

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 616-091.8

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-3-165-173

## ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ CD31, ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА В РАЗНЫЕ СРОКИ COVID-19 ПНЕВМОНИИ

*Сергей Сергеевич Тодоров*<sup>1✉</sup>, *Сергей Сергеевич Тодоров (мл.)*<sup>2</sup>,  
*Андрей Сергеевич Казьмин*<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>1</sup>sertodorov@gmail.com✉

<sup>2</sup>todorov-oo@inbox.ru

<sup>3</sup>kazmin\_as@mail.ru

**Аннотация.** Обсуждается роль коронавируса SARS-CoV-2 в генезе сосудистых поражений легких при COVID-19 пневмонии. Патологоанатомических работ, посвященных изучению экспрессии белков CD31, фактора Виллебранда, участвующих в поддержании гемостазиологического баланса в разные сроки COVID-19 пневмонии, представлено мало.

**Материалы и методы.** Изучение аутопсийного материала легких 80 умерших при COVID-19 пневмонии с учетом хронологических сроков развития заболевания (до 14 сут., 15–21 сут., 22–40 сут.). Выполнен комплекс морфологических, гистологических, иммуногистохимических исследований (CD31, vWF) с компьютерной морфометрией и статистической обработкой результатов.

**Результаты.** Выраженные васкулярные изменения с развитием микротромбообразования наблюдаются на 2–3-й неделе заболевания, что сопровождается яркой экспрессией белка CD31, умеренной экспрессией белка фактора Виллебранда. Спустя 22–40 дней развития COVID-19 пневмонии имеются признаки неоангиогенеза, ремоделирования сосудов легких.

**Выводы.** Полученные данные дополняют наше представление о патогенезе COVID-19 пневмонии в разные сроки развития, роли экспрессии белков CD31, vWF в сосудах легких, важных для оценки эндотелиальной дисфункции и гемостаза.

**Ключевые слова:** COVID-19 пневмония, CD31, фактор Виллебранда, сосуды, сроки заболевания, иммуногистохимия

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

## EXPRESSION OF CD31 PROTEINS, WILLEBRAND FACTOR AT DIFFERENT TIMES OF COVID-19 PNEUMONIA

*Sergey S. Todorov*<sup>1✉</sup>, *Sergey S. Todorov (Jr.)*<sup>2</sup>, *Andrey S. Kazmin*<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>1</sup>sertodorov@gmail.com✉

<sup>2</sup>todorov-oo@inbox.ru

<sup>3</sup>kazmin\_as@mail.ru

**Abstract.** The role of the SARS-CoV-2 coronavirus in the genesis of pulmonary vascular lesions in COVID-19 pneumonia is discussed. There are few pathoanatomical works devoted to the study of the expression of CD31 proteins, von Willebrand factor involved in maintaining hemostasiological balance at different times of COVID-19 pneumonia.

**Materials and methods.** The study of autopsy lung material of 80 deceased with COVID-19 pneumonia, taking into account the chronological timing of the development of the disease (up to 14 days, 15–21 days, 22–40 days). A complex of morphological, histological, immunohistochemical studies (CD31, vWF) was performed with computer morphometry and statistical processing of the results.

**Results.** Pronounced vascular changes with the development of microthrombus formation are observed at 2–3 weeks of the disease, which is accompanied by a bright expression of the CD31 protein, a moderate expression of the von Willebrand factor protein. After 22–40 days of development of COVID-19 pneumonia, there are signs of neoangiogenesis, remodeling of pulmonary vessels.

© Тодоров С.С., Тодоров С.С. (мл.), Казьмин А.С., 2022

*Conclusions.* The data obtained supplement our understanding of the pathogenesis of COVID-19 pneumonia at different stages of development, the role of the expression of CD31 and vWF proteins in pulmonary vessels, which are important for assessing endothelial dysfunction and hemostasis.

**Keywords:** COVID-19 pneumonia, CD31, von Willebrand factor, blood vessels, disease timing, immunohistochemistry

В настоящее время современный мир столкнулся с серьезной эпидемиологической угрозой, объявленной пандемией Всемирной организацией здравоохранения в марте 2020 г. Вирус, относящийся к семейству бета-коронавирусов, РНК-содержащий, был назван SARS-CoV-2 инфекцией, а заболевание, им вызываемое – COVID-19 [1, 2].

Весьма стремительное распространение в мире, необычные клинические «маски» и течение заболевания, мутация возбудителя, его тропизм к определенным рецепторам системы ренин-ангиотензин-альдостерон (РААС) с последующим встраиванием генома вируса в клетку-хозяина (легкие, кровеносные сосуды, сердце и прочее) диктуют необходимость тщательного изучения патогенеза COVID-19.

