

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСОГЛОТКИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОЙ ФОРМЫ И ПЕРИОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

Е.В. Крюков<sup>1</sup>, К.В. Жданов<sup>1</sup>, К.В. Козлов<sup>1</sup>, В.Ю. Кравцов<sup>1</sup>, О.В. Мальцев<sup>1</sup>, В.С. Сукачев<sup>1</sup>, П.И. Миклуш<sup>1</sup>, М.О. Соколова<sup>1</sup>, В.В. Шарабханов<sup>1</sup>, Р.И. Глушаков<sup>1</sup>, В.В. Дворянчиков<sup>1</sup>, Р.Р. Ачба<sup>1</sup>, Д.В. Тришкин<sup>2</sup>, И.И. Азаров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Главное военно-медицинское управление, Москва, Россия

### Electron microscopic changes in the nasal membrane of patients with COVID-19 depending on the clinical form and the period of the disease

E.V. Kryukov<sup>1</sup>, K.V. Zhdanov<sup>1</sup>, K.V. Kozlov<sup>1</sup>, V.Yu. Kravtsov<sup>1</sup>, O.V. Mal'tsev<sup>1</sup>, V.S. Sukachev<sup>1</sup>, P.I. Miklush<sup>1</sup>, M.O. Sokolova<sup>1</sup>, V.V. Sharabkhanov<sup>1</sup>, R.I. Glushakov<sup>1</sup>, V.V. Dvoryanchikov<sup>1</sup>, R.R. Achba<sup>1</sup>, D.V. Trishkin<sup>2</sup>, I.I. Azarov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> The Main Military Medical Directorate, Moscow, Russia

#### Резюме

Учитывая, что COVID-19 представляет общемировую проблему в области здравоохранения и почти все страны мира серьезно пострадали от пандемии COVID-19, активно проводятся исследования, направленные на лучшее понимание воздействия вируса на клетки организма человека. Вместе с тем, не до конца ясно, какие изменения наблюдаются в клетках основных ворот инфекции — слизистой рото-, носоглотки при разных клинических формах и в разные периоды заболевания. Понимание ультраструктурных изменений клеток-мишеней SARS-CoV-2, возможно, поможет уточнить патогенетические аспекты распространения инфекции в нижние дыхательные пути. В настоящем исследовании при помощи электронной микроскопии проведена оценка элементов жизненного цикла вируса SARS-CoV-2 в клетках реснитчатого эпителия носоглотки у пациентов с COVID-19 с целью выявления особенностей жизнедеятельности вируса в зависимости от формы и периода заболевания. У больных COVID-19 отбирались биоптаты слизистой оболочки носоглотки, которые в последующем исследовались при помощи электронной микроскопии. Определялась выраженность структурных изменений в образцах ткани, наличие вируса SARS-CoV-2 в клетках, далее биоптаты были распределены по группам в зависимости от клинической формы инфекционного процесса (инаппарантная, острое респираторное заболевание верхних дыхательных путей, вирусное поражение легких) и периода заболевания. Установлено, что наиболее характерные изменения слизистой оболочки носоглотки наблюдались в 1-ю неделю инфекции, вызванной SARS-CoV-2 и протекающей в форме острого респираторного заболевания, тогда как для вирусного поражения легких отмечалась наибольшая плотность вируса в везикулах внутри клеток, при этом образование гладких везикул, не содержащих вируса, наиболее характерно для инаппарантных

#### Abstract

Given that COVID-19 is a global public health problem and that almost all countries in the world have been severely affected by the COVID-19 pandemic, research is being actively pursued to better understand the effects of the virus on human cells. However, it is not clear what changes are observed in the cells of the main gate of infection — the mucosa of the mouth and the nose at different clinical forms and at different periods of disease. Understanding the ultra-structural cell changes of SARS-CoV-2 targets may help clarify the pathogenic aspects of infection in the lower respiratory tract. In this study, the elements of the life cycle of SARS-CoV-2 virus in the cells of the respiratory epithelium of the nose in patients with COVID-19 were evaluated using electron microscopy for the purpose of detecting the peculiarities of viral activity depending on the form and period of disease. Biopsies of the nasal mucous membrane were taken from COVID-19 patients and subsequently examined by electron microscopy. The severity of structural changes in tissue samples, presence of SARS-CoV-2 virus in cells were determined, then biopsies were grouped according to the clinical form of the infection process (inapparent, acute upper respiratory tract infections, viral lung disease) and period of disease. It has been established that the most characteristic changes in the mucous membrane of the nose were observed in the first week of infection caused by SARS-CoV-2 and occurring in the form of acute respiratory disease, while viral lung infections have had the highest virus density in vesicles within cells, the formation of smooth virus-free vesicles is most common in inapparent forms. The data obtained may indicate that the formation of classical virus-induced changes in the respiratory epithelium of the nose mucous (vesicles with viral particles and signs of their release from the cell) is characteristic of localized forms of infection caused by SARS-CoV-2 (respiratory infection of the upper respiratory tract) and in cases of generalized infection (viral infection

форм. Полученные данные могут свидетельствовать, что формирование классических вирус-индуцированных изменений реснитчатого эпителия слизистой носоглотки (везикул с вирусными частицами и признаками их выхода из клетки) характерно для локализованных форм инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (респираторной инфекции верхних дыхательных путей), а в случаях развития генерализованной инфекции (вирусного поражения легких и, вероятно, других органов и систем) – накопление возбудителя в высоких концентрациях в везикулах.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, электронная микроскопия, биопсия слизистой носоглотки, клинические формы COVID-19.

