



Иммуногистохимическая и ультраструктурная визуализация коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких, лимфатических узлов и почек умерших пациентов

А. А. ОДИЛОВ¹, А. В. ВОЛКОВ¹, А. О. АБДУЛЛАЕВ³, А. К. ШАДМАНОВ³, А. Б. СУДАРИКОВ²,
И. И. БАБИЧЕНКО¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, РФ

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, Москва, РФ

³ Ташкентская медицинская академия, г. Ташкент, Республика Узбекистан

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: иммуногистохимическая и электронно-микроскопическая визуализация коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких, лимфатических узлов и почек пациентов, умерших от COVID-19.

Материалы и методы. Для иммуногистохимических исследований в качестве материала использованы срезы фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей легких, лимфатических узлов и почек пациентов, умерших от COVID-19. Количественная оценка уровня вирусной нагрузки SARS-CoV-2 проведена с использованием оригинального способа кПЦР РВ и рассчитана по формуле: число копий SARS-CoV-2/число копий ABL1 × 100, выражена отношением истинного числа копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий кДНК гена ABL1. Для морфологических исследований взяты нативные образцы тканей легких, лимфатических узлов и почек.

Результаты. При иммуногистохимическом и электронно-микроскопическом исследовании частицы коронавируса SARS-CoV-2 были обнаружены в цитоплазме эндотелиальных клеток аэрогематического барьера легких, сосудистого клубочка почек, в цитоплазме макрофагов лимфатического узла, а также в цитоплазме лимфоцитов в просвете капилляров легких.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, кПЦР РВ, иммуногистохимия, электронная микроскопия.

Для цитирования: Одилов А. А., Волков А. В., Абдуллаев А. О., Шадманов А. К., Судариков А. Б., Бабиченко И. И. Иммуногистохимическая и ультраструктурная визуализация коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких, лимфатических узлов и почек умерших пациентов // Туберкулез и болезни лёгких. – 2023. – Т. 101, № 4. – С. 57–65. <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-4-57-65>

Immunohistochemical and Ultrastructural Imaging of the SARS-CoV-2 Coronavirus in Lung, Lymph Node, and Kidney Tissues of Deceased Patients

А. А. ОДИЛОВ¹, А. В. ВОЛКОВ¹, А. О. АБДУЛЛАЕВ³, А. К. ШАДМАНОВ³, А. Б. СУДАРИКОВ²,
И. И. БАБИЧЕНКО¹

¹ RUDN University, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Hematology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

³ Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan Republic

ABSTRACT

The objective: immunohistochemical and electron microscopic imaging of the SARS-CoV-2 coronavirus in lung, lymph nodes and kidney tissues of patients who died of COVID-19.

Subjects and Methods. For immunohistochemical tests, specimens of sections of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues of the lungs, lymph nodes and kidneys of patients who died from COVID-19 were used. Quantitative assessment of the SARS-CoV-2 viral load level was carried by the original RT qPCR and calculated by the formula: SARS-CoV-2 copy number/ABL1 × 100 copies, expressed as the ratio of the true number of SARS-CoV-2 cDNA copies per 100 copies cDNA of the ABL1 gene. For morphological tests, samples of native lung, lymph node and kidney tissues were taken.

Results. Immunohistochemical and electron microscopic tests revealed particles of the SARS-CoV-2 coronavirus in the cytoplasm of endothelial cells of air-blood barrier of the lungs, the vascular glomerulus of the kidneys, in the cytoplasm of macrophages of the lymph node, and also in cytoplasm of lymphocytes in the lumen of lung capillaries.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, RT qPCR, immunohistochemistry, electron microscopy.

For citations: Odilov A. A., Volkov A. V., Abdullaev A. O., Shadmanov A. K., Sudarikov A. B., Babichenko I. I. Immunohistochemical and ultrastructural imaging of the SARS-CoV-2 coronavirus in lung, lymph node, and kidney tissues of deceased patients. *Tuberculosis and Lung Diseases*, – 2023. Vol. 101, no. 4, pp. 57–65 (In Russ.) <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-4-57-65>

Для корреспонденции:
Одилов Акмалжон Адхамжонович
E-mail: a.odilov.tma@gmail.com

Correspondence:
Akmalzhan A. Odilov
Email: a.odilov.tma@gmail.com

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) широко используется при изучении морфологии различных вирусов и инициированных ими ультраструктурных нарушений тканей различных органов [8]. Классификация вирусов строится на основе изучения их ультраструктурной морфологии при помощи ТЭМ [2].

Коронавирусы впервые были визуализированы с помощью ТЭМ June D. Almeida J. D. et al. в 1967 году [3], а название свое получили благодаря S-белкам, имеющимся на поверхности вируса, которые в электронных микрофотографиях напоминают солнечную корону [6].

Многочисленные ТЭМ-исследования, проведенные на культурах клеток, инфицированных SARS-CoV-2, позволили описать морфологию этого коронавируса. Согласно этим исследованиям, SARS-CoV-2 представляет собой частицу сферической формы диаметром 60–140 нм. Наружная поверхность вирусной оболочки покрыта «шипами» длиной до 23 нм, представляющими собой S-белок, необходимый для взаимодействия с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2). Внутри коронавирусной частицы в виде множественных мелкогранулярных структур диаметром 12 нм определяется электронно-плотный NC белок [4, 11].

В настоящее время опубликовано большое число работ, посвященных электронно-микроскопической визуализации частиц коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких [5, 16], верхних дыхательных путей [17], сердца [19], почек, печени [22], кожи [7], кишечника [5], плаценты [18] пациентов с COVID-19. По данным ТЭМ, SARS-CoV-2 обладает тропизмом к следующим клеткам: эпителиоцитам слизистой оболочки трахеи, альвеолоцитам I и II типа, энтероцитам кишечника [5], эпителиальным клеткам канальцев и подоцитам почек, кардиомиоцитам [19], а также к эндотелиальным клеткам кровеносных сосудов различных органов.

При этом среди специалистов, занимающихся электронно-микроскопической визуализацией SARS-CoV-2, имеются некоторые разногласия [12, 13], которые, вероятно, могли быть вызваны сложностью электронно-микроскопической идентификации частиц SARS-CoV-2. В аутопсийном материале наряду с вирус-ассоциированными субклеточными изменениями присутствуют признаки посмертной аутолитической деструкции, вследствие чего получается стертая ультраструктурная картина [9, 14], отличная от описанной при исследованиях на культурах клеток.