Несмотря на то, что в настоящее время при COVID-19 описаны различные эффекты действия вируса SARS-CoV-2 – цитопатический, оксидативный стресс с образованием свободных радикалов, активация макрофагальной системы с развитием цитокинового шторма, иммунологическая дисрегуляция – все эти патологические изменения требуют своей патологоанатомической характеристики в разные сроки развития заболевания [3, 4, 5]. Результаты отдельных патологоанатомических исследований свидетельствуют об особенностях поражений кровеносных сосудов легких в разные сроки COVID-19 пневмонии [3, 5].

Принимая во внимание тот факт, что вирус SARS-CoV-2 может повреждать эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, следует изучить роль маркеров эндотелиальной дисфункции CD31, фактора Виллебранда (vWF) в разные сроки развития COVID-19 пневмонии.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить экспрессию белков CD31, фактора Виллебранда (vWF) в разные сроки летальных исходов COVID-19 пневмонии.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для выполнения морфологического и иммуногистохимического исследования был получен во время выполнения вскрытий 80 умерших в разных стационарах города Ростова-на-Дону. Во время аутопсий оценивали размеры легких, состояние кровенаполнения, состояние поверхности, вид на разрезе, наличие включений и патологических изменений

легочной ткани, в том числе состояние просветов кровеносных сосудов, наличие или отсутствие в них тромбов, посмертных кровяных свертков. При вскрытии сердца обращали внимание на размеры, состояние полостей, наличие или отсутствие тромбов или посмертных кровяных свертков, наличие или отсутствие патологических изменений в клапанном аппарате (эндокардит, пороки, тромботические наложения).

Вскрытие легких проводилось по традиционной схеме, с верхних дыхательных путей до нижних дыхательных путей и легочной паренхимы. Наиболее измененные участки легочной ткани (плотные, лаковые, отечные, резко полнокровные) иссекались в виде кусочков размерами не менее 2 × 2 см, отдельно забирался материал для выполнения посмертного ПЦР-исследования с последующим обнаружением вируса SARS-CoV-2.

Среди умерших было 42 мужчины, 38 женщин, средний возраст которых составил 69 лет. Анализ историй болезни умерших пациентов с COVID-19 позволил выявить наличие коморбидной патологии: сахарный диабет (32,2 %), артериальная гипертензия (86,4 %), ожирение (33,4 %).

Во всех изученных наблюдениях в клиническом и патологоанатомическом диагнозах COVID-19 был выставлен в качестве основного заболевания.

С учетом клинической картины основного заболевания, COVID-19, времени появления первых симптомов заболевания, мы разделили умерших пациентов на следующие хронологические группы: 1) 0–14 сут.; 2) 15–21 сут.; 3) 22–40 сут. Для определения степени поражений сосудов легких мы разработали и использовали шкалу полуколичественной оценки признака на основании подсчета пораженных сосудов легких в 10 полях зрения, выраженное в процентах: отсутствие признака (0 %), слабый признак + (1–25 %), умеренный признак ++ (26–50 %), выраженный признак +++ (51–75 %), резковыраженный признак ++++ (76–100 %). Метод полуколичественной оценки морфологических признаков был дополнен исследованием с помощью компьютерной программы ImageJ (US National Institutes of Health, США) морфометрии и фотографии препаратов с увеличением объектива ×20 или ×40 [6]. Во всех случаях проводили измерение общей площади биоптата и статистического анализа. Микроскопия и фотографирование полученных гистологических препаратов осуществлялись с помощью микроскопа Leica 1000DM с пакетом программного обеспечения (Германия).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли на персональном компьютере с применением статистических инструментов программы MedCalc Statistical Software version 19.1.3. Значения всех выборок подвергли проверке на характер распределения с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. Нулевую гипотезу отвергали при пороговом значении  $p < 0,05$ .

Иммуногистохимическое исследование сосудов легких при COVID-19 пневмонии проводилось с использованием антител к CD31, фактору Виллебранда (vWF) (табл.).

Непосредственной причиной смерти больных при COVID-19 были острый респираторный дистресс-синдром (45 %), тромбоз ветвей легочной артерии (30 %), полиорганная недостаточность (25 %).