## Введение

К началу XXI в. коронавирусы уже представляли серьезную ветеринарную проблему, однако считалось, что эпидемические коронавирусы не относятся к числу особо опасных. Представители семейства Coronaviridae имеют узкий спектр хозяев, однако некоторые из них способны преодолевать межвидовой барьер и вызывать эпидемические вспышки [1]. Научному сообществу пришлось пересматривать эти представления сначала в 2002 г., когда вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) проник в популяцию людей из популяции летучих мышей в Юго-Восточной Азии, а потом в 2012 г., когда были открыты природные очаги вируса Ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV – Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) на территории Аравийского полуострова [1, 2].

Возникшая на рубеже 2019–2020 гг. сначала в г. Ухань (китайской провинции Хубэй) и распространившаяся затем во многие страны мира пандемия COVID-19 (Coronavirus disease 2019), этиологически связанная с вирусом тяжелого острого респираторного синдрома типа 2 (SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome 2), породила новую волну интереса к коронавирусам [2]. Эпидемическая опасность со стороны нового заболевания стала понятна уже 12.12.2019 г., когда был госпитализирован первый пациент [3]. С декабря 2019 г. по март 2020 г. наиболее широкое распространение SARS-CoV-2 получил на территории Китая. С конца января 2020 г. во многих странах мира стали регистрироваться случаи COVID-19, преимущественно связанные с поездками в Китай. 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале пандемии COVID-19. Почти все страны мира серьезно пострадали от пандемии COVID-19 [4].

При исследовании генома SARS-CoV-2 оказалось, что он гомологичен MERS-CoV на 50%,

*of the lungs and probably other organs and systems) accumulation of the infectious agent in high concentrations in vesicles.*

**Key words:** SARS-Cov-2, electron microscopy, nose mucosa biopsy, clinical forms COVID-19.

SARS-CoV – на 79%, BtRsCoV – на 88%. Учитывая генетическую близость этого вируса с SARS-CoV и коронавирусом китайских подковоносов (BtRsCoV – *Rhinolophus sinicus coronavirus*), Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses) объединил указанные бетакоронавирусы в отдельный подрод Sarbecovirus [5].

Первым этапом жизненного цикла SARS-CoV-2 является рецепторная абсорбция вирусной частицы на поверхности клетки-мишени в результате специфического связывания спайкового белка с клеточным рецептором (в основном, с ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2). Этот же рецептор использует SARS-CoV. Стадии жизненного цикла после связывания с поверхностью клетки-мишени общие для всех коронавирусов (в том числе с SARS-CoV-2) [6, 7].

Учитывая высокий эпидемический потенциал (заразность), вирусы SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV отнесены ко II группе патогенности [4].

Входные ворота возбудителя – эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника [4].

Клиническая картина COVID-19 обычно представляет собой респираторную инфекцию, тяжесть симптомов которой варьирует от легкого гриппоподобного заболевания до тяжелого вирусного поражения легких, приводящего к острому респираторному дистресс-синдрому, коагулопатиям, которые могут быть причиной летального исхода [5]. Помимо этого, выраженное поражение легких при новой коронавирусной инфекции, соответствующее КТ-3 и КТ-4 (при оценке объема уплотненной легочной ткани рентгенологами согласно «эмпирической» визуальной шкале при выполнении компьютерной томографии органов грудной клетки [4]), в периоде ранней реконвалесценции приводит к снижению некоторых показателей функции внешнего дыхания в сравнении с пациентами с КТ-1 и КТ-2 [8].

Большой проблемой для здравоохранения является то, что до сих пор не найдено оптимальных препаратов и их комбинаций для лечения новой коронавирусной инфекции, однако имеется значительное количество исследований, направленных на поиск терапии, в том числе этиотропной [9].

Новая коронавирусная инфекция имеет основные периоды заболевания [10]:

- инкубационный период составляет от 2 до 14 суток;
- начальный период длится с 1-х по 8-е сутки заболевания;
- период разгара (с 8-х суток заболевания);
- период реконвалесценции (с 15–19-х суток заболевания).

Инфекционный процесс протекает в нескольких клинических формах [10]:

- инаппарантная (ИП);
- острая респираторная вирусная инфекция легкого течения (ОРЗ);
- вирусное поражение лёгких (ВПЛ) без дыхательной недостаточности;
- вирусное поражение лёгких с дыхательной недостаточностью.

Как указывают некоторые авторы, характер морфологических изменений при легком течении COVID-19 неизвестен [4]. Данный факт дополнительно стимулирует изучение наравне с генерализованными (вирусное поражение легких) и локализованными (инаппарантная, острая респираторная вирусная инфекция легкого течения) формы течения инфекционного процесса.

В основном, в литературе описывается классический цикл жизни SARS-CoV-2, не учитывающий период и форму заболевания, однако для полноценного понимания течения инфекционного процесса необходимо знать особенности жизнедеятельности вируса и учитывать вероятные изменения, происходящие в клетках в зависимости от длительности течения инфекционного процесса и его клинической формы.

Учитывая, что носо- и ротоглотка – ворота инфекции, а также то, что развитие вирусного поражения легких, как правило, возникает после поражения верхних дыхательных путей, особый интерес представляет исследование характерных изменений именно в рото- и носоглотке, так как эти структуры не только являются воротами для инфекции, но и играют важную роль в распространении вируса. В этой связи изучение изменений клеточных и субклеточных структур, локализации вируса в зависимости от формы и периодов заболевания важно не только для фундаментальной науки, но и для практического здравоохранения. Для этой цели наиболее оптимальным методом диагностики является электронная микроскопия, так как именно она внесла значительный вклад в уточнение структуры и функции SARS-CoV-2 [6].

