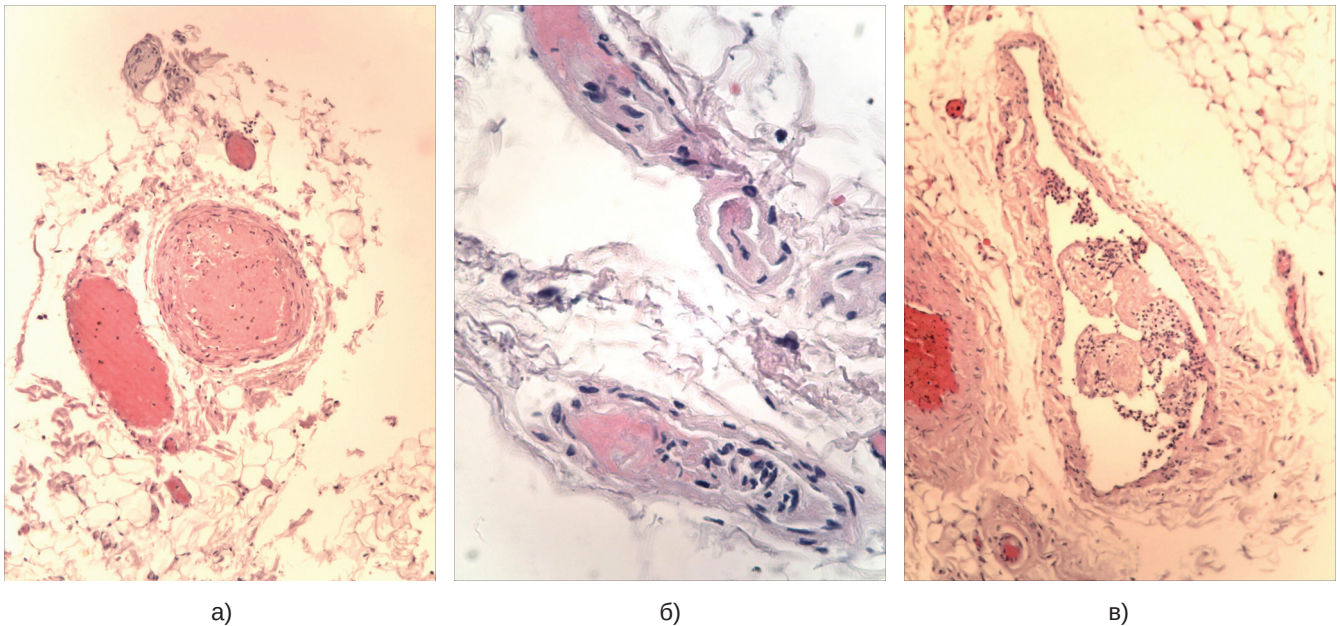


Фото 7. Судини клітковини середостіння: а) тромбоз дрібних вен і артерії (×100, забарвлення гематоксилін і еозин); б) гіалінові тромби з наявністю у складі злуценого ендотелію і клітинних уламків (×400, забарвлення гематоксилін і еозин); в) поліпоподібний пристінковий тромб (×100, забарвлення гематоксилін і еозин).

геморагічного синдрому, в той час як SARS-CoV-2 не викликає геморагічної хвороби, подібної до вірусу Ебола [26], або розвиток геморагічного синдрому виникає в результаті дії вторинних факторів, порушень у системі коагуляції.

ЛПС в підвищеній кількості потрапляє в системний кровоплин завдяки порушенню бар'єрної функції кишечника, що обумовлено вірусним ентеритом і фоновими захворюваннями. Збільшенню концентрації ЛПС у просвіті кишки сприяє загибель бактерій при невиправданій, або нераціональній антибактерійній терапії. Особливу увагу привертає дослідження, результати якого свідчать про бактеріофагоподібну поведінку SARS-CoV-2 на тій підставі, що цей вірус реплікується в середовищі для росту бактерій, інкульованому зразком випорожнень інфікованого пацієнта, і що реплікація слідує за ростом бактерій [27].