Цель исследования

ТЭМ-визуализация коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких и других органов у пациентов, умерших от COVID-19.

Для исследования использованы фиксированные в формалине и заключенные в парафин образцы тканей головного мозга, легких, сердца, печени, селезенки, почек и трахеобронхиальных лимфатических узлов 2 пациентов, умерших от COVID-19. Согласно 9-й версии Российских временных методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) от 26.10.2020, действовавшим на момент проведения исследования, образцы тканей после фиксации в 10-процентном нейтральном забуференном растворе формалина в течение не менее 24 часов считаются биологически безопасными. Исследование было одобрено местным Медицинским этическим комитетом (протокол № 28/2021) и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 2013 года.

Выделение РНК осуществлено из 10–12 срезов толщиной 3–10 мкм из FFPE блока тканей (FFPE – фиксированные в формалине парафинизированные образцы) головного мозга, легких, сердца, почек, печени, селезенки и лимфатических узлов и выполнено с использованием набора реагентов для выделения РНК из парафинизированных тканей PureLink™ FFPE («ThermoFisherScientific», США) и innuPREP 578FFPE total RNA Kit («AnalytikJena GmbH», Германия) согласно инструкции производителя. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) в объеме 20 мкл проведена реакция обратной транскрипции с использованием 10 мкл раствора РНК и набора реагентов «Реверта-L» («Интерлабсервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Количественная мультиплексная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ) и способ расчета вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 относительно кривых серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-Teasy (Promega, USA) с ORF1ab-участком кДНК SARS-CoV-2 и человеческой мРНК гена ABL1 были описаны ранее в работе Abdullaev A., Odilov A., Ershler M. et al. *Viral Load and Patterns of SARS-CoV-2 Dissemination to the Lungs, Mediastinal Lymph Nodes, and Spleen of Patients with COVID-19 Associated Lymphopenia // Viruses.* – 2021. – № 7 (13).

Для иммуногистохимического исследования из блоков, приготовленных для гистологического исследования, были сделаны серийные срезы толщиной 3 мкм и монтированы на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием первичных коммерческих моноклональных антител (МкАТ) против S- (spike) белков SARS-CoV-2 (клон 1A9) производства GeneTex, Inc. (США) посредством усиления сигнала через мультимерную систему детекции BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc. Innovation Park Drive Tucson, AZ, USA).

Для ТЭМ-исследования нативные образцы легких, лимфатических узлов и почек фиксировали при +4 в 4-процентном растворе глutarового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) и дофиксировали при +4 в 1% растворе тетраоксида осмия в течение 2–3 часов. После стандартной проводки в спиртах на стадии 70-процентного этанола образцы тканей контрастировали в уранилацетате в течение ночи, обезвоживали в ацетоне и заключали в эпон. Из заключенных в эпон тканевых блоков получали ультратонкие срезы, которые переносили на сеточки и подвергали дополнительному контрастированию уранилацетатом и цитратом свинца по Reynolds (1963). Срезы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL 1400.

Результаты исследования

Случай 24. Женщина, 76 лет. Поступила в стационар с диагнозом: коронавирусная инфекция COVID-19 (U07.1), осложненная внебольничной двусторонней полисегментарной пневмонией. Через три дня была зафиксирована смерть пациентки от дыхательной недостаточности 2-й степени, отека легких и отека головного мозга.

Из кусочков ткани легких, сердца, почки, печени, селезенки и трахеобронхиального лимфатического узла были подготовлены срезы, выделена РНК, получена кДНК путем реакции обратной транскрипции и проведена кПЦР РВ, результаты которой представлены на рис. 1.

Истинные значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 и ABL1 в образцах из передне-верхней и задне-нижней зоны левого и правого легких, сердца, почки, печени, селезенки и лимфатического узла пациента № 24 рассчитаны относительно стандартной кривой серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-T Easy. Согласно формуле $NSARS-CoV-2/NABL1 \times 100$ уровень ВН SARS-CoV-2 составил в левом и правом легких 171 211, 17 787 и 21752, 426116 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1 соответственно. Средняя ВН была равна 159216 кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1. Уровень ВН SARS-CoV-2 в сердце составил 2418, в почке – 1291, в печени – 0, в селезенке – 551, в лимфатическом узле – 11586 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1.

Случай 26. Женщина, 93 года. Была доставлена в стационар по экстренным показаниям и в связи с тяжестью состояния госпитализирована в ОРИТ с диагнозом «Коронавирусная инфекция COVID-19 (U07.1), осложненная внебольничной субтотальной двусторонней пневмонией». Через 7 дней была зафиксирована смерть пациентки от осложнений основного заболевания: субтотальной двусторонней полисегментарной пневмонии с геморрагическим компонентом, ишемического инфаркта правого полушария головного мозга, выраженного отека головного мозга и легких.

Из кусочков ткани легких, сердца, почки, печени, селезенки и трахеобронхиального лимфатического узла были подготовлены срезы, выделена РНК, по-