В ходе настоящего исследования при помощи электронной микроскопии было рассмотрено, как отличаются элементы жизненного цикла вируса SARS-CoV-2 в клетках слизистой носоглотки в зависимости от периода и формы заболевания.

**Цель исследования** – установить с использованием электронной микроскопии слизистой оболочки рото- и носоглотки характерные изменения элементов жизненного цикла SARS-CoV-2 в зависимости от фазы инфекционного процесса и его клинических форм.

#### Материалы и методы

В основу работы положены результаты исследования реснитчатых клеток 30 биоптатов слизистой оболочки носоглотки пациентов с COVID-19, которые проходили обследование и лечение в клинике инфекционных болезней Военно-медицинской академии (ВМедА) им. С.М. Кирова. Биопсия выполнялась врачами-оториноларингологами клиники оторинолангологии ВМедА им. С.М.Кирова. Для исследования были отобраны 28 человек с диагнозом COVID-19, находившиеся на стационарном лечении в клинике в период с июля по октябрь 2020 г. (у 2 человек с вирусным поражением легких биоптаты были отобраны дважды на 1-й и 3-й неделях заболевания), из них 3 пациента с инаппарантной формой COVID-19 (ИП), 15 пациентов с острым респираторным заболеванием (ОРЗ), 12 биоптатов было отобрано у пациентов с вирусным поражением легких (ВПЛ). В группе ИП биопсия слизистой носоглотки была выполнена у 2 пациентов на 3-е сутки заболевания, у 1 – на 8-е сутки, в группе пациентов с ОРЗ на 1-й неделе заболевания у 8 пациентов, на 2-й – у 4, на 3-й – у 3 человек, среди пациентов, перенесших заболевание в форме ВПЛ, на 1-й неделе – у 7 пациентов, на 3-й – у 2, с 4-й по 6-ю неделю – у 3 больных.

После отбора биоптатов фрагменты ткани медленно фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2–7,4 в течение суток при температуре +4 °С. Дофиксацию образцов проводили в 2% растворе осмия (OsO<sub>4</sub>) на том же буферном растворе. Дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, а затем в ацетоне, заливали в смолу Араалдит. Двойное контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором нитрата свинца и 1% водным раствором уранил ацетата. Далее биоптаты подвергались ультрамикроскопическому исследованию (далее – ЭМ): рассматривались реснитчатые клетки слизистой оболочки носоглотки пациентов. Степень выраженности структурных изменений в образцах ткани разных групп исследовали на полевом эмиссионном растровом электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss) (Германия). Анализ полученных

изображений проводили в базовой программе для получения, обработки и анализа изображений AxioVision, version 4.8.2 (Carl Zeiss). Для каждого пациента анализировали все реснитчатые клетки, попавшие в препарат, в среднем для каждого из них было проанализировано 50 клеток.

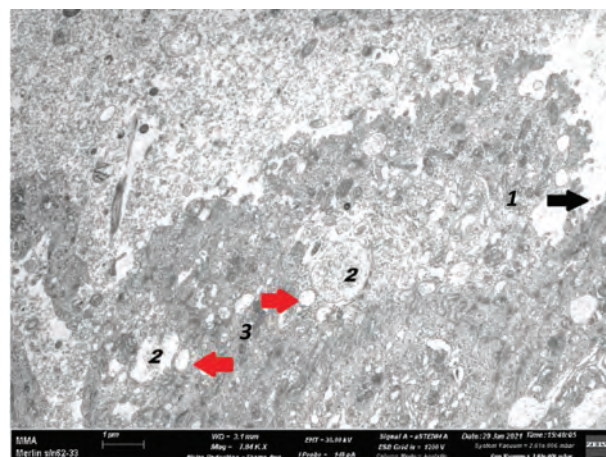
Все полученные результаты анализировались при помощи программ Microsoft Office Excel 2007 и StatSoft STATISTICA 10 Russian Portable 10.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что в отношении выявления SARS-CoV-2 ЭМ принципиально сопоставима с молекулярно генетическими методами (РТ-ПЦР на РНК вируса в мазке из рото-, носоглотки), достоверные различия между этими двумя методами не выявлены ( $p > 0,05$ ). При этом ЭМ позволяет выявить вирус, определить его локализацию (внутри-, внеклеточно), обнаружить признаки жизнедеятельности («зрелость» вирусных частиц, формирование везикул с вирусом), степень воздействия вируса на клетки.

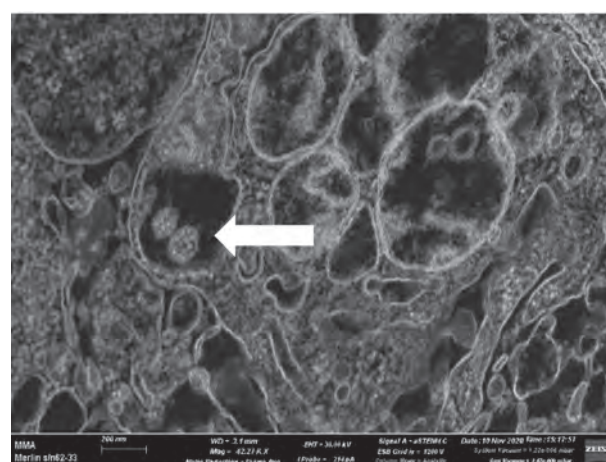
При анализе электронной микроскопии биоптатов слизистой ротоглотки пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию в инapparантной форме ( $n = 3$ ) (рис. 1), не было выявлено отчетливого наличия зрелых вирусных частиц или формирования в цитоплазме эпителиальных клеток гладких везикул, содержащих незрелые вирусные частицы; у 1 пациента ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2 дала положительный результат на 3-и сутки от первого положительного ПЦР-теста (значение цикла РВ-ПЦР — 36,2 СТ); в 2 из 3 биоптатах обнаружены «сомнительные» вирусоподобные структуры внутри везикул в клетках и свободно лежащие вне клеток; во всех биоптатах определялись вакуоли в клетках, в 2 из 3 — вне клеток.