Таблица антител

Название антитела	Производитель (фирма)	Клон	Происхождение антитела	Разведение
CD31	Cell Marque	клон JC70	mouse monoclonal antibody	rtu
Фактор Виллебранда	Cell Marque	factor VIII-R Ag	rabbit polyclonal antibody	rtu

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди патологических признаков поражений сосудов легких были выделены стаз эритроцитов, альтерация эндотелиоцитов, тромбоз, нейтрофильная инфильтрация стенок сосудов, фибриноидные изменения, гиперплазия эндотелия, регенерация эндотелия. Особое внимание было обращено на наличие или отсутствие воспалительной реакции стенок сосудов при COVID-19, а также степень выраженности клеточной реакции в паренхиме легких.

Морфологическими особенностями поражения сосудов легких при COVID-19 пневмонии в течение 14 дней от начала заболевания были полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок, резкая эктазия мелких и средних ветвей легочной артерии с началом формирования фибриновых тромбов, на фоне внутриальвеолярного отека с умеренной нейтрофильной инфильтрацией (рис. 1).

В эти сроки в стенках сосудов микроциркуляторного русла, мелких артериях была выражена экспрессия белков CD31, фактора Виллебранда (рис. 2, 3).

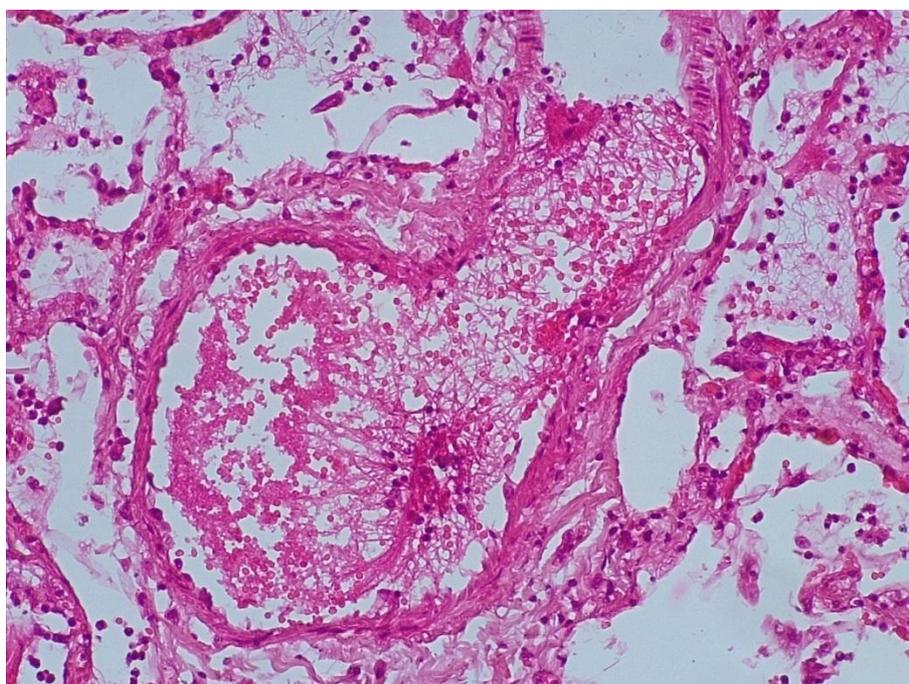


Рис. 1. Резкая эктазия просвета легочной артерии среднего калибра с началом формирования фибринового тромба. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение  $\times 100$

