

EDN: DGDJRC

DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_4_129

УДК (616-091.8)



РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЛИИ И МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА НЕОКОРТЕКСА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

С. Н. Рябцева¹, М. А. Корнеева¹, А. О. Чеботарь¹, И. А. Семеник¹,
С. А. Гузов², М. К. Недзьведь²

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»,
Академическая ул., 28, г. Минск, Республика Беларусь, 220012

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр-т Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь, 220083

РЕЗЮМЕ. Поражение головного мозга на фоне новой коронавирусной инфекции характеризуется широким спектром клинко-морфологических проявлений: от когнитивных нарушений до массивных инсультов. Однако реакция глии и характер изменения микроциркуляторного русла головного мозга при бессимптомном поражении центральной нервной системы на фоне COVID-19 изучены недостаточно.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: оценить глиально-сосудистую реакцию головного мозга при инфицировании новым штаммом коронавируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: в ходе исследования выполнена сравнительная характеристика реактивных изменений глиального и сосудистого компонента вещества головного мозга пациентов, умерших от сердечной недостаточности (n=5), и пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 и умерших от дыхательной недостаточности (n=10).

РЕЗУЛЬТАТЫ. У пациентов, инфицированных новым штаммом коронавируса, выявлена экспрессия маркера белка нуклеокапсид SARS-CoV-2 в цитоплазме нейронов. Глиально-сосудистая реакция характеризовалась реактивной пролиферацией и гипертрофией тел астроцитов, реактивной пролиферацией клеток микроглии с нарастающей долей промежуточных и активированных морфотипов в сочетании с изменениями капилляров и артериол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Реактивные изменения астроцитов и клеток микроглии указывали на нейродегенеративные процессы в головном мозге пациентов, инфицированных новым штаммом коронавируса, что в сочетании с патологией микроциркуляторного русла может стать причиной дальнейшего прогрессирования поражения центральной нервной системы на фоне перенесенной новой коронавирусной инфекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коронавирусная инфекция, головной мозг, реакция глии, микрососудистая патология.

Для цитирования: Рябцева С. Н., Корнеева М. А., Чеботарь А. О., Семеник И. А., Гузов С. А., Недзьведь М. К. Реактивные изменения глии и микрососудистого русла неокортекса головного мозга пациентов с новой коронавирусной инфекцией. *Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова.* 2023;15(4):129–133. DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_4_129

GLIAL AND MICROVASCULAR VESSELS REACTIVE CHANGES IN BRAIN NEOCORTEX OF PATIENTS WITH A NEW CORONAVIRUS DISEASE

S. N. Rjabceva¹, M. A. Korneeva¹, A. O. Chabatar¹, I. A. Siamionik¹, S. A. Guзов², M. K. Nedzvedz²

¹Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, 28, Akademicheskaya st., Minsk, Belarus, 220012,

²Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky Ave., 83, Minsk, Belarus, 220083

SUMMARY. Brain damage against the background of a new coronavirus disease is characterized by a wide range of clinical and morphological manifestations: from cognitive impairment to massive strokes. However, the response of glia and the microvascular changes in the cerebral cortex in asymptomatic CNS lesions against the background of COVID-19 have not been studied enough.

PURPOSE OF THE STUDY: to analyze the glial-vascular reaction of the brain of patients with COVID-19.

MATERIALS AND METHODS: In the course of the study, a comparative characteristic of reactive changes in the glial and vascular components of the brain tissue of patients who died of heart failure (n=5) and patients infected with the SARS-CoV-2 virus and died of respiratory failure (n=10) was performed.

RESULTS. In patients with COVID-19, the expression of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein marker in the cytoplasm of neurons was detected. The glial-microvascular reaction was characterized by reactive astrocytes proliferation and hypertrophy, reactive microglial cells proliferation with an increase in the proportion of intermediate and activated morphotypes and changes in the capillaries and arterioles.

CONCLUSION. Reactive changes in astrocytes and microglial cells indicated neurodegenerative processes in the brain of patients infected with a new strain of coronavirus, which, in combination with pathology of the microvasculature, can cause further progression of central nervous system damage against the background of COVID-19.

KEY WORDS: coronavirus infection, brain, glial reaction, microvascular pathology.

For citation: Rjabceva S. N., Korneeva M. A., Chabatar A. O., Siamionik I. A., Guзов S. A., Nedzved M. K. Glia and microvascular vessels reactive changes in brain neocortex of patients with a new coronavirus disease. *Rossiiskii neurokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova*. 2023;15(4):129–133. DOI 10.56618/2071–2693_2023_15_4_129

Введение.

Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная новым штаммом коронавируса SARS-CoV-2, распространилась по всему миру и стала причиной глобальной пандемии. Несмотря на то, что COVID-19 — преимущественно респираторное заболевание, с самых первых дней пандемии стали появляться доказательства того, что SARS-CoV-2 способен проникать в мозг и вызывать когнитивные нарушения [1,2]. О способности многих вирусов проникать в центральную нервную систему и вызывать серьезные повреждения нервных клеток, а также клеток глии, что приводит к серьезному отеку мозга, энцефалиту, менингиту и другим последствиям, известно давно [3,4].

Цель. Оценить глиально-сосудистой реакции головного мозга при инфицировании новым штаммом коронавируса.

Материалы и методы: гистологическое исследование выполнено на образцах лобной и теменной доли правого полушария головного мозга пациентов, умерших от сердечной недостаточности, у которых отсутствовали признаки инфицирования новым штаммом коронавируса (контрольная группа, n=5), а также пациентов с коронавирусной инфекцией (n=10). Непосредственной причиной смерти пациентов с COVID-19 была прогрессирующая дыхательная недостаточность вследствие поражения легких. В данном исследовании исключены пациенты, у которых отмечены клинические признаки острых и/или хронических психоневрологических заболеваний, а также были выявлены на макро- или микроскопическом уровне воспалительная инфильтрация головного мозга, геморрагический или ишемический инсульты. Вирусная инфекция была подтверждена методом полимеразной цепной реакции на фрагменты РНК вируса SARS-CoV-2.

На гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью программного приложения ImageJ (США) измеряли внутренний и внешний диаметры артериол неокортекса. На основе полученных данных рассчитывали склеротический индекс, площадь периваскулярного пространства, площадь просвета артериол и толщину сосудистой стенки, согласно формулам разработанным Y. Yamamoto et al. [5].

Микрофотографии делали с помощью микроскопа Optec BK5000 (Optec, Китай) при увеличении $\times 400$ (площадь поля зрения составила 66585,35 мкм²). Клеточную плотность астроцитов и клеток микроглии подсчитывали с использованием программы анали-

за изображений «ImageJ» (США) и ее приложения «Multi-point». Клетки микроглии были также разделены на три группы: неактивный, промежуточный и активированный или амебоидный морфологический тип [6,7].

Иммуногистохимическое исследование выполнено со следующими антителами: глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP, P14136, FineTest, в разведении 1:20000), маркер микроглиальных клеток (Iba-1, клон AIF1, P55008, FineTest, в разведении 1:1000), антитело к белку нуклеокапсида нового штамма коронавируса (anti-SARS-Cov-2 Nucleocapsid protein, ab281297, клон HL448, Abcam, в разведении 1:1000) и коллаген 4 типа (клон M0785, Dako, в разведении 1:100) с ночной инкубацией при температуре 4°C. Демаскировка антигенов выполнена в водяной бане при температуре 96°C в течение 20 минут. Визуализация иммуногистохимической реакции проводилась с помощью полимерной системы Mouse/Rabbit UnoVue HRP Detection system (инкубация в течении одного часа при температуре 37°C) и хромогена DAB (UMR 1000PD, DiaGnostic BioSystems, США).

Оценка целостности базальной мембраны проводилась по характеру экспрессии коллагена IV типа с помощью полуколичественной шкалы, разработанной S. Skuja et al. [8]: grade I — базальная мембрана без видимых изменений или изменения затрагивали не более 30 % её периметра, grade II — отсутствие экспрессии коллагена IV типа на 30–50 % периметра сосуда, grade III — экспрессия коллагена IV типа не обнаруживалась в более чем 50 % периметра капилляра.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программы Statistica 10.0. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (при ненормальном распределении признака) и в виде среднего значения и ошибки средней (при нормальном распределении признака). С целью проверки статистической нулевой гипотезы об однородности групп исследования использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты. В головном мозге пациентов первой группы исследования экспрессия SARS-Cov-2 nucleocapsid protein была отрицательной. Во второй группе исследования положительная реакция к данному маркеру выявлена в цитоплазме нейронов и астроцитов неокортекса больших полушарий и базальных ядер головного мозга пациентов (рисунк).

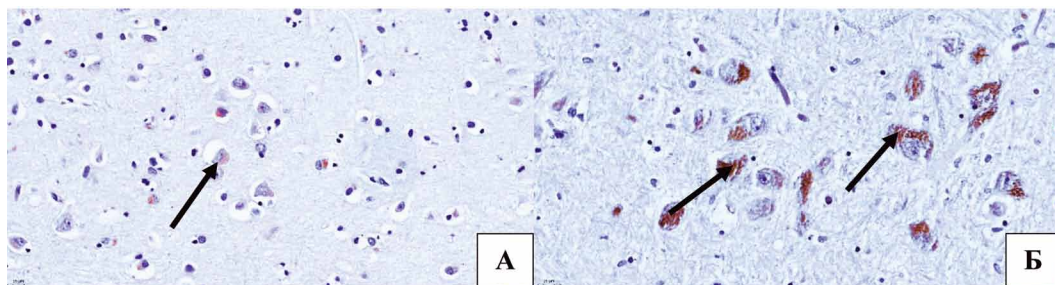


Рисунок. Характер экспрессии маркера SARS-Cov-2 Nucleocapsid protein в цитоплазме нейронов головного мозга пациентов с новой коронавирусной инфекцией: А — слабая экспрессия в цитоплазме нейронов (стрелка) коры больших полушарий, Б — выраженная экспрессия в цитоплазме нейронов (стрелки) базальных ядер головного мозга, иммуногистохимия, шкала — 20 мкм.