При изучении 15 биоптатов носоглотки пациентов с COVID-19 в форме ОРЗ (8 отобраны в 1-ю неделю заболевания, 4 — во 2-ю, 3 — в 3-ю) выявлены изменения в клетках, характерные для поражения вирусом SARS-CoV-2 (основное — наличие самого вируса в клетке и подтверждение диагноза методом ПЦР, также учитывалось формирование гладких везикул, лейкоцитарная инфильтрация тканей, повреждение эпителиальных клеток, выражающееся в потере ресничек на апикальных поверхностях клеток, апоптозе ядер, накоплении гранул гликопротеина в бокаловидных клетках) [6, 7, 11]. При этом данные изменения чаще обнаруживались в 1-ю неделю заболевания (62,5% биоптатов, 5 из 8,  $\chi^2 = 1,5$ ,  $p > 0,05$  и  $\chi^2 = 0,75$ ,  $p > 0,05$  в сравнении со 2-й и 3-й неделями соответственно), реже — во 2-ю и 3-ю (25%, 1 из 4 и 33,3%, 1 из 3 соответственно). Кроме того, клетки, имеющие характерные изменения, в большем количестве были обнаружены на 1-й неделе заболевания и составили в среднем  $4,6 \pm 0,6$  клетки на один биоптат (23 клетки



**Рис. 1.** Фото (трансмиссионная электронная микроскопия) клеток эпителия ротоглотки у пациентов с инapparантной формой COVID-19: 1 — повреждения в реснитчатых клетках эпителия ротоглотки, выраженные в потере ресничек на апикальной поверхности клеток (черная стрелка), 2 — накопление гранул гликопротеина в бокаловидных клетках, 3 — формирование гладких везикул, не содержащих незрелых вирусных частиц (красная стрелка). Ув.  $\times 7840$ . Контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором нитрата свинца и 1% водным раствором уранил ацетата

в 5 биоптатах), на 2-й и 3-й неделях заболевания — по 4 патологически измененных клетки на 1 биоптат. Кроме того для 1-й недели ОРЗ характерно образование везикул (100% биоптатов, в 4 выявлены вирусные частицы SARS-CoV-2 (рис. 2),  $\chi^2 = 8,0$ ,  $p < 0,01$  и  $\chi^2 = 6,52$ ,  $p < 0,05$  в сравнении со 2-й и 3-й неделями соответственно), при этом на 2-й и 3-й неделях заболевания везикулы выявлялись в 25% и 33,3% соответственно, в них же определялись ви-



**Рис. 2.** Фото (трансмиссионная электронная микроскопия) вирусных частиц SARS-CoV-2 в везикуле в 1-ю неделю заболевания, протекающего в форме ОРЗ. Вирусные частицы SARS-CoV-2 в везикуле (стрелка). Ув.  $\times 42270$ . Контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором нитрата свинца и 1% водным раствором уранил ацетата

русные частицы SARS-CoV-2.

Плотность везикул с вирусом в биоптатах почти в 3 раза выше на 1-й неделе –  $2,8 \pm 1,4$  везикулы на биоптат ( $1,8 \pm 0,8$  везикулы на 1 клетку, имеющую характерные вирус-ассоциированные изменения), чем на 2-й и 3-й неделях, – по 1 везикуле на биоптат (1 везикула на клетку). Концентрация зрелых вирусных частиц в везикулах наибольшая на 1-й неделе заболевания –  $15,2 \pm 2,2$  вирусных частиц на 1 везикулу, чуть ниже во 2-ю неделю – 13 вирусных частиц, наименьшее на 3-й неделе – 10 вирусных частиц. Средняя концентрация вирусных частиц в клетках, в которых выявлены везикулы с вирусом, максимальна на 1-й неделе болезни –  $27,8 \pm 18,6$  вирусных частиц на 1 клетку, на 2-й неделе в среднем выявлено 13 вирусных частиц, а к 3-й неделе – 10 (табл. 1).

Кроме того, обнаружено расположение вирусных частиц свободно в цитоплазме (в 5 из 8 биоптатов на 1-й неделе заболевания, в 2 из 4 на 2-й и в 2 из 3 на 3-й), вирусные частицы в проекции ядра определялись на 3-й неделе заболевания (в 2 из 3), а средняя концентрация вирусных частиц составляла  $5,5 \pm 0,5$  на  $1 \text{ мкм}^2$  в 1 биоптате. Однако следует отметить, что данные о локализации вируса противоречили одному из исследований жизненного цикла SARS-CoV-2 (авторы исследования предлагают идентифицировать вирусные частицы только внутри эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, в секреторных везикулах, а также снаружи клеток) [11], в то же время возможное ядерное расположение вирусных частиц подтверждается другим исследованием [12]. Повреждение клеток и/или признаки катарального воспаления слизистой оболочки носоглотки выявлены у всех пациентов в 1-ю и 2-ю недели заболевания (100%), на 3-й неделе – у 1 из 3 (33,3%,  $\chi^2 = 6,52$ ,  $p < 0,05$  и  $\chi^2 = 3,73$ ,  $p > 0,05$  в сравнении с 1-й и 2-й неделями

соответственно).