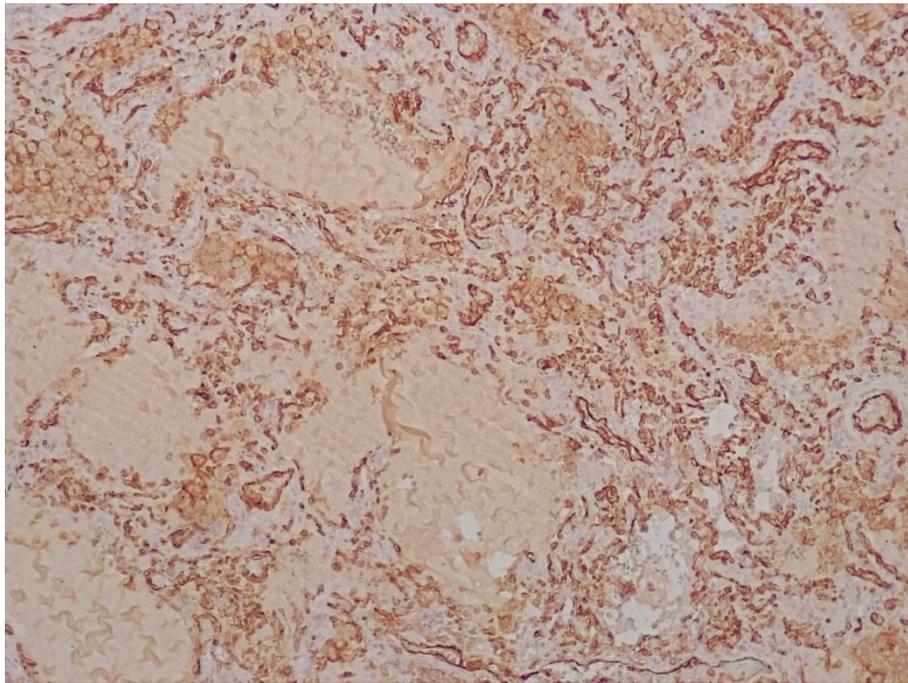


Рис. 2. Яркая экспрессия белка CD31+ в клетках эндотелия сосудов микроциркуляторного русла легких при COVID-19. Иммуногистохимическая реакция к CD31.  
Увеличение ×200

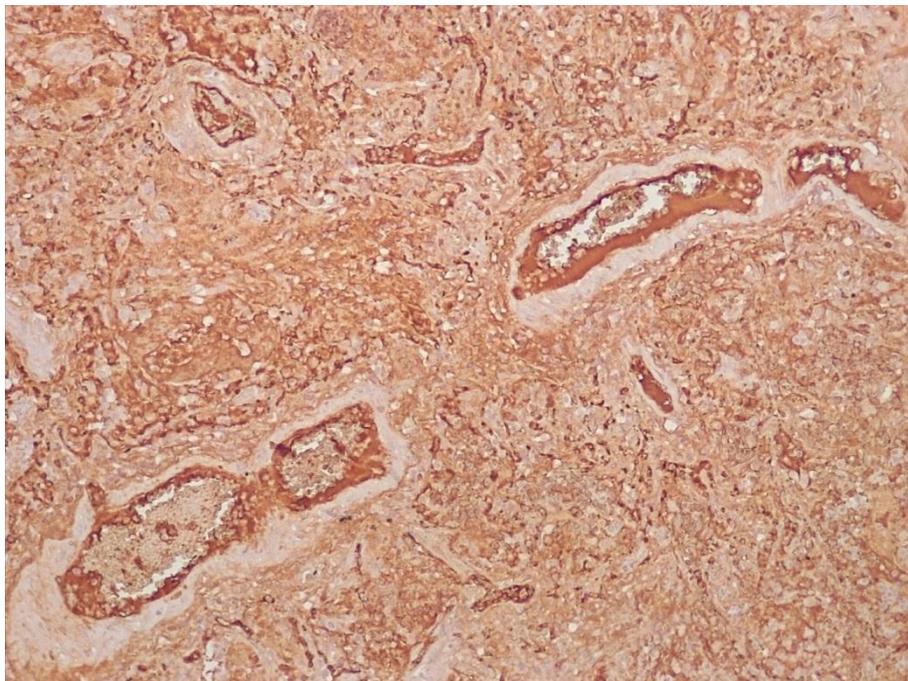


Рис. 3. Гиперэкспрессия фактора Виллебранда в стенках кровеносных сосудов легких при COVID-19. Иммуногистохимическое исследование с антителами к vWF.  
Увеличение ×200

Спустя 15–21 сут. от начала COVID-19 пневмонии в сосудах мелкого и среднего калибра легких наблюдались пристеночные и обтурирующие смешанные тромбы без признаков организации с умеренной

нейтрофильной инфильтрацией стенок (рис. 4). Экспрессия белков CD31 и фактора Виллебранда отличалась в разных сосудах легких. Дискретная экспрессия белков в клетках эндотелия была выражена в мелких

и средних ветвях легочной артерии, в то же время яркая линейная экспрессия была хорошо выражена

в эндотелиальных клетках сосудов микроциркуляторного русла (рис. 5).