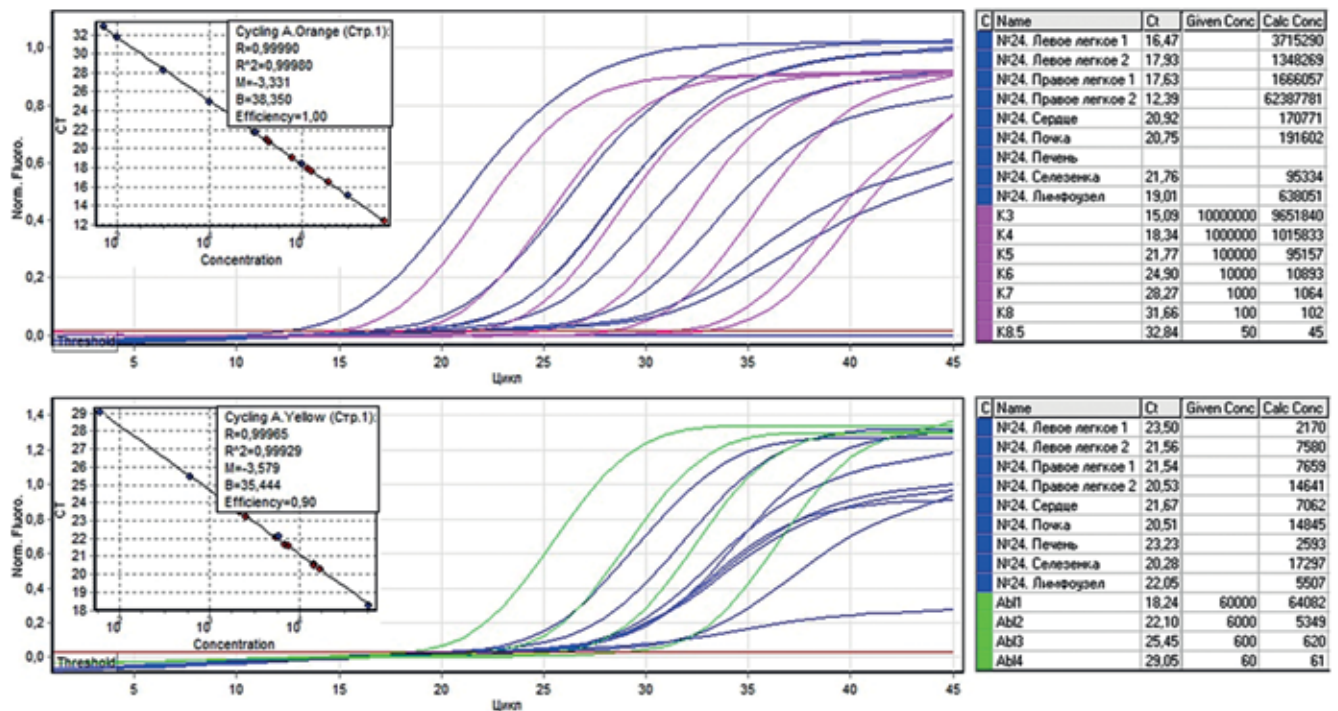


Рис. 1. Значения пороговых циклов (Ct), концентрации серийных разведений плазмид pGEM®-T Easy, значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 (A) и ABL1 (B), а также графические кривые кПЦР РВ пациента № 24
Fig. 1. Threshold cycle (Ct) values, concentration of serial dilutions of pGEM®-T Easy plasmids, SARS-CoV-2 (A) and ABL1 (B) cDNA copies, and RT qPCR curves of Patient 24

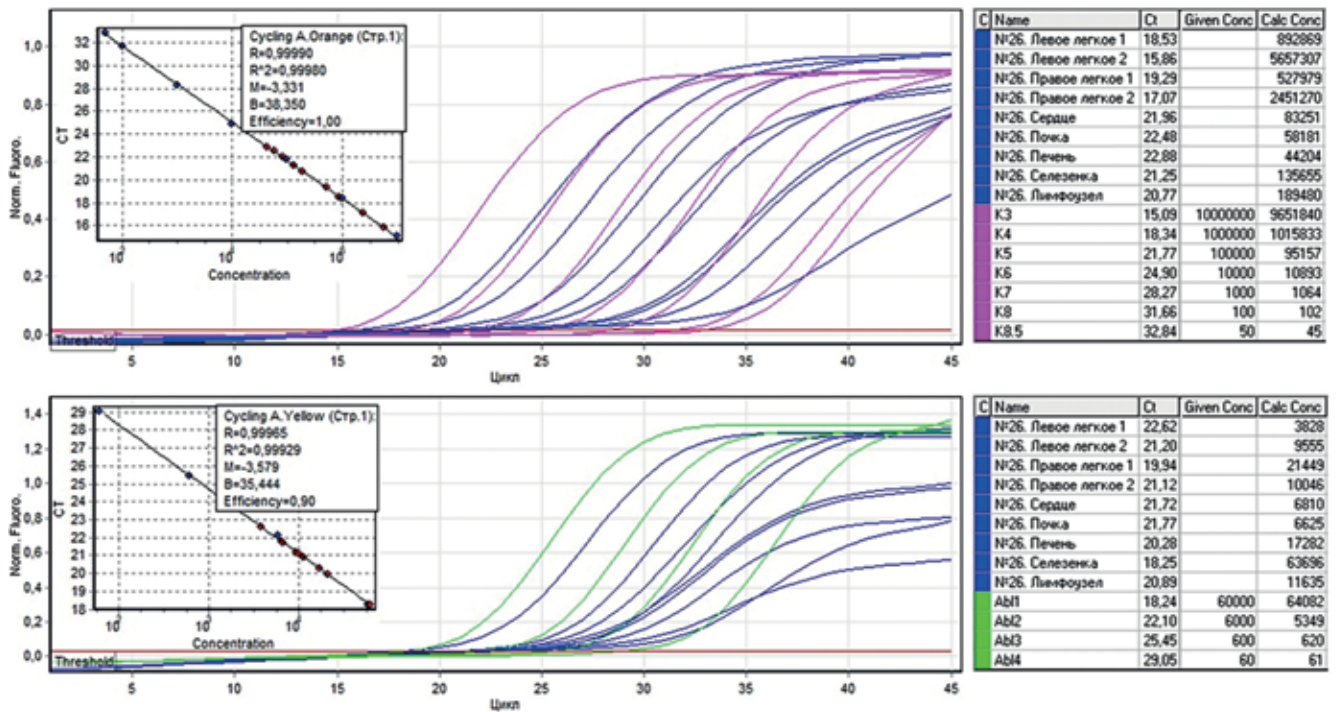


Рис. 2. Значения пороговых циклов (Ct), концентрации серийных разведений плазмид pGEM®-T Easy, значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 (А) и ABL1 (В), а также графические кривые кПЦР РВ пациента № 26. Истинные значения количества копий кДНК SARS-CoV-2 и ABL1 в образцах из передне-верхней и задне-нижней зоны левого и правого легких, сердца, почек, печени, селезенки и лимфатического узла пациента № 26 рассчитаны относительно стандартной кривой серийных разведений плазмидного вектора pGEM®-T Easy. Согласно формуле $NSARS-CoV-2/NABL1 \times 100$ уровень ВН SARS-CoV-2 составил в левом и правом легких 23325, 59208 и 2462, 24400 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1 соответственно. Средняя ВН была равна 27349 кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1. Уровень ВН SARS-CoV-2 в сердце составил 1222, в почке – 878, в печени – 256, в селезенке – 213, в лимфатическом узле – 1629 копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий ABL1