При анализе электронной микроскопии 12 биоптатов слизистой носоглотки пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию в форме ВПЛ (7 отобраны в 1-ю неделю заболевания, 2 – в 3-ю неделю, 3 – с 4-й по 6-ю), было установлено, что изменения в клетках реснитчатого эпителия, характерные для поражения SARS-CoV-2, выявлялись только на 1-й неделе заболевания (в 42,9%, в 3 из 7 биоптатах), на 2-й и 3-й неделях изменений обнаружено не было. Также установлено, что в среднем  $3 \pm 1$  клетки имели характерные патологические изменения (9 клеток в 3 биоптатах) на 1 биоптат. Более того, на 4–6-й неделях ВПЛ в 100% биоптатов наблюдалось образование везикул, к 3-й неделе везикулы были выявлены в 1 из 2 биоптатов (50%), при этом вирусные частицы внутри не визуализировались. На 1-й неделе заболевания в 57,1% биоптатов (в 4 из 7,  $\chi^2 = 1,84$ ,  $p > 0,05$  и  $\chi^2 = 0,03$ ,  $p > 0,05$  в сравнении с 4-6-й и 3-й неделями соответственно) обнаруживались везикулы (в 2 из 4 биоптатов внутри везикул определялись вирусные частицы SARS-CoV-2 (рис. 3)). Везикулы с вирусом определялись в 28,6% биоптатов именно в 1-ю неделю (в 2 из 7), плотность везикул с вирусом – по  $1,5 \pm 0,5$  везикул на биоптат и клетку.

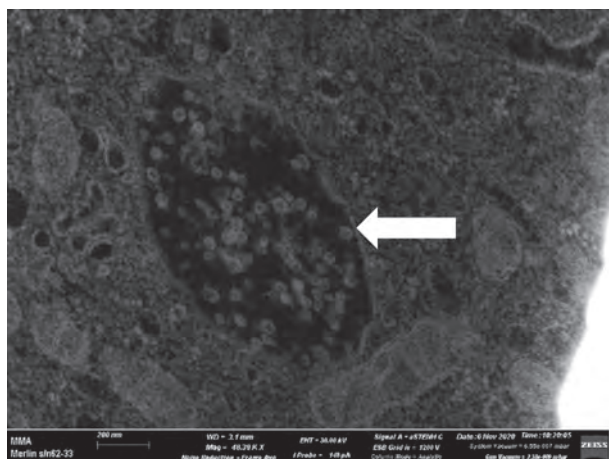
Концентрация вирусных частиц в везикулах составила  $19,3 \pm 11,9$  вирусных частиц на 1 везикулу, а среднее содержание вирусных частиц в клетках, в которых выявлены везикулы с вирусом, –  $29 \pm 14$  вирусных частиц на 1 клетку (табл. 2).

Свободно лежащие в цитоплазме вирусные частицы чаще выявлялись на 4–6-й неделях заболевания (в 2 из 3 биоптатов, 66,7%,  $\chi^2 = 1,27$ ,  $p > 0,05$ ), реже – на 1-й неделе – в 2 из 7 биоптатах, 28,6%, в проекции ядра вирусные частицы определялись только у 1 пациента на 4–6-й неделях заболевания, при этом концентрация вирусных частиц со-

Таблица 1

**Содержание SARS-CoV-2 в клетках слизистой носоглотки в зависимости от периода инфекционного процесса, протекающего в форме ОРЗ**

Периоды заболевания	Количество биоптатов, шт.	Количество биоптатов с гладкими везикулами, шт.	Количество биоптатов с вирусом в везикулах, шт.	Количество биоптатов с вирусом в везикулах, %	Количество везикул, содержащих вирус, шт.	Количество везикул с вирусом, плотн. на 1 биоптат, шт. (M±Se)	Количество клеток, содержащих вирус в везикулах, шт.	Количество везикул с вирусом, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)	Количество вирусных частиц в везикулах, шт.	Количество вирусных частиц в везикулах, плотн. на 1 везик., шт. (M±Se)	Количество вирусных частиц в клетке, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)
ОРЗ 1 неделя	8	8	4	50,0%	11	$2,8 \pm 1,4$	6	$1,8 \pm 0,8$	167	$15,2 \pm 2,2$	$27,8 \pm 18,6$
ОРЗ 2 неделя	4	1	1	25,0%	1	1,0	1	1,0	13	13,0	13,0
ОРЗ 3 неделя	3	1	1	33,3%	1	1,0	1	1,0	10	10,0	10,0



**Рис. 3.** Фото (трансмиссионная электронная микроскопия) вирусных частиц SARS-CoV-2 в везикуле в 1-ю неделю заболевания, протекающего в форме ВПЛ. Вирусные частицы SARS-CoV-2 в везикуле (стрелка). Ув.  $\times 48\,390$ . Режим инверсии. Контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором нитрата свинца и 1% водным раствором уранил ацетата

ставила 1 на 1  $\mu\text{м}^2$  [11, 12].

Повреждение клеток и/или признаки катарального воспаления выявлялись чаще на 1-й неделе заболевания (в 5 из 7 биоптатов, 71,4%,  $\chi^2=0,32$ ,  $p>0,05$  и  $\chi^2=0,02$ ,  $p>0,05$  в сравнении с 3-й и 4–6-й неделями соответственно), чем на 3-й (1 из 2 биоптатов – 50%) и 4–6-й неделях болезни (2 из 3 биоптатов – 66,7%).