До речі, можливість реплікації SARS-CoV-2 в ентеробактеріях не виключає також можливості реплікації вірусу в бактеріях слизової оболонки носоглотки. Особливо, зважаючи на те, що АПФ2⁺-клітин в назальному і бронхіальному епітелії менше 1 %, в той час, як SARS-CoV-2 поширюється передусім аерозольно-інгаляційним шляхом.

ЛПС є облігатним антигеном нормального антигенного оточення людини і постійно потрапляє в системну циркуляцію. При цьому гомеостаз підтримується системою адаптивного імунітету. Встановлено, що у людей з

надмірною масою тіла, а також у хворих на ЦД, які й становлять основну групу ризику тяжкого ступеня COVID-19, концентрація ЛПС у крові істотно вища, ніж в осіб, які не страждають ожирінням і ЦД, а показники адаптивної імунної відповіді на ЛПС ентеробактерій знижені [28]. Такі факти свідчать на користь нашого припущення про наявність початкової недостатності мукозального імунітету, обумовленої дефіцитом CD138⁺-плазматичних клітин у пов'язаних зі слизовою оболонкою лімфоїдних тканинах, зокрема тонкої кишки у померлих з тяжкими проявами COVID-19.

ЛПС при попаданні в системний кровоплин викликають потужну запальну відповідь. Особливості й результати запальної відповіді на ЛПС залежать від дози ендотоксину, кратності та термінів його введення. Найтяжчі варіанти запальної відповіді розвиваються за механізмом параалергічних реакцій типу феноменів Шварцмана і Санареллі [17].

Виявлені нами морфологічні феномени, що демонструють участь гіперактивованих ендотоксином ПЯЛ і макрофагів у розвитку тяжких проявів COVID-19, а також ефективність застосування глюкокортикоїдів при лікуванні, свідчать саме про параалергічні механізми розвитку ушкоджень.

Є думка про аерогенний шлях інфікування пневмоцитів. Але пневмоцити не стикаються з повітрям напряду, бо захищені шаром глікокаліксу і сурфактанту з одного боку, а з другого – базальною мембраною та

ендотелієм, що також вкритий шаром глікокаліксу. Крім того, ендотеліальні клітини судин виявилися стійкими до інфікування SARS-CoV-2 [16]. Тобто, для інфікування пневмоцити повинні бути демасковані. На нашу думку, таким демаскуючим фактором, що сенсифілізує тканину легень до зараження, є саме ендотоксикозна агресія.

Можливо ознаки ураження легень SARS-CoV-2 з'являються після гематогенного зараження, нашаровуючись на картину ДАП, внаслідок ендотоксикозних атак. ЛПС ентеробактерій і вірус можуть доставлятися ПЯЛ і макрофагами. Судинна пневмопатія і гемодинамічні розлади при COVID-19 можуть виникати за механізмом, що аналогічний механізму розвитку гепатопульмонального синдрому [29]. За даними літератури, у фізіологічних умовах, за рахунок наявності портокавальних анастомозів близько 6 % портальної крові минає печінковий бар'єр і скидається безпосередньо в системний кровообіг [30]. При аутопсіях, у всіх померлих від COVID-19 виявляли жирову дистрофію печінки різного ступеня, ознаки проміжного гепатиту, центролобулярні вогнища некрозу в частині випадків [2]. Взаємодія рецептора сінусоїдальних ендотеліальних клітин печінки L-SIGN з SARS-CoV-2, що сприяє коагулопатії [5], безсумнівно є одним з факторів утруднення внутрішньопечінкового кровообігу та зниження дезінтоксикаційної функції печінки. Захворювання і стани, що супроводжуються портальною гіпертензією, відповідно будуть збільшувати кількість шунтованої крові через венозні колатералі, підвищуючи концентрацію ЛПС у крові малого кола кровообігу і можливість як тромбозу дрібних судин, так і емболізації з портальної венозної системи та портокавальних анастомозів. Після пошкодження судин легень розвивається пульмональна гіпертензія з артеріовенозним шунтуванням в малому колі кровообігу, що сприяє прямому попаданню вірусу, токсинів, клітинного «сміття» і тромбопластичних матеріалів у велике коло кровообігу.