Fig. 2. Threshold cycle (Ct) values, concentration of serial dilutions of pGEM®-T Easy plasmids, SARS-CoV-2 (A) and ABL1 (B) cDNA copies, and RT qPCR curves of Patient 26. The true copy numbers of SARS-CoV-2 and ABL1 cDNA in samples from anterior-superior and posterior-inferior zones of the left and right lungs, heart, kidneys, liver, spleen and lymph node of Patient 26 were calculated relative to the standard curve of serial dilutions of the plasmid vector pGEM®-T Easy. According to the $NSARS-CoV-2/NABL1 \times 100$ formula, the SARS-CoV-2 VL level in the left and right lungs was 23325, 59208 and 2462, 24400 SARS-CoV-2 cDNA copies per 100 ABL1 copies, respectively. The mean VL was 27349 SARS-CoV-2 cDNA per 100 copies of ABL1. The level of VL of SARS-CoV-2 in the heart was 1222, in the kidney - 878, in the liver - 256, in the spleen - 213, and in the lymph node - 1629 SARS-CoV-2 cDNA copies per 100 copies of ABL1

лучена кДНК путем реакции обратной транскрипции и проведена кПЦР РВ, результаты которой представлены на рис. 2.

При гистологическом исследовании в легких преобладали признаки экссудативной фазы диффузного альвеолярного повреждения (ДАП). Обнаружены признаки внутриальвеолярного отека с фибрином в просвете альвеол, гиалиновые мембраны различной степени выраженности, выстилающие контуры альвеол, десквамация бронхиолярного и альвеолярного эпителия, единичные макрофаги и лимфоциты в полости альвеол (рис. 3А). Наблюдались полнокровие и сладжи в сосудах с очагами кровоизлияний (рис. 3В-С). Для мелких сосудов были характерны тромбозы и периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация (рис. 3Д).

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ-исследование) тканей легких с использованием МкАТ против S-белка SARS-CoV-2 выявило диффузное положительное окрашивание цитоплазмы альвео-

лоцитов, альвеолярных макрофагов и мультядерных синцитиальных клеток, оно имелось в фокусах внутриальвеолярного отека (красные звездочки) и гиалиновых мембранах (рис. 4А-С). Иммунореактивность к анти-S МкАТ также обнаруживалась в единичных клетках частично десквамированного призматического эпителия бронхиол (рис. 4Д). При ИГХ-исследовании ткани лимфатических узлов положительная реакция к анти-SARS-CoV-2 антителам была выявлена исключительно в клетках расширенных лимфоидных синусов (рис. 4Е). Иммунореактивность к анти-S SARS-CoV-2 МкАТ была также выявлена в клетках частично некротизированного канальцевого эпителия почек (рис. 4Ф).

Электронная микроскопия

При ТЭМ-исследовании ткани легких частицы коронавируса SARS-CoV-2 были обнаружены в цитоплазме эндотелиальной клетки участка аэрогема-

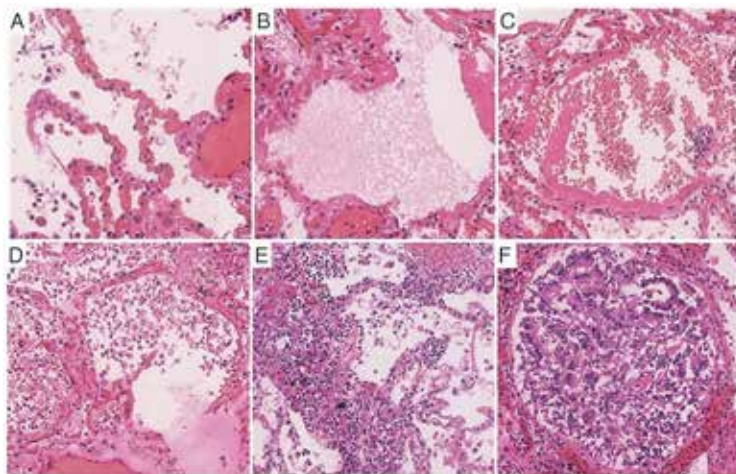


Рис. 3. Гистологическая картина легких с признаками экссудативной фазы ДАП. А. Полнокровие сосудов легких и стаз капилляров межальвеолярных перегородок, внутриальвеолярный клеточный детрит, $\times 300$; В. Внутриальвеолярный отек и гиалиновые мембраны, $\times 300$; С. Гиалиновые мембраны и внутриальвеолярные экстравазаты, $\times 200$; D. Полость альвеол заполнена клеточными элементами и белковым выпотом, $\times 200$; E. Межальвеолярные перегородки инфильтрированы лимфоцитами, $\times 200$; F. Просвет бронха заполнен десквамированным бронхиолярным эпителием, $\times 200$. Окраска гематоксилин-эозин

Fig. 3. Histological picture of the lungs with signs of the exudative phase of diffuse alveolar damage.

- A. Plethora of pulmonary vessels and stasis of capillaries of interalveolar septa, intraalveolar cellular detritus, $\times 300$;
 B. Intraalveolar edema and hyaline membranes, $\times 300$;
 C. Hyaline membranes and intraalveolar extravasates, $\times 200$;
 D. The cavity of the alveoli is filled with cellular elements and protein exudate, $\times 200$;
 E. Interalveolar septa are infiltrated with lymphocytes, $\times 200$;
 F. Bronchial lumen is filled with desquamated bronchiolar epithelium, $\times 200$.
 Staining with hematoxylin-eosin