Характерные изменения эпителия носоглотки чаще встречались при COVID-19 ОРЗ – в 46,7% биоптатов ( $\chi^2=1,34$ ,  $p>0,05$ ), при ВПЛ – в 25% биоптатов, у пациентов с инаппарантной формой не выявлено отчетливого наличия зрелых вирусных частиц или формирования в цитоплазме эпителиальных клеток гладких везикул (0%), содержащих

вирусные частицы. В то же время при ИП в 2 из 3 биоптатах определялись «сомнительные» структуры внутри везикул в клетках и свободно лежащие вне клеток. При этом ПЦР показала наличие РНК SARS-CoV-2 у ИП в 1 из 3 биоптатов на 3-й день от первого положительного теста ПЦР. При ОРЗ и ВПЛ вирус визуализировался в 33,3% биоптатов, при этом в случае ВПЛ положительный результат ПЦР был только на 1-й неделе заболевания, а при ОРЗ – на 1-й и 2-й неделях.

Наибольшее количество биоптатов с изменениями, характерными для COVID-19, выявлены на 1-й неделе ОРЗ и ВПЛ, меньше – к 3-й неделе, а также на 2-й неделе ОРЗ. Вместе с тем, наибольшая плотность подобных клеток наблюдалась именно на 1-й неделе ОРЗ ( $4,6\pm 0,6$  клетки на биоптат), на 2-й и 3-й неделе плотность была чуть ниже (по 4 клетки на биоптат), минимальная плотность вирус-индуцированных изменений эпителия носоглотки наблюдалась к 1-й неделе ВПЛ ( $3\pm 1$  клетки).

Образование гладких везикул было более характерно для ИП (100%,  $\chi^2=1,38$ ,  $p>0,05$  и  $\chi^2=1,36$ ,  $p>0,05$  в сравнении с ОРЗ и ВПЛ соответственно), при ОРЗ и ВПЛ – 66,7%. В 40% биоптатах при ОРЗ вирусные частицы визуализировались в везикулах, при ВПЛ – в 16,7% ( $\chi^2=1,74$ ,  $p>0,05$ ). Плотность везикул с вирусом на один биоптат распределялась похожим образом – наибольшая при ОРЗ ( $2,2\pm 1$  везикулы на один биоптат,  $1,6\pm 0,6$  везикулы на клетку, имеющую характерные изменения), наименьшая – при ВПЛ (по  $1,5\pm 0,5$ ) везикулы на биоптат и клетку соответственно) (табл. 3). Плотность везикул с вирусом в биоптатах была максимальна в 1-ю неделю ОРЗ ( $2,8\pm 1,4$  везикулы), почти в 2 раза ниже в 1-ю неделю при ВПЛ ( $1,5\pm 0,5$  везикулы), минимальна на 2-й и 3-й неделе ОРЗ (по 1 везикуле). Количество везикул, содержащих вирус, на 1 клетку, имеющую характерные измене-

Таблица 2

**Содержание SARS-CoV-2 в клетках реснитчатого эпителия носоглотки в различные периоды инфекционного процесса, протекающего в форме ВПЛ**

Периоды заболевания	Количество биоптатов, шт.	Количество биоптатов с гладкими везикулами, шт.	Количество биоптатов с вирусом в везикулах, шт.	Количество биоптатов с вирусом в везикулах, %	Количество везикул, содержащих вирус, шт.	Количество везикул с вирусом, плотн. на 1 биоптат, шт. (M±Se)	Количество клеток, содержащих вирус в везикулах, шт.	Количество везикул с вирусом, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)	Количество вирусных частиц в везикулах, шт.	Количество вирусных частиц в везикулах, плотн. на 1 везикул, шт. (M±Se)	Количество вирусных частиц в клетке, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)
ВПЛ неделя 1	7	4	2	28,6%	3	$1,5\pm 0,5$	2	$1,5\pm 0,5$	58	$19,3\pm 11,9$	$29\pm 14$
ВПЛ неделя 3	2	1	0	0,0%	0	0	0	0	0	0	0
ВПЛ недели 4-6	3	3	0	0,0%	0	0	0	0	0	0	0

ния, распределилось следующим образом:  $1,8 \pm 0,8$  везикул на 1-й неделе ОРЗ,  $1,5 \pm 0,5$  – на 1-й неделе ВПЛ, по 1 везикуле на клетку ко 2-й и 3-й неделе ОРЗ.

Наибольшая плотность вируса в везикулах (учитывались только те везикулы, в которых четко определялся вирус) [11] была при ВПЛ –  $19,3 \pm 11,9$  вирусных частиц на 1 везикулу (что соответствовало 1-й неделе заболевания), при ОРЗ –  $14,6 \pm 1,9$  вирусных частиц (см. табл. 3).

Плотность вирусных частиц, локализованных в везикулах, на 1 клетку, в которой визуализированы везикулы с вирусом, достигала максимальных значений при ВПЛ в начальном периоде заболевания –  $29 \pm 14$  вирусных частиц, а при ОРЗ –  $23,8 \pm 13,9$ ,  $p > 0,05$  (см. табл. 3).

В цитоплазме вирусные частицы наиболее часто выявлялись при ОРЗ (66,7%), при ВПЛ – в 41,7%, ( $\chi^2 = 1,69$ ,  $p > 0,05$ ), в проекции ядра вирус визуализировался только при длительной персистенции на 17-й и 19-й дни заболевания в форме ОРЗ и на 37-й день при ВПЛ [11, 12].