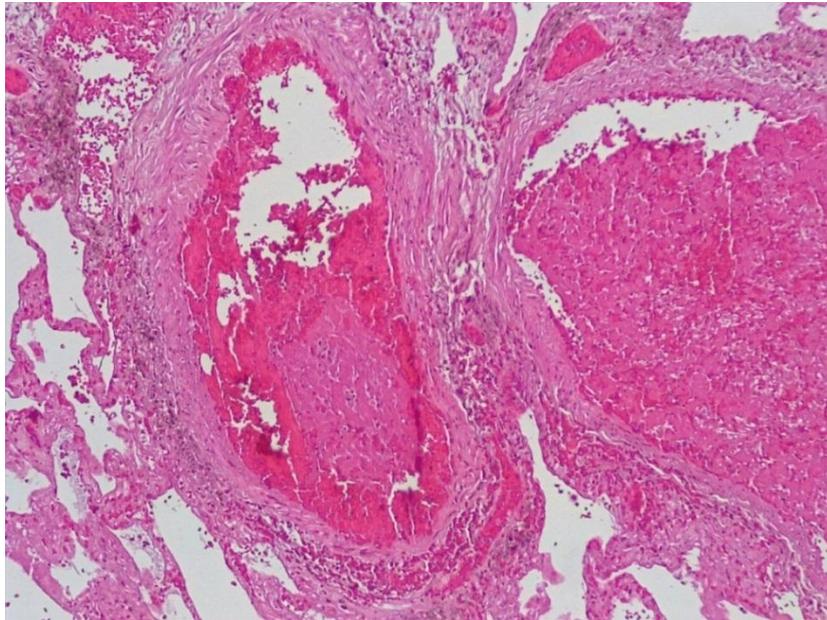


Рис. 4. В просветах средних ветвей легочной артерии – обтурирующие смешанные тромбы без признаков организации. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение  $\times 100$

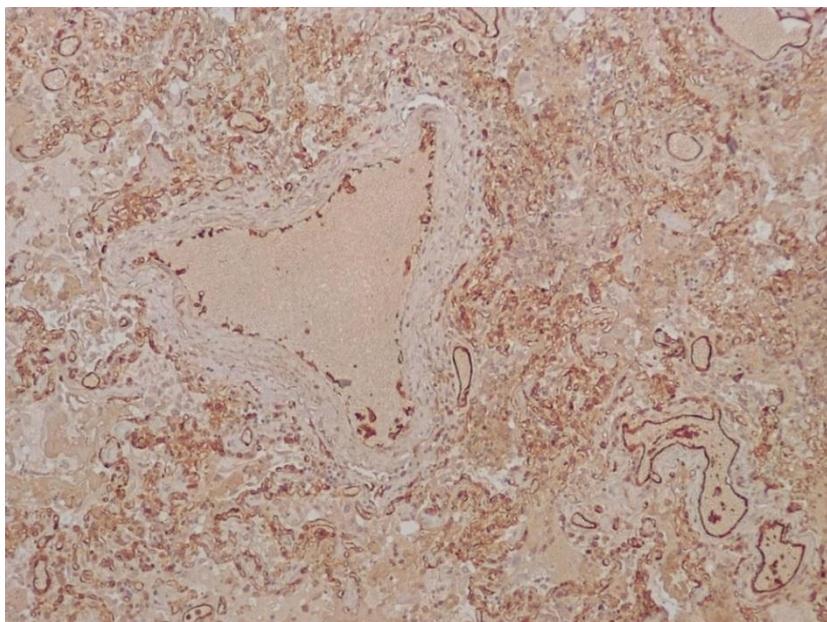


Рис. 5. Дискретная экспрессия белка CD31+ в отдельных клетках эндотелия средней ветви легочной артерии. Яркая линейная экспрессия белка CD31+ в эндотелиальных клетках сосудов микроциркуляторного русла легких. Иммуногистохимическая реакция к CD31. Увеличение  $\times 100$

Интересными были морфоиммуногистохимические изменения в легких при COVID-19 пневмонии спустя 22–40 дней после начала заболевания.

В просветах артерий мелкого и среднего калибра легких имелись обтурирующие смешанные тромбы с началом организации, при этом отмечалась

очаговая гиперплазия клеток эндотелия с формированием «подушкообразного утолщения» интимы и их сужением (рис. 6).

Обращало внимание наличие крупных участков ангиоматоза легочной ткани при COVID-19 за счет экспрессии в них белка CD31 (рис. 7).