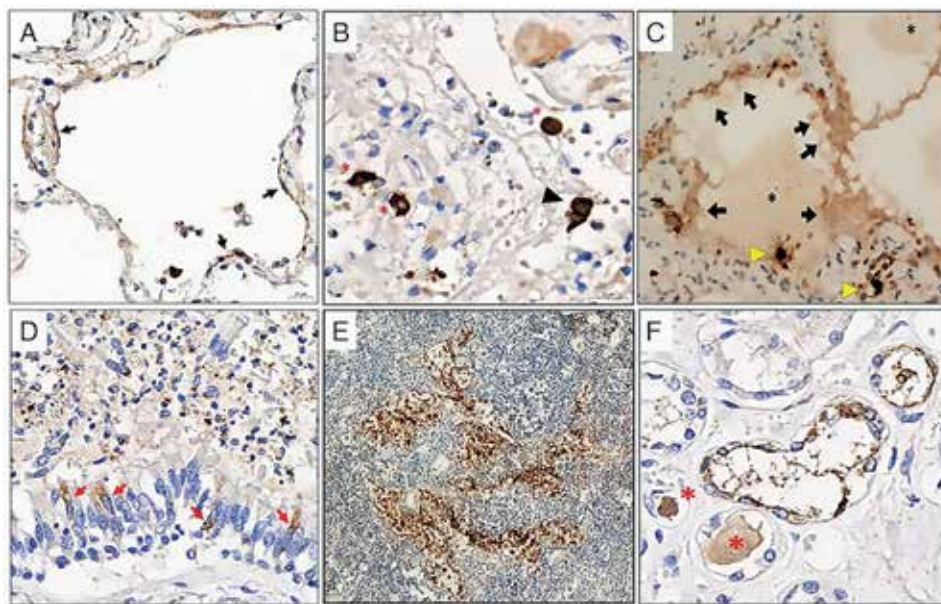


Рис. 4. Иммуно-реактивность к анти-SARS-CoV-2 антителам. А. Яркая положительная реакция в альвеолоцитах I типа с уплощенным ядром и тонкой цитоплазмой, выстилающих полость альвеол (черные стрелки), $\times 400$; В. Яркая положительная реакция в цитоплазме альвеолярных макрофагов (красные звездочки) и мультинуклеарной синцитиальной клетки (черный указатель), $\times 400$; С. Положительное окрашивание в фокусах

внутриальвеолярного отека (черная звездочка) и гиалиновых мембранах (стрелки), а также яркая положительная реакция в цитоплазме единичных крупных клеток (желтый указатель), $\times 100$; D. Слабая положительная реакция в цитоплазме единичных клеток цилиндрического эпителия бронхов (красные стрелки), а также отдельных элементов клеточного детрита, заполнившего просвет бронхов, $\times 400$; E. Положительная реакция в цитоплазме гиперплазированных гистиоцитов медуллярных лимфоидных синусов, $\times 100$; F. Положительное окрашивание клеток извитых канальцев почек и гомогенного белкового содержимого в просвете канальцев (красные звездочки), $\times 400$. Окраска ДАБ-гематоксилином Майера

Fig. 4. Immunoreactivity to anti-SARS-CoV-2 antibodies.

- A. A bright positive reaction in type I alveolar cells with a flattened nucleus and thin cytoplasm lining the alveolar cavity (black arrows), $\times 400$;
 B. An expressed positive reaction in cytoplasm of alveolar macrophages (red asterisks) and multinuclear syncytial cell (black pointer), $\times 400$;
 C. Positive staining in foci of intraalveolar edema (black asterisk) and hyaline membranes (arrows), as well as a bright positive reaction in cytoplasm of single large cells (yellow pointer), $\times 100$;
 D. A weak positive reaction in cytoplasm of single cells of the cylindrical epithelium of the bronchi (red arrows), as well as individual elements of cellular detritus that filled the bronchial lumen, $\times 400$;
 E. Positive reaction in cytoplasm of hyperplastic histiocytes of medullary lymphoid sinuses, $\times 100$;
 F. Positive staining of kidney convoluted tubules kidneys and homogeneous protein content in tubule lumen (red asterisk), $\times 400$.
 Mayer's DAB-hematoxylin staining

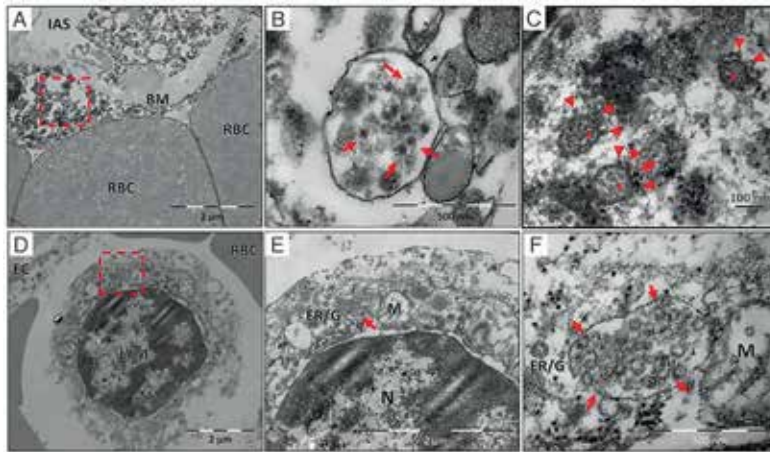


Рис. 5. Электронная микрофотография ткани легких. А. Участок азрогематического барьера, в котором можно различить часть эндотелиальной клетки (EC) и эритроциты (RBC); в цитоплазме эндотелиальной клетки (красная рамка) была обнаружена везикула, содержащая коронавирусные частицы; В. Везикула была заполнена сферическими коронавирусными частицами (красные стрелки); С. При большом увеличении внутри везикул отмечались коронавирусные частицы сферической формы, средним размером 100 нм, окруженные мембраной с электронно-плотными

выростами S-белка (красный указатель) на поверхности. В просвете частиц визуализируются зернистые структуры нуклеокапсида (красные точки); D. Участок капилляра легкого с эндотелиальной выстилкой (EC) и эритроцитами (RBC) и лимфоцитарной клеткой (LYM) в просвете. В цитоплазме лимфоцита выявлена везикула с коронавирусными частицами (красная рамка); E. Везикула (красная стрелка) локализовалась экстрануклеарно (N), рядом с митохондрией (M), и была связана с мембранным комплексом шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (ER/G); F. При большем увеличении везикула заполнена частицами SARS-CoV-2, определяется отпочковывание (красные стрелки) коронавирусных частиц от мембраны везикулы, что свидетельствует о процессе сборки вируса

Fig. 5. Electron micrograph of lung tissue. A. Area of the air-blood barrier, where part of the endothelial cell (EC) and erythrocytes (RBC) can be distinguished; a vesicle containing coronavirus particles was found in cytoplasm of an endothelial cell (red frame); B. The vesicle was filled with spherical coronavirus particles (red arrows); C. At high magnification, spherical coronavirus particles were visualized inside the vesicles, with an average size of 100 nm, surrounded by a membrane with electron-dense outgrowths of S-protein (red pointer) on the surface. Granular structures of the nucleocapsid (red dots) are visualized in particle lumen; D. Section of lung capillary with endothelial lining (EC) and erythrocytes (RBC) and lymphocyte cell (LYM) in the lumen. A vesicle with coronavirus particles was found in the lymphocyte cytoplasm (red frame); E. The vesicle (red arrow) was extranuclear (N) adjacent to the mitochondria (M) and was associated with the rough endoplasmic reticulum/Golgi apparatus membrane complex (ER/G); F. At higher magnification, the vesicle is filled with SARS-CoV-2 particles, budding (red arrows) of coronavirus particles from vesicle membrane is determined, which indicates the assembly