Повреждение клеток и/или признаки катарального воспаления наиболее характерны для коронавирусной инфекции, протекающей в форме ОРЗ (86,7%,  $\chi^2 = 1,54$ ,  $p > 0,05$  и  $\chi^2 = 0,72$ ,  $p > 0,05$  в сравнении с ВПЛ и ИП соответственно), при ВПЛ и ИП – 66,7%.

### Заключение

При всех клинических формах COVID-19 в клетках наблюдались признаки вирусного поражения. Вместе с тем, при интраназальной форме вирусные частицы выявлены не были, при ОРЗ вирус определялся в начальном периоде, периоде разгара и реконвалесценции, в случае ВПЛ – только в начальном периоде, однако именно при этой форме заболевания визуализировалась наибольшая концентрация вирусных частиц SARS-CoV-2 в везикулах и в клетках в целом.

Полученные данные могут говорить о том, что

за счет активного поражения клеток, формирования везикул с вирусом и последующего его выхода из клеток, то есть формирования классических изменений, характерных для SARS-CoV-2, опосредуется локализованная форма инфекции, а для формирования генерализованной формы (вирусного поражения легких), вероятно, вирус должен накопиться в высоких концентрациях в везикулах. После этого при слиянии гладких везикул с плазматической мембраной происходит одномоментное высвобождение значительно большего количества вирионов (в сравнении с ОРЗ) из клетки, что способствует высокой вероятности гематогенной диссеминации вируса. Локализация вируса вне везикул в клетке требует дальнейшего исследования.

### Литература

1. Львов, Д.К. Медицинская вирусология / Д.К. Львов [и др.]. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 656 с.
2. Щелканов, М.Ю. История изучения и современная классификация коронавирусов (nidovirales: coronaviridae) / М.Ю. Щелканов [и др.] // Журнал «Инфекция и иммунитет». – 2020. – Т. 10, № 2. – С. 221 – 246.
3. Щелканов, М.Ю. COVID-19: этиология, клиника, лечение / М.Ю. Щелканов [и др.] // Журнал «Инфекция и иммунитет». – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 421 – 445.
4. Авдеев, С.Н. Временные методические рекомендации профилактики, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), Версия 10 (08.02.2021) / С.Н. Авдеев [и др.]. – М.: МЗ РФ, 2021. – 260 с.
5. Gorbalenya, A.E. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A.E. Gorbalenya, S.C. Baker, R.S. Baric [et al.] // Nature Microbiology – 2020. – №5. – P. 536 – 544.
6. Belhaouari D.B. The Strengths of Scanning Electron Microscopy in Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle / D.B. Belhaouari, A. Fontanini, J.P. Baudoin [et al.] // Frontiers in Microbiology – 2020. – Vol. 11, №2004. – P. 1 – 11.
7. Qinfen Z. The Life Cycle of SARS Coronavirus in Vero E6 Cells / Z. Qinfen, C. Jinming, H. Xiaojun [et al.] // Journal of Medical Virology – 2004. – Vol.73, №3. – P. 332-337.
8. Савушкина, О.И. Функциональные нарушения системы дыхания в период раннего выздоровления после COVID-19 / О.И. Савушкина [и др.] // Медицинский алфавит. – 2020. – № 25. – С. 7 – 12.

Таблица 3

### Содержание SARS-CoV-2 в клетках реснитчатого эпителия носоглотки в зависимости от клинических форм COVID-19

Формы заболевания	Кол-во биоптатов, шт.	Кол-во биоптатов с гладкими везикулами, шт.	Кол-во биоптатов с вирусом в везикулах, шт.	Биоптаты с вирусом в везикулах, %	Кол-во везикул, содержащих вирус, шт.	Кол-во везикул с вирусом, плотн. на 1 биоптат, шт. (M±Se)	Кол-во клеток, содержащих вирус в везикулах, шт.	Кол-во везикул с вирусом, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)	Кол-во вирусных частиц в везикулах, шт.	Кол-во вирусных частиц в везикулах, плотн. на 1 везикул, шт. (M±Se)	Кол-во вирусных частиц в клетке, плотн. на 1 клетку, шт. (M±Se)
ИП	3	3	0	0%	0	0	0	0	0	0	0
ОРЗ	15	10	6	40,0%	13	2,2±1	8	1,6±0,6	190	14,6±1,9	23,8±13,9
ВПЛ	12	8	2	16,7%	3	1,5±0,5	2	1,5±0,5	58	19,3±11,9	29,0±14

9. Салухов, В.В. Актуальные вопросы диагностики, обследования и лечения больных с COVID-19-ассоциированной пневмонией в различных странах и континентах / В.В. Салухов [и др.] // Медицинский совет. — 2020. — № 21. — С. 96–102.

10. Тришкин, Д.В. Стандарт диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у военнослужащих Вооруженных Сил Российской Федерации / Д.В. Тришкин [и др.]. — М.: ГВМУ, 2020. — 54 с.

11. Akilesh S. Characterizing Viral Infection by Electron Microscopy Lessons from the Coronavirus Disease 2019 Pandemic / S. Akilesh, R.F. Nicosia, C.E. Alpers [et al.] // The American Journal of Pathology — 2021. — Vol. 191, №2. — P. 222–227.

12. Wu K. RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Localization to Host Mitochondria and Nucleolus / K. Wu, J. Zou, H.Y. Chang [et al.] // Cell Systems — 2020. — Vol. 11, №1. — P. 102–108.