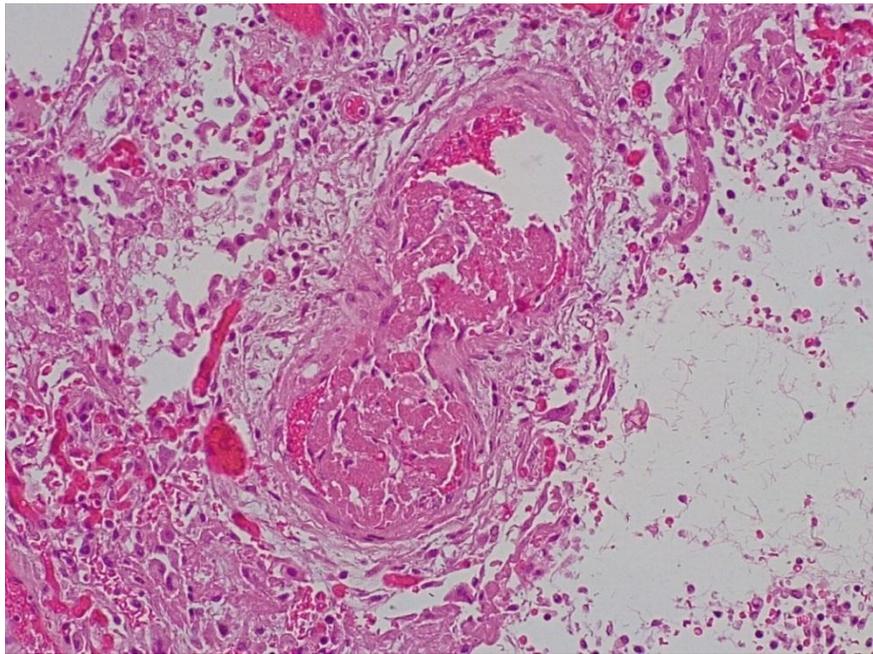


Рис. 6. Обтурирующий смешанный тромб в просвете средней ветви легочной артерии с началом организации. Очаговая гиперплазия клеток эндотелия с формированием «подушкообразного утолщения» интимы и сужением просвета артерии. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение  $\times 100$

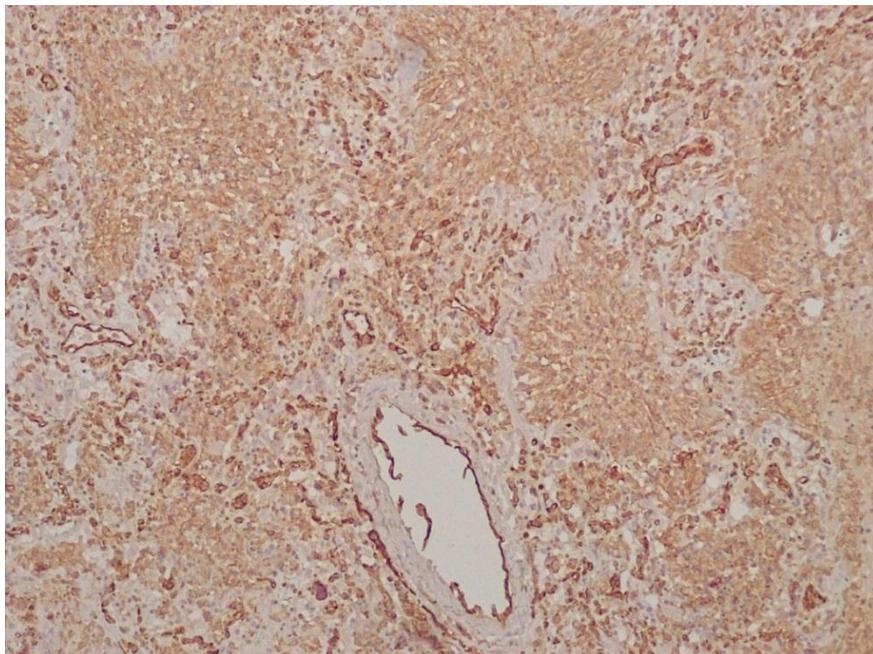


Рис. 7. Умеренно выраженный ангиоматоз за счет мелких новообразованных сосудов CD31+ легких. Иммуногистохимическая реакция с антителом CD31. Увеличение  $\times 100$

На основании сравнительного морфологического, иммуногистохимического исследований при COVID-19 пневмонии нами были показаны особенности поражения сосудов и паренхимы легких.

Так, в течение первых двух недель заболевания преобладали острые циркуляторные расстройства в виде

стаза, резкого полнокровия сосудов микроциркуляторного русла с формированием фибриновых тромбов, с яркой экспрессией фактора Виллебранда, CD31.

Позднее, в сроки 15–21 дней после начала COVID-19 пневмонии были наиболее выражены деструктивные изменения артерий мелкого и среднего

калибра легочной артерии, что сопровождается нарушением свертываемости крови. Морфологические изменения в стенках сосудов в эти сроки характеризовались развитием плазматического пропитывания, фибриноидного набухания и некроза, микротромбообразованием (фибриновые, смешанные тромбы).

Было показано, что уже на 3-й неделе заболевания и позднее спустя 22–40 дней в легких отмечались

явления перестройки – ремоделирования в виде гиперплазии эндотелиоцитов стенок мелких артерий, перекалибровки просветов, ангиоматоз стромы. Эти изменения сопровождались выраженной экспрессией белков CD31, vWF, которые являются маркерами клеток эндотелия и могут указывать на их дисфункцию.