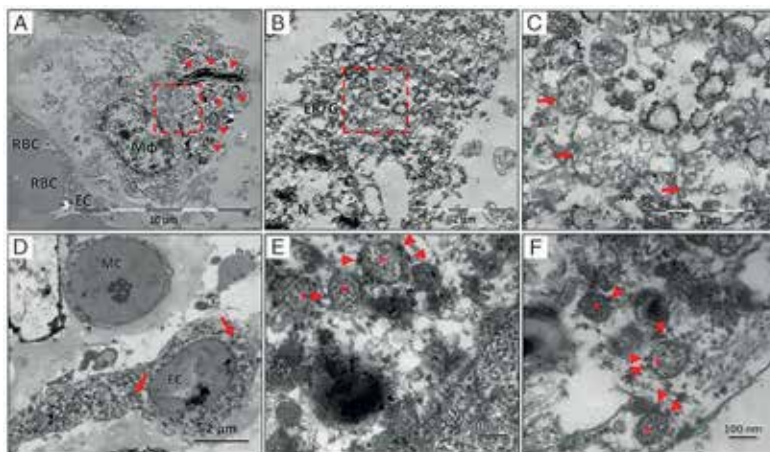


Рис. 6. Электронная микрофотография ткани лимфатического узла и почки. А. В лимфатическом узле, в цитоплазме макрофага (Mφ), расположенного перикапиллярно, визуализировались мультивезикулярные структуры (красная рамка) и частицы фагоцитированной угольной пыли (красные указатели); В. Мультивезикулярные структуры (красная рамка) располагались вблизи ядра (N) и были ассоциированы с эндоплазматическим ретикулумом и цистернами комплекса Гольджи (ER/G); С. При большем увеличении мультивезикулярные структуры

заполнены частицами SARS-CoV-2; D. Участок сосудистого клубочка почек с мезангиальной (MC) и эндотелиальной (EC) клетками, в цитоплазме которых ближе к ядру (красные стрелки) обнаружены коронавирусные частицы; E, F. При большом увеличении внутри везикул отмечались коронавирусные частицы сферической формы, средним размером 100 нм, окруженные мембраной с электронно-плотными выростами S-белка (красный указатель) на поверхности. В просвете частиц визуализируются зернистые структуры нуклеокапсида (красные точки)

Fig. 6. Electron micrograph of lymph node and kidney tissue. A. In the lymph node, in cytoplasm of a macrophage (Mφ) located pericapillary, multivesicular structures (red frame) and particles of phagocytosed coal dust (red pointers) were visualized; B. Multivesicular structures (red frame) were located near the nucleus (N) and were associated with endoplasmic reticulum and cisterns of the Golgi apparatus (ER/G); C. At higher magnification, multivesicular structures are filled with SARS-CoV-2 particles; D. A section of kidney vascular glomerulus with mesangial (MC) and endothelial (EC) cells in which cytoplasm coronavirus particles were found closer to the nucleus (red arrows); E, F. At high magnification, spherical coronavirus particles were observed inside the vesicles, with an average size of 100 nm surrounded by a membrane with electron-dense outgrowths of the S-protein (red pointer) on the surface. Granular structures of the nucleocapsid (red dots) are visualized in particles lumen

тического барьера (рис. 5A-C), а также в цитоплазме лимфоцита в просвете капилляра (рис. 5D-F).

При ТЭМ ткани лимфатических узлов частицы SARS-CoV-2 были обнаружены в цитоплазме макрофага, расположенного в непосредственной близости к гемокапилляру с отчетливой эндотелиальной выстилкой и эритроидными клетками в просвете (рис. 6A-C).

При исследовании ткани почек коронавирусные частицы были также выявлены в цитоплазме эндотелиальной клетки капиллярной сети почечного клубочка (рис. 6D-F).

Исследование с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (в диапазоне увеличений от 5000 до 40000) показало, что ультраструктурная анатомия в исследованных нами тканях имела хорошую сохранность. При ТЭМ из структурных компонентов хорошо визуализировались: в легких – участок аэрогематического барьера со всеми участвующими в нем структурными элементами, участок гемокапилляра, высланного эндотелиальной клеткой и содержащий в просвете эритроциты и лимфоциты; в ткани лимфатических узлов – тканевые макрофаги с частицами фагоцитированной угольной пыли, характерными для антракоза лимфатических узлов, клеточные компоненты гемокапилляра (эндотелиальная выстилка и эритроциты в просвете); в почках – почечные клубочки с мезангиальной и эндотелиальной клетками.

В электронных микрофотографиях, полученных при большом увеличении, отчетливо были видны различные субклеточные структуры, такие как ядро клетки, митохондрии, шероховатая эндоплазматическая сеть, цистерны комплекса Гольджи, различные включения (частицы угольной пыли). Межклеточный матрикс был неоднородным, и в нем хорошо визуализировались коллагеновые фибриллы разного диаметра.

При ТЭМ-исследовании ткани легких коронавирусные частицы в большинстве случаев были выявлены в эндотелиальных клетках, что соответствует

публикациям [1, 20]. ТЭМ-визуализация частиц SARS-CoV-2 в эндотелиальных клетках сосудов, что зафиксировано во многих исследованиях, может косвенно подтвердить гипотезу о ключевом значении эндотелиальных дисфункций в развитии мультиорганной недостаточности, являющейся причиной летального исхода COVID-19 [10, 15].

Обнаруженные нами при ТЭМ лимфатических узлов в цитоплазме макрофагальной клетки частицы SARS-CoV-2 дополняют результаты более ранних работ, в которых не удалось идентифицировать тип инфицированной клетки.

При ТЭМ-исследовании ткани почек частицы SARS-CoV-2 были выявлены в цитоплазме эндотелиальной клетки капиллярной сети почечных клубочков, что дополняет результаты других исследований, где коронавирусные частицы в почках были выявлены в цитоплазме клеток канальцевого эпителия и подоцитах [17].

Таким образом, ТЭМ позволяет не только визуализировать сами частицы коронавируса SARS-CoV-2, но и указывать их морфологическую локализацию в тканях различных органов.

Полученные нами результаты ТЭМ-исследования ткани легких, почек и трахеобронхиальных лимфатических узлов подтверждают и дополняют результаты ранее опубликованных работ.