### References

1. L'vov, D.K. Meditsinskaya virusologiya / D.K. L'vov, L.M. Alimbarova, S.V. Al'khovskiy [et al.] // Moscow: ООО «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo», 2008. — 656 p.

2. Shchelkanov M.Yu. History of investigation and current classification of coronaviruses (nidovirales: coronaviridae) / M.Yu. Shchelkanov, A.Yu. Popova, V.G. Dedkov [et al.] // Russian Journal of Infection and Immunity — 2020. — Vol. 10, № 2. — P. 221–246.

3. Shchelkanov M.Yu. COVID-19: etiology, clinical picture, treatment / M.Yu. Shchelkanov, L.V. Kolobukhina, O.A. Burgasova [et al.] // Russian Journal of Infection and Immunity — 2020. -Vol. 10, № 3. — P. 421–445.

4. Avdeev S.N. Vremennye metodicheskie rekomendatsii profilaktika, diagnostika i lechenie novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19), Versiya 10 (08.02.2021) S.N. Avdeev, L.V.

Adamyan, E.I. Alekseeva [et al.] // Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2021. — 260 p.

5. Gorbalenya, A.E. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A.E. Gorbalenya, S.C. Baker, R.S. Baric [et al.] // Nature Microbiology — 2020. — №5. — P. 536–544.

6. Belhaouari D.B. The Strengths of Scanning Electron Microscopy in Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle / D.B. Belhaouari, A. Fontanini, J.P. Baudoin [et al.] // Frontiers in Microbiology — 2020. — Vol. 11, №2004. — P. 1–11.

7. Qinfen Z. The Life Cycle of SARS Coronavirus in Vero E6 Cells / Z. Qinfen, C. Jinming, H. Xiaojun [et al.] // Journal of Medical Virology — 2004. — Vol.73, №3. — P. 332-337.

8. Savushkina O.I. Pulmonary function after COVID-19 in early convalescence phase / O.I. Savushkina, A.V. Chernyak, E.V. Kryukov [et al.] // Medical alphabet — 2020. — № 25. — P. 7–12.

9. Salukhov V.V. Topical issues of diagnostics, examination and treatment of patients with COVID-19-associated pneumonia in different countries and continents / V.V. Salukhov, M.A. Kharitonov, E.V. Kryukov [et al.] // Meditsinskiy sovet — 2020. — № 21. — P. 96–102.

10. Trishkin D.V. Standart diagnostiki i lecheniya novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19) u voennosluzhashchikh Vooruzhennykh Sil Rossiyskoy Federatsii / D.V. Trishkin, A.A. Sergoventsev, E.V. Kryukov [et al.] // Moscow: GVMU, 2020. — 54 p.

11. Akilesh S. Characterizing Viral Infection by Electron Microscopy Lessons from the Coronavirus Disease 2019 Pandemic / S. Akilesh, R.F. Nicosia, C.E. Alpers [et al.] // The American Journal of Pathology — 2021. — Vol. 191, №2. — P. 222–227.

12. Wu K. RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Localization to Host Mitochondria and Nucleolus / K. Wu, J. Zou, H.Y. Chang [et al.] // Cell Systems — 2020. — Vol. 11, №1. — P. 102–108.

### Авторский коллектив:

*Крюков Евгений Владимирович* — начальник Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; тел.: 8(812) 292-32-66

*Жганов Константин Валерьевич* — начальник кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; тел.: +7-921-939-82-95, e-mail: zhdanovkv@rambler.ru

*Козлов Константин Вагимович* — профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., доцент; тел.: +7-921-657-27-49, e-mail: kosttiak@mail.ru

*Кравцов Вячеслав Юрьевич* — заведующий кафедры биологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.б.н., профессор; тел.: 8(812)292-32-55, e-mail: kvyspb@rambler.ru

*Мальцев Олег Вениаминович* — старший преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, к.м.н.; тел.: +7-921-395-37-12, e-mail: olegdzein@mail.ru

*Сукачев Виталий Сергеевич* — старший преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, к.м.н.; тел.: +7-911-763-72-29, e-mail: dr.sukachev@gmail.com

*Миклуш Пантелей Игоревич* — слушатель ординатуры по специальности «Инфекционные болезни» Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; тел.: +7-982-380-41-66, e-mail: www.pantik.ru@mail.ru

*Соколова Маргарита Олеговна* — младший научный сотрудник НИЛ (военной терапии) НИО (экспериментальной медицины) НИЦ Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; тел.: +7-911-126-52-15, e-mail: sokolova.rita@gmail.com



*Шарабханов Валериан Валерьевич* — адъюнкт кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; тел.: +7-909-018-18-86, e-mail: haes87@mail.ru

*Глушаков Руслан Иванович* — начальник НИО (медико-биологических исследований) НИЦ Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, к.м.н.; тел.: +7-921-885-61-47, e-mail: glushakovruslan@gmail.com

*Дворянчиков Владимир Владимирович* — начальник кафедры оториноларингологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)292-33-42, e-mail: lor\_vma@mail.ru

*Ачба Рагион Ружанович* — преподаватель кафедры оториноларингологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; тел.: +7-965-003-11-55, e-mail: Doktor-achba@mail.ru

*Тришкин Дмитрий Вячеславович* — начальник Главного военно-медицинского управления, к.м.н., заслуженный работник здравоохранения РФ, действительный государственный советник Российской Федерации 2 класса; тел.: 8(495)696-86-33

*Азаров Игорь Иванович* — главный государственный санитарный врач МО РФ, к.м.н.; тел.: 8(495)696-86-33