Результаты компьютерной морфометрии и статистической обработки экспрессии CD31, vWF представлены на рис. 8.

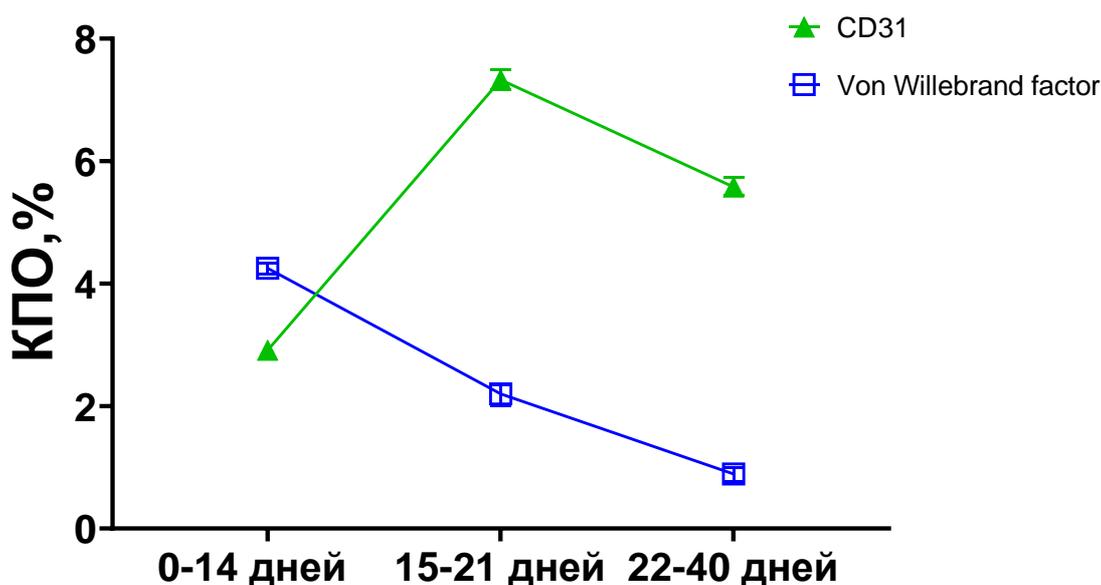


Рис. 8. Экспрессия белков CD31, vWF в разные сроки COVID-19 пневмонии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научной предпосылкой выполнения данного исследования было представление о роли вируса SARS-CoV-2 в генезе сосудистой патологии легких при COVID-19 пневмонии.

Учитывая, что патологоанатомических исследований, посвященных данной проблеме, в современной отечественной и зарубежной литературе представлено немного, мы решили изучить роль белков эндотелия CD31, фактора Виллебранда (vWF) в разные сроки COVID-19 пневмонии.

Нами было установлено, что наиболее выраженные васкулярные изменения с развитием микротромбообразования наблюдаются на 2–3-й неделе заболевания, что сопровождается яркой экспрессией белка CD31, умеренной экспрессией белка фактора Виллебранда.

Вероятно, изменение экспрессии данных маркеров отражает повреждение клеток эндотелия с тромбообразованием сосудов мелкого и среднего калибра легких.

В дальнейшем, через 22–40 дней COVID-19, сохраняются высокие показатели экспрессии CD31+ клеток эндотелия сосудов, что объясняется процессами неоангиогенеза и ремоделирования васкулярного компонента легких.

Эти данные дополняют наше представление о патогенезе заболевания в разные его сроки развития, дают представление о морфологических и иммуногистохимических особенностях поражения сосудов различного калибра легких при COVID-19 пневмонии [7, 8, 9, 10].

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li [et al.] // *Lancet*. 2020. No. 395 (10224). P. 565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
2. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches / Y. Jin, W. Ji, H. Yang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther*. 2020. No. 5(1). P. 293. doi: 10.1038/s41392-020-00454-7.

3. Забозлаев Ф.Г., Кравченко Э.В., Галлямова А.Р., Летуновский Н.Н. Патологическая анатомия легких при новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Предварительный анализ аутопсийных исследований // Клиническая практика. 2020. Т. 11, № 2. С. 21–37. doi: 10.17816/clinpract34849.

4. Особенности патологической анатомии COVID-19 по результатам аутопсий в Волгоградской области / А.В. Смирнов, В.В. Ермилов, Н.А. Дорофеев [и др.] // Архив патологии. 2021. Т. 83. № 6. С. 5–13. doi: 10.17116/patol2021830615.

5. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерибас В.Ю., Тодоров С.С. Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19 // Клиническая и экспериментальная морфология. 2022. Т. 11. № 2. С. 6–12. – doi: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.