Figure. The SARS-Cov-2 Nucleocapsid protein expression in neurons cytoplasm in the brain of patients with a new coronavirus infection: А — weak expression in the cytoplasm of cerebral cortex neurons (arrow), В — strong expression in cytoplasm of neurons (arrows) in the basal nuclei of brain, immunohistochemistry, scale — 20 μ m.

Толщина глиальной пиальной пластинки у пациентов с вирусной инфекцией в 1,93 раз превышала контрольные значения (12,4 (8,9;16,7) мкм против 6,4 (5,3;7,8) мкм, $p<0,001$), что может указывать на пролиферацию коротких отростков интерламнарных астроцитов при развитии сосудистой патологии. Клеточная плотность интерламнарных астроцитов во второй группе в 2,13 раз превышала контрольные значения (270,1 (255,1;285,1) клеток/мм² против 126,8 (104,4;149,9) клеток/мм², $p<0,001$). Площадь тел астроцитов I слоя коры правого полушария головного мозга пациентов с COVID-19 была выше в 1,10 раза контрольных данных (56,9 (44,5;75,0) мкм² против 51,7 (41,7;64,6) мкм², $p=0,003$).

Во второй группе исследования плотность протоплазматических астроцитов III слоя неокортекса головного мозга в 2,51 раз превышала контрольные значения (150,0 (135,0;165,0) клеток/мм² против 59,7 (44,8;59,7) клеток/мм², $p<0,001$), при этом площадь тел протоплазматических астроцитов III слоя неокортекса пациентов второй группы исследования в 1,45 раз была выше контрольных данных (80,2 (65,5;116,9) мкм² против 55,4 (44,9;67,7) мкм², $p=0,003$).

Клеточная плотность протоплазматических астроцитов V слоя неокортекса пациентов второй группы исследования превышала в 1,84 раз контрольные данные (165,0 (120,0;195,0) клеток/мм² против 89,5 (44,8;119,4) клеток/мм², $p<0,001$). Площадь тел астроцитов V слоя неокортекса головного мозга пациентов второй группы исследования в 2,03 раза была выше контрольных значений (89,3 (75,2;109,5) мкм² против 43,9 (35,6;55,7) мкм², $p<0,001$).

Медиана клеточной плотности микроглии в коре правого полушария головного мозга пациентов первой группы составила 74,3 (65,9;90,7) клеток/мм², второй — 98,9 (82,5;123,7) клеток/мм² ($p<0,001$). Клетки микроглии в неактивной форме у пациентов первой группы исследования определялись в количестве 7,0 (6,0;9,0) клеток в поле зрения, во второй группе — 1,0 (0,0;2,0) клетка в поле зрения ($p<0,001$). Микроглиальные клетки в промежуточной

форме определялись в количестве 2,0 (1,0;3,0) клетки в поле зрения в контрольной группе и в количестве 8,5 (6,0;10,0) клеток в поле зрения у пациентов с COVID-19 ($p<0,001$). Количество клеток микроглии в активированной форме в неокортексе головного мозга пациентов без коронавирусной инфекции было 0,0 (0,0;0,0) клеток в поле зрения, у пациентов второй группы — 2,0 (1,0;3,0) клетки в поле зрения.

В неокортексе лобной и теменной доли правого полушария головного мозга пациентов первой группы исследования диаметр капилляров ($n=1020$) был $5,68\pm 1,74$ мкм. Целостность базальной мембраны капилляров оценена как grade 1 в 43,43 % сосудов, как grade 2 — в 48,33 % и grade 3 — в 8,24 % анализируемых капилляров. Медиана склеротического индекса артериол ($n=184$) составила 0,42 (0,33;0,49), площади просвета артериол — 620,9 (394,8;1008,2) мкм², площади периваскулярного пространства — 424,4 (81,5;1089,9) мкм². Медиана толщины сосудистой стенки была 5,7 (4,5;7,9) мкм.