Заключение

Ультраструктурный анализ методом ТЭМ показал внутриклеточную локализацию коронавируса SARS-CoV-2 в цитоплазме эндотелиальных клеток различных органов, что подтверждает данные о важном значении эндотелиальных дисфункций в развитии мультиорганных поражений при COVID-19. Обнаруженные в цитоплазме лимфоцита коронавирусные частицы являются прямым доказательством возможности инфицирования его и SARS-CoV-2 опосредованной гибели иммунных клеток.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare there is no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ackermann M., Verleden S. E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 2. – P. 120–128.
2. ALMEIDA J. D. A CLASSIFICATION OF VIRUS PARTICLES BASED ON MORPHOLOGY // *Canadian Medical Association Journal*. – 1963. – Vol. 89, № 16. – P. 787–798.
3. Almeida J. D., Tyrrell D. A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture // *The Journal of General Virology*. – 1967. – Vol. 1, № 2. – P. 175–178.
4. Barreto-Vieira D. F., Silva M. A. N. da, Garcia C. C., Miranda M. D., Matos A. da R., Caetano B. C., Resende P. C., Motta F. C., Siqueira M. M., Girard-Dias W. et al. Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2021. – № 116. – P. e200443.

REFERENCES

1. Ackermann M., Verleden S. E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *The New England Journal of Medicine*, 2020, vol. 383, no. 2, pp. 120–128.
2. ALMEIDA J. D. A CLASSIFICATION OF VIRUS PARTICLES BASED ON MORPHOLOGY. *Canadian Medical Association Journal*, 1963, vol. 89, no. 16, pp. 787–798.
3. Almeida J. D., Tyrrell D. A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of General Virology*, 1967, vol. 1, no. 2, pp. 175–178.
4. Barreto-Vieira D. F., Silva M. A. N. da, Garcia C. C., Miranda M. D., Matos A. da R., Caetano B. C., Resende P. C., Motta F. C., Siqueira M. M., Girard-Dias W. et al. Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2021, no. 116, pp. e200443.

5. Bradley B. T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S. L., Xu H., Najafian B., Deutsch G., Lacy J. M., Williams T. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 396, № 10247. – P. 320–332.
6. Bullock H. A., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Martines R. B., Miller S. E. Difficulties in Differentiating Coronaviruses from Subcellular Structures in Human Tissues by Electron Microscopy // *Emerging infectious diseases*. – 2021. – Vol. 27, № 4. – P. 1023–1031.
7. Colmenero I., Santonja C., Alonso-Riaño M., Noguera-Morel L., Hernández-Martin A., Andina D., Wiesner T., Rodríguez-Peralto J. L., Requena L., Torrelo A. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases // *The British Journal of Dermatology*. – 2020. – Vol. 183, № 4. – P. 729–737.
8. Curry A., Appleton H., Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future // *Micron (Oxford, England)*. – 2006. – Vol. 37, № 2. – P. 91–106.
9. Dolhnikoff M., Duarte-Neto A. N., Saldiva P. H. N., Caldini E. G. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology // *Lancet (London, England)*. – 2021. – Vol. 397, № 10270. – P. 196–197.
10. Fodor A., Tiperciuc B., Login C., Orasan O. H., Lazar A. L., Buchman C., Hanghical P., Sitar-Taut A., Suharoschi R., Vulturar R. et al. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19-Mechanisms and Therapeutic Targets // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2021. – № 2021. – P. 8671713.
11. Hopfer H., Herzig M. C., Gosert R., Menter T., Hench J., Tzankov A., Hirsch H. H., Miller S. E. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues // *Histopathology*. – 2021. – Vol. 78, № 3. – P. 358–370.
12. Kniss D. A. Alternative interpretation to the findings reported in visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 223, № 5. – C. 785–786.
13. Miller S. E., Brealey J. K. Visualization of putative coronavirus in kidney // *Kidney international*. – 2020. – Vol. 98, № 1. – P. 231–232.
14. Neil D., Moran L., Horsfield C., Curtis E., Swann O., Barclay W., Hanley B., Hollinshead M., Roufousse C. Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep // *The Journal of Pathology*. – 2020. – Vol. 252, № 4. – P. 346–357.
15. Noris M., Benigni A., Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact // *Kidney International*. – 2020. – Vol. 98, № 2. – P. 314–322.
16. Pesaresi M., Pirani F., Tagliabracci A., Valsecchi M., Procopio A. D., Busardò F. P., Graciotti L. SARS-CoV-2 identification in lungs, heart and kidney specimens by transmission and scanning electron microscopy // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2020. – Vol. 24, № 9. – P. 5186–5188.
17. Prasad S., Potdar V., Cherian S., Abraham P., Basu A. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2 // *The Indian Journal of Medical Research*. – 2020. – Vol. 151, № 2 & 3. – P. 241–243.
18. Schoenmakers S., Snijder P., Verdijk R. M., Kuiken T., Kamphuis S. S. M., Koopman L. P., Krasemann T. B., Rousian M., Broekhuizen M., Steegers E. A. P. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Placental Infection and Inflammation Leading to Fetal Distress and Neonatal Multi-Organ Failure in an Asymptomatic Woman // *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 556–561.
19. Tavazzi G., Pellegrini C., Maurelli M., Belliato M., Sciutti F., Bottazzi A., Sepe P. A., Resasco T., Camporotondo R., Bruno R., et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock // *European Journal of Heart Failure*. – 2020. – Vol. 22, № 5. – P. 911–915.
20. Varga Z., Flammer A. J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A. S., Mehra M. R., Schuepbach R. A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 395, № 10234. – P. 1417–1418.
21. Wang Y., Liu S., Liu H., Li W., Lin F., Jiang L., Li X., Xu P., Zhang L., Zhao L., et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19 // *Journal of Hepatology*. – 2020. – Vol. 73, № 4. – P. 807–816.
22. Zhao C. L., Rapkiewicz A., Maghsoodi-Deerwester M., Gupta M., Cao W., Palaia T., Zhou J., Ram B., Vo D., Rafiee B. et al. Pathological findings in the postmortem liver of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Human Pathology*. – 2021. – № 109. – P. 59–68.
5. Bradley B. T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S. L., Xu H., Najafian B., Deutsch G., Lacy J. M., Williams T. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet (London, England)*, 2020, vol. 396, no. 10247, pp. 320–332.
6. Bullock H. A., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Martines R. B., Miller S. E. Difficulties in Differentiating Coronaviruses from Subcellular Structures in Human Tissues by Electron Microscopy. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, vol. 27, no. 4, pp. 1023–1031.
7. Colmenero I., Santonja C., Alonso-Riaño M., Noguera-Morel L., Hernández-Martin A., Andina D., Wiesner T., Rodríguez-Peralto J. L., Requena L., Torrelo A. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases. *The British Journal of Dermatology*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 729–737.
8. Curry A., Appleton H., Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron, Oxford, England*, 1993, 2006, vol. 37, no. 2, pp. 91–106.
9. Dolhnikoff M., Duarte-Neto A. N., Saldiva P. H. N., Caldini E. G. Using EM data to understand COVID-19 pathophysiology. *Lancet (London, England)*, 2021, vol. 397, no. 10270, pp. 196–197.
10. Fodor A., Tiperciuc B., Login C., Orasan O. H., Lazar A. L., Buchman C., Hanghical P., Sitar-Taut A., Suharoschi R., Vulturar R. et al. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19-Mechanisms and Therapeutic Targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, no. 2021, pp. 8671713.
11. Hopfer H., Herzig M. C., Gosert R., Menter T., Hench J., Tzankov A., Hirsch H. H., Miller S. E. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues. *Histopathology*, 2021, vol. 78, no. 3, pp. 358–370.
12. Kniss D. A. Alternative interpretation to the findings reported in visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2020, vol. 223, no. 5, pp. 785–786.
13. Miller S. E., Brealey J. K. Visualization of putative coronavirus in kidney. *Kidney International*, 2020, vol. 98, no. 1, pp. 231–232.
14. Neil D., Moran L., Horsfield C., Curtis E., Swann O., Barclay W., Hanley B., Hollinshead M., Roufousse C. Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep. *The Journal of Pathology*, 2020, vol. 252, no. 4, pp. 346–357.
15. Noris M., Benigni A., Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney International*, 2020, vol. 98, no. 2, pp. 314–322.
16. Pesaresi M., Pirani F., Tagliabracci A., Valsecchi M., Procopio A. D., Busardò F. P., Graciotti L. SARS-CoV-2 identification in lungs, heart and kidney specimens by transmission and scanning electron microscopy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, vol. 24, no. 9, pp. 5186–5188.
17. Prasad S., Potdar V., Cherian S., Abraham P., Basu A. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2. *The Indian Journal of Medical Research*, 2020, vol. 151, no. 2 & 3, pp. 241–243.
18. Schoenmakers S., Snijder P., Verdijk R. M., Kuiken T., Kamphuis S. S. M., Koopman L. P., Krasemann T. B., Rousian M., Broekhuizen M., Steegers E. A. P. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Placental Infection and Inflammation Leading to Fetal Distress and Neonatal Multi-Organ Failure in an Asymptomatic Woman. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2021, vol. 10, no. 5, pp. 556–561.
19. Tavazzi G., Pellegrini C., Maurelli M., Belliato M., Sciutti F., Bottazzi A., Sepe P. A., Resasco T., Camporotondo R., Bruno R. et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *European Journal of Heart Failure*, 2020, vol. 22, no. 5, pp. 911–915.
20. Varga Z., Flammer A. J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A. S., Mehra M. R., Schuepbach R. A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet (London, England)*, 2020, vol. 395, no. 10234, pp. 1417–1418.
21. Wang Y., Liu S., Liu H., Li W., Lin F., Jiang L., Li X., Xu P., Zhang L., Zhao L. et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *Journal of Hepatology*, 2020, vol. 73, no. 4, pp. 807–816.
22. Zhao C. L., Rapkiewicz A., Maghsoodi-Deerwester M., Gupta M., Cao W., Palaia T., Zhou J., Ram B., Vo D., Rafiee B. et al. Pathological findings in the postmortem liver of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Human Pathology*, 2021, no. 109, pp. 59–68.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
Тел.: +7 (495) 433-27-94