6. Веревкин А.А., Космачева Е.Д., Славинский А.А., Ставенчук Т.В. Способ ранней диагностики отторжения трансплантата. Патент № 2728683 С1 Российская Федерация. № 2019139534. Заявл. 03.12.2019. Опубл. 30.07.2020.

7. Рыбакова М.Г., Карев В.Е., Кузнецова И.А. Патологическая анатомия новой коронавирусной инфекции COVID-19. Первые впечатления. // Архив патологии. 2020. Т. 82, № 5. С. 5–15. doi: 10.17116/patol2020820515.

8. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 / M. Ackermann, S.E. Verleden, M. Kuehnel [et al.] // *N Engl J Med*. 2020. No. 383 (2). P. 120–128.

9. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression / S.B. Polak, I.C. Van Gool, D. Cohen [et al.] // *Mod Pathol*. 2020. No. 33 (11). P. 2128–2138.

10. Патология легких при COVID-19 в Москве / М.В. Самсонова, Л.М. Михалева, О.В. Зайратьянц [и др.] // Архив патологии. 2020. Т. 82. № 4. С. 32–40. <https://doi.org/10.17116/patol20208204132>.

#### REFERENCES

1. Lu R., Zhao X., Li J. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for

virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224):565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

2. Jin Y., Ji W., Yang H., Chen S., Zhang W., Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):293. doi: 10.1038/s41392-020-00454-7. (In Russ.).

3. Pathological anatomy of the lungs in a new coronavirus infection (COVID-19). Preliminary analysis of autopsy studies. *Klinicheskaya praktika = Clinical practice*. 2020;11(2):21–37. doi: 10.17816/clinpract34849. (In Russ.).

4. Smirnov A.V., Yermilov V.V., Dorofeyev N.A. et al. Features of the pathological anatomy of COVID-19 based on the results of autopsies in the Volgograd region. *Arkhiv patologii = Archives of Pathology*. 2021;83(6):5–13. doi: 10.17116/patol2021830615. (In Russ.).

5. Todorov S.S., Kaz'min A.S., Deribas V.Yu. Pathological anatomy of pulmonary vascular lesions in COVID-19. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and experimental morphology*. 2022;11(2):6–12. doi:10.31088/CEM2022.11.2.6-12. (In Russ.).

6. Verevkin A.A., Kosmacheva E.D., Slavinsky A.A., Stavenchuk T.V. Method for early diagnosis of graft rejection. Patent No. 2728683 C1 Russian Federation. No. 2019139534. Appl. 03.12.2019. Published 30.07.2020. (In Russ.).

7. Rybakova M.G., Karev V.E., Kuznetsova I.A. Pathological anatomy of the new coronavirus infection COVID-19. First impressions. *Arkhiv patologii = Archive of pathology*. 2020;82(5):5–15. doi: 10.17116/patol2020820515. (In Russ.).

8. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120–128.

9. Polak S.B., Van Gool I.C., Cohen D. et al. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Mod Pathol*. 2020;33(11):2128–2138.

10. Samsonova M.V., Mikhaleva L.M., Zayratyants O.V. et al. Pulmonary pathology in COVID-19 in Moscow. *Arkhiv patologii = Archive of pathology*. 2020;82(4):32–40. <https://doi.org/10.17116/patol20208204132>. (In Russ.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Информация об авторах

**С.С. Тодоров** – доктор медицинских наук, профессор кафедры, исполняющий обязанности заведующего кафедрой патологической анатомии, руководитель морфологического отдела, врач-патологоанатом высшей квалификационной категории, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8476-5606>

**С.С. Тодоров (мл.)** – студент 5-го курса лечебно-профилактического факультета, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4787-4031>

**А.С. Казьмин** – ассистент кафедры патологической анатомии, врач-патологоанатом высшей квалификационной категории, Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0934-3416>

Статья поступила в редакцию 22.07.2022; одобрена после рецензирования 19.08.2022; принята к публикации 23.08.2022.

**The authors declare no conflicts of interests.**

*Information about the authors*

**S.S. Todorov** – MD, Professor of the Department, Acting Head of the Department of Pathological Anatomy, Head of the Morphological Department, Pathologist of the highest qualification category, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8476-5606>

**S.S. Todorov (Jr.)** – 5th year student of the Faculty of Medical Prevention, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4787-4031>

**A.S. Kazmin** – Assistant of the Department of Pathological Anatomy, Pathologist of the highest qualification category, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0934-3416>

The article was submitted 22.07.2022; approved after reviewing 19.08.2022; accepted for publication 23.08.2022.