У пациентов второй группы исследования в неокортексе лобной и теменной доли правого полушария головного мозга диаметр капилляров ($n=2659$) был $4,85\pm 1,75$ мкм. Целостность базальной мембраны капилляров оценена как grade 1 в 0,3 % сосудов, как grade 2 — в 53,7 % и как grade 3 — в 46,0 % анализируемых капилляров. Медиана склеротического индекса артериол ($n=268$) составила 0,52 (0,46;0,60), площади просвета сосуда — 755,0 (506,6;1236,9) мкм², площади периваскулярного пространства — 1782,9 (1019,6;3035,1) мкм², толщины сосудистой стенки — 7,9 (6,5;10,2) мкм.

При статистической обработке данных установлено, что у пациентов с COVID-19 выявлены достоверно значимые изменения со стороны циркуляторного русла: сужение капилляров ($p<0,001$) с нарастанием доли капилляров с нарушением целостности коллагена 4 типа базальной мембраны в 3 балла ($p<0,001$), нарастание склеротического индекса ($p<0,001$), расширение просвета артериол ($p=0,005$), расширение периваскулярного пространства ($p<0,001$) и уве-

личение толщины стенки артериол ($p < 0,001$). При этом изменения толщины стенки и склеротического индекса происходило за счет отека стенки артериол.

Заключение. Пациенты групп исследования не имели признаков нейроинфекции или другой острой патологии ЦНС. Ввиду того, что в цитоплазме клеток головного мозга пациентов с новой коронавирусной инфекции выявлена экспрессия белка нуклеокапсида вируса SARS-Cov-2, было расценено, что у данных пациентов новая коронавирусная инфекция протекала с бессимптомным поражением головного мозга.

В ходе исследования обнаружены изменения глиальной реакции и микрососудистого компонента вещества головного мозга у пациентов с COVID-19. Выявлено сужение капилляров с нарастанием доли капилляров с выраженным нарушением целостности базальной мембраны, отек стенки артериол характеризовался увеличением её толщины и нарастанием склеротического индекса, также отмечены расширение площади просвета артериол и периваскулярного пространства вокруг них. Выявленные изменения микрососудистого русла могут быть проявлением общего воспалительного процесса или общей гипоксии, обусловленных прогрессированием интерстициальной пневмонии. Однако не следует исключать возможность локальной причины микрососудистой патологии при репликации вируса в нейронах головного мозга. Независимо от причин развития выявленные микроциркуляторные изменения указывают на нарушение гемодинамики в головном мозге пациентов с новой коронавирусной инфекцией на микроциркуляторном уровне, что усугубляет гипоксию головного мозга.

Реактивная пролиферация и гипертрофия астроцитов оценена как проявление изменения гомеостаза веществ головного мозга, что обусловлено как нарушением гемодинамического и трофического гомеостазов, так и поражением нейронов. Реактивная пролиферация и активация клеток микроглии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией указывала на ультраструктурные поражения вещества головного мозга, в первую очередь нейронов, т.е. развитие нейродегенеративного процесса.

Таким образом, при бессимптомном течении поражения головного мозга у пациентов с COVID-19

выявлены признаки нейродегенеративного процесса в сочетании с микрососудистой патологией. Дальнейшая динамика поражения нейронов при COVID-19 остаются малоизученными.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Трансляционная медицина», задание 4.1.1.1 «Изучение роли морфологических изменений вещества головного мозга при развитии опухолевых и неопухолевых процессов в прогрессировании заболеваний центральной нервной системы» (2021–2025 гг.)

Financing. The study was carried out within the framework of the State Research Program of the Republic of Belarus “Translational medicine”, project 4.1.1.1 “Studying the role of morphological changes in the brain tissue during the development of tumor and non-tumor processes in the progression of diseases of the central nervous system”.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики:

Все пациенты подлежали обязательному патологоанатомическому исследованию, согласно Закону Республики Беларусь «О здравоохранении». **Compliance with patient rights and principles of bioethics.** All patients were subject to mandatory autopsy, in accordance with the Law of the Republic of Belarus «On Health Care».

ORCID авторов / ORCID of authors

Рябцева Светлана Николаевна /
Rjabceva Svetlana Nikolaevna
<https://orcid.org/0000-0001-5960-3656>

Корнеева Марина Александровна /
Korneeva Marina Alexandrovna
<https://orcid.org/0000-0002-7882-6107>

Семёник Ирина Александровна /
Siamionik Iryna Alexandrovna
<https://orcid.org/0000-0002-7520-1945>

Чеботарь Анастасия Олеговна /
Chabatar Anastasia Olegovna
<https://orcid.org/0000-0002-2611-9726>

Гузов Сергей Андреевич /
Gusov Sergej Andreevich
<https://orcid.org/0000-0002-6949-362X>

Недзведзь Михал Константинович /
Nedzvedz Michail Konstantinovich
<https://orcid.org/0000-0001-9479-2288>

Литература/References

1. Zubair A. S., McAlpine L. S., Gardin T., Farhadian S., Kuruvilla D. E., Spudich