Одилов Акмалжон Адхамжонович
Аспирант кафедры патологической анатомии
медицинского института
E-mail: a.odilov.tma@gmail.com

Волков Алексей Вадимович
Доктор медицинских наук, доцент кафедры
патологической анатомии медицинского института
E-mail: alex.volkoff@gmail.com

Бабиченко Игорь Иванович
Доктор медицинских наук, профессор, заведующий
кафедрой патологической анатомии медицинского
института
E-mail: babichenko@list.ru

ФГБУ «Национальный исследовательский центр
гематологии» МЗ РФ
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Судариков Андрей Борисович
Доктор биологических наук, заведующий лабораторией
молекулярной гематологии
Тел.: +7 (495) 612-65-11
E-mail: andrey@sudarikov.net

Ташкентская медицинская академия
100109, Республика Узбекистан, г. Ташкент, ул. Фараби, д. 2
Тел.: +998 (78) 150-78-25

Абдуллаев Адхамжон Одилович
Кандидат медицинских наук,
заведующий Центром биомедицинских технологий
E-mail: adham_abdullaev@mail.ru

Шадманов Алишер Каюмович
Доктор медицинских наук, профессор, ректор
E-mail: info@tma.uz

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

RUDN University
6, Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198
Phone: +7 (495) 433-27-94

Akmalzhon A. Odilov
Post Graduate Student of Pathological Anatomy Department,
Medical Institute
Email: a.odilov.tma@gmail.com

Aleksey V. Volkov
Doctor of Medical Sciences, Associate Professor
of Anatomical Pathology Department, Medical Institute
Email: alex.volkoff@gmail.com

Igor I. Babichenko
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Anatomical Pathology Department,
Medical Institute
Email: babichenko@list.ru

National Medical Research Center for Hematology,
Russian Ministry of Health
4, Novy Zykovsky Drive, Moscow, 125167

Andrey B. Sudarikov
Doctor of Biological Sciences, Head of Molecular
Hematology Laboratory
Phone: +7 (495) 612-65-11
Email: andrey@sudarikov.net

Tashkent Medical Academy
2, Farabi St., Tashkent, Uzbekistan Republic, 100109
Phone: +998 (78) 150-78-25

Adkhamzhon O. Abdullaev
Candidate of Medical Sciences, Head of Biomedical
Technology Center
Email: adham_abdullaev@mail.ru

Alisher K. Shadmanov
Doctor of Medical Sciences, Professor, Rector
Email: info@tma.uz

Поступила 03.04.2023

Submitted as of 03.04.2023