Таким чином, COVID-19 як хвороба, є результатом взаємодії вірусу, макроорганізму і його мікробіоти. Морфологічні зміни в судинах свідчать про непряме ураження ендотелію. Аналіз проведеного нами комплексного морфологічного дослідження аутопсійного матеріалу померлих від COVID-19 дає підстави вважати, що фактором, який призводить до вторинного системного ураження ендотелію судин, в тому числі й судин легень, може бути ендотоксикоз, спровокований специфікою вірусного ураження клітин і активацією ендогенної мікрофлори, яка продукує ЛПС за рахунок активного запального процесу у тонкій кишці з ураженням її судин, а також судин портальної системи. Уточнення цих механізмів

може дещо змінити парадигму лікування хворих на коронавірусну хворобу, зокрема, можливо, у частині застосування протибактерійної терапії, місце і доцільність якої до теперішнього часу продовжує бути предметом дискусії.

Висновки

1. Є підстави вважати, що вхідними воротами для збудника при тяжкому ступеню COVID-19 поряд з дихальною системою є слизова оболонка дистальних відділів тонкої кишки.
2. Наявність гіперактивованих CD68⁺-макрофагів і CD14⁺-клітин у запальних інфільтратах слизової оболонки тонкої кишки підтверджує вірогідність транслокації ендотоксину грамнегативних бактерій у системний кровообіг при тяжкому ступеню COVID-19.
3. Результати гістологічного дослідження тканини легень померлих з ранніми проявами ДАП у фазі ексудації при COVID-19 вказують на те, що основним проявом дії альтернативного фактора розвитку ДАП були тромбози без ознак попереднього запального процесу. Мікротромби у просвіті капілярів утворювались внаслідок нетозу ПЯЛ з формуванням лейкоцитарних пасток при відсутності ознак міграції лейкоцитів через стінки капілярів у просвіт альвеол.
4. Встановлено морфологічні та ІГХ патерни ентериту й сегментарного ерозивно-некротичного аутоімунного єноуолієту при тяжкому ступеню COVID-19. Зменшення кількості або відсутність CD138⁺-плазматичних клітин у запальних інфільтратах слизової оболонки тонкої кишки може свідчити про початкову недостатність і виснаження мукозального імунітету протягом захворювання.
5. ЛПС, а також продукти запальних процесів тонкої кишки та її судин, вен портальної системи і портокавальних анастомозів можуть служити потужним джерелом тромбопластичних матеріалів з розвитком тяжких проявів ендотеліальної дисфункції при COVID-19, системної запальної відповіді та коагулопатії.
6. Особливістю васкулопатії при COVID-19 є ендотромбоваскуліт, який супроводжується порушенням міграції лейкоцитів через стінку судин, що може призводити до патоморфозу перебігу запального процесу з надлишковою мобілізацією тканинних макрофагів.
7. Ураження легень при COVID-19 слід розуміти як судинну пневмопатію, перебіг якої супроводжується ознаками імунної дисфункції і виснаження Т-лімфоцитів з особливостями у вигляді тромбангіїту, формуванням тромбів в артеріях і венах переважно дрібного і середнього калібру, як *in situ*, за механізмом параалергічної реакції, так і шляхом тромбоемболії.

Література

- Andrew, G. Harrison, Tao Lin, Penghua, Wang. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41 (12), 1100-1111, ISSN1471-4981, 1471–4906, 1471–4981. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Zayratyants, O.V., Samsonova, M.V., Mikhaleva, L.M., ... & Kalinin, D.V. (2020). Pathological anatomy of COVID-19. NIOZMM DZM, Moscow [in Russian]. https://mosgorzdrav.ru/uploads/imperavi/ru-RU/patanatomiya_covid19_fullv2_compressed.pdf
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., ... & Han Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med*, 14, 185-192. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>
- Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., ... & Shan, H. (2020). Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, May, 158 (6), 1831-1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
- Yuji, Kondo, Zhongxin, Yu, Lijun, Xia. (2021). L-SIGN is a receptor on liver sinusoidal endothelial cells for SARS-CoV-2 virus. *JCI Insight*, 6 (14), e148999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148999>
- Moutal, A., Martin, Laurent F., Boiron, L., Gomez, K., ... & Khanna, Rajesh. (2020). SARS-CoV-2 Spike protein co-opts VEGF-A/Neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia. *PAIN*, 162 (1), 243-52. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000002097
- Wang, C., Xie, J., Zhao, L., ... & Bian, Xiu-Wu. (2020). Alveolar macrophage activation and cytokine storm in the pathogenesis of severe COVID-19. *EBioMedicine*, Jul, 57, 102833. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>
- Ye, Q., Wang, B., Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the «Cytokine Storm» in COVID-19. *J. Infect.*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
- Szekely, L., Bozoky, B., Bendek, M., Ostad, M., ... & Szakos, A. (2021). Pulmonary stromal expansion and intra-alveolar coagulation are primary causes of COVID-19 death. *Heliyon*, 7, e07134. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07134>
- Kruglikov, I. L., Scherer, P. E. (2021). Preexisting and inducible endotoxemia as crucial contributors to the severity of COVID-19 outcomes. *PLoS Pathog*, 17 (2), e1009306. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009306>
- Ghosh, S., Lertwattanarak, R., Garduño, J., ... & Musi, N. (2015). Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. *J. Gerontol. A. Biomed. Sci. Med. Sci.*, 70, 232–246. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu067>
- Miller, M.A., McTernan, P.G., Harte, A.L., ... & Cappuccio, F.P. (2009). Ethnic and sex differences in circulating endotoxin levels: A novel marker of atherosclerotic and cardiovascular risk in a British multi-ethnic population. *Atherosclerosis*, 203, 494-502. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.018>
- Wanglong Gou, Yuanqing Fu, Liang Yue., ... & Ju-Sheng Zheng. (2021). Gut microbiota, inflammation, and molecular signatures of host response to infection. *Journal of Genetics and Genomics*, 48 (9), 792–802, ISSN 1673-8527. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.04.002>
- Sirivongrangson, P., Kulvichit, W., Payungporn, S., ... & Nattachai, Srisawat. (2020). Endotoxemia and circulating bacteriome in severe COVID-19 patients. *ICMx*, 8, 72. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00362-8>
- Tsihankov, K.V., Logvinenko, V.O., Kuzhevsky, I.V., Pavlenko, V.M. (2020). Damage of jejunum as a possible reason for the development of acute respiratory distress syndrome in COVID19. *Ukrainian Medical Journal*, 4 (138). <https://doi.org/10.32471/umj.1680-3051.138.185788> [in Ukrainian].
- Nicosia, R. F., Ligresti, G., Caporarello, N., ... & Ribatti, D. (2021). COVID-19 Vasculopathy: Mounting Evidence for an Indirect Mechanism of Endothelial Injury. *The American Journal of Pathology*, 191 (8), 1374-1384. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.05.007>
- Yakovlev, M.Y. (2021). Systemic endotoxemia. Nauka, Moscow, 184 p. ISBN 978-5-02-040858-6. http://www.patolog.ru/sites/default/files/see_gomeo_i_obshchaya_pat_yakovlev_2021.pdf [in Russian]
- Zanoni, I., Ostuni, R., Capuano, G., ... & Granucci, F. (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460, 264-268. <https://doi.org/10.1038/nature08118>
- Aguzzi, A., Krautler, N. J. (2010). «Characterizing follicular dendritic cells: A progress report.» *Eur. J. Immunol.*, 40 (8), 2134-2138. <https://doi.org/10.1002/eji.201040765>
- Chu, V.T., Beller, A., Nguyen, T.T., Steinhäuser, G., Berek, C. (2011). The long-term survival of plasma cells. *Scand. J. Immunol.*, 73 (6), 508-511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02544.x>
- Kuzubova, N.A., Titova, O.N., Lebedeva, E.S., & Volchkova, E.V. (2021). Endothelial progenitor cells in pathogenesis of new coronavirus infection. *Meditsinskiy sovet – Medical Council*, (4), 199-204. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-4-199-204> [in Russian].
- Yu Zuo, Srilakshmi Yalavarthi, Hui Shi, Gockman K., ... & Jason, S. Knight. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 5 (11), e138999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
- Dahinden, C., Galanos, C., Fehr, J. (1983). Granulocyte activation by endotoxin. Correlation between adherence and other granulocyte functions and role of endotoxine structure on biologic activity. *J. Immunol.*, 130 (2), 857-862. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6848599/>
- Chang, J.C. & Lesser, M. (1984). Quantitation of leukocytes in bronchoalveolar lavage samples from rats after intravascular injection of endotoxin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129 (1), 72-75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6367572/>
- Sokolovskiy, S.V. (2018). Glycocalyx – birth of a new clinical paradigm. *Anesteziologiya i Reanimatologiya – Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*, 4, 22-29 <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology201804122> [in Russian].
- Nascimento Conde J., Schutt W.R., Gorbunova E.E., Mackow E. R. (2020). Recombinant ACE2 expression is required for SARS-CoV-2 to infect primary human endothelial cells and induce inflammatory and procoagulative responses. *mBio*, 11, e03185-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03185-20>
- Petrillo, M., Brogna, C., Cristoni, S., ... & Guy, Van den Eede. (2021). Increase of SARS-CoV-2 RNA load in faecal samples prompts for rethinking of SARS-CoV-2 biology and COVID-19 epidemiology. *F1000Research*, 10, 370. <https://doi.org/10.12688/f1000research.52540.2>
- Gordienko, A.I. (2015). Levels of serum antibodies to enterobacterial lipopolysaccharides and their relationship with concentration of C-reactive protein in diabetes mellitus patient. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87 (3), 98-106. http://ukrbiochemjournal.org/wp-content/uploads/2015/07/Gordienko_3_15.pdf [in Russian].
- Soulaidopoulos, S., Goulis, I., & Cholongitas, E. (2020). Pulmonary manifestations of chronic liver disease: a comprehensive review. *Annals of Gastroenterology*, 33 (3), 237-249. <https://doi.org/10.20524/aog.2020.0474>
- Neves, A.L., Coelho, J., Couto, L., ... & Ronson-Albuquerque, Jr.R. (2013). Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *Mol. Endocrinol.*, 51 (2), 51-64 <https://doi.org/10.1530/JME-13-0079>

PATHOGENETIC ROLE OF ENDOTOXICOSIS IN DEVELOPMENT OF COVID-19 SEVERE CASES: CLINICAL AND PATHOMORPHOLOGICAL RESEARCH

K.V. Tsyhankov¹, L.R. Shostakovych-Koretska², V.M. Pavlenko¹,
I.V. Kuzhevsky¹, V.O. Lohvynenko³

¹City Clinical Hospital № 4, ²Dnipro Government Medical University, ³Professor Ye.H. Popkova's City Clinical Hospital № 21" Dnipro

SUMMARY. *The aim of the work.* Based on a clinical and morphological study of lung and gastrointestinal tract lesions at different stages of the inflammatory process characteristics, the hypothesis of endotoxycosis as a key pathogenetic factor of systemic endothelial dysfunction and secondary lung damage in COVID-19 cases were set up.

Materials and methods. *The research is based on a clinical and pathomorphological study of 52 deaths from COVID-19 from which the autopsy material from 18 deaths was selected for histological research. In some cases, the method of immersion microscopy was used, and an immunohistochemical study was performed.*

Results. *The main evidence of diffuse alveolar damage (DAD) alternative's factor action was the microthrombosis against the leukocyte traps background, which was formed by the netosis of hyperactivated polymorphonuclear leukocytes. The absence of a preexisting inflammatory process and signs of PMNs migration through the walls of the capillaries into the lumen of the alveoli were noted. At the same time, the histological image of changes in the small intestine corresponded to the acute desquamative-erosive inflammatory process of viral-bacterial etiology with signs of active endotoxin translocation. Hyperergic focal lymphoid infiltrates were formed in the inflammatory infiltrate of the small intestinal mucosa, both in the stage of early exudation ($p < 0.005$) and in the stage of proliferation of DAP ($p < 0.001$). The significantly low immunoregulatory index (IRI) CD4 /CD8 was demonstrated in histological samples of inflammatory pulmonary infiltrate compared with IRI in inflammatory bowel infiltrate ($p < 0.001$). A model of the pathogenesis of COVID-19 has been proposed, according to which lung damage can occur secondarily, by the mechanism of hepatopulmonary syndrome.*

Conclusions. *There is a reason to believe that the entrance gate of infection in the severe cases of COVID-19, along with the respiratory system is the mucous membrane of the distal small intestine. The revealed morphological demonstration of severe endothelial dysfunction with endothelial damage in COVID-19 indicates endotoxin damage by the similarity of para-allergic reaction rather than direct viral damage.*

Key words: COVID-19; endothelial dysfunction; endotoxycosis; jejunum; hepatopulmonary syndrome; vascular pneumopathy.

Відомості про авторів:

Циганков Костянтин Вікторович – лікар-патологоанатом, відділення патологічної анатомії, КНП «Міська клінічна лікарня № 4» Дніпровської міської ради; e-mail: 101262ts@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1536-4021>

Шостакович-Корецька Л.Р. – д-р мед. наук, професор, кафедра інфекційних захворювань Дніпровського державного медичного університету; e-mail: shost3@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3637-8457>

Павленко В.М. – лікар-патологоанатом, відділення патологічної анатомії КНП «Міська клінічна лікарня № 4» Дніпровської міської ради; e-mail: valka.pavlenko@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8807-2655>

Кужевський І.В. – лікар-патологоанатом, зав. відділенням патологічної анатомії, КНП «Міська клінічна лікарня № 4» Дніпровської міської ради; e-mail: kuzhevskyi@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8845-7245>

Логвиненко В.О. – лікар-патологоанатом, зав. відділенням патологічної анатомії, КНП «Міська клінічна лікарня № 21 імені професора Є.Г. Попкової» Дніпровської міської ради; e-mail: vaallog@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3367-4744>

Information about authors:

Tsyhankov K. V. – pathologist at the Department of Pathological Anatomy, City Clinical Hospital No. 4, Dnipro; e-mail: 101262ts@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1536-4021>

Shostakovych-Koretska L. R. – DSc, Professor at the Department of Infectious Diseases, Dnipro State Medical University; e-mail: shost3@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3637-8457>

Pavlenko V. M. – pathologist at the Department of Pathological Anatomy, City Clinical Hospital No. 4, Dnipro; e-mail: valka.pavlenko@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8807-2655>

Kuzhevsky I. V. – pathologist, Head of the Department of Pathological Anatomy, City Clinical Hospital No. 4, Dnipro; e-mail: kuzhevskyi@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8845-7245>

Lohvynenko V. O. – pathologist, Head of the Department of Pathological Anatomy, Professor Ye. H. Popkova's City Clinical Hospital No. 21, Dnipro; e-mail: vaallog@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3367-4744>

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interests to declare.

Отримано 20.02.2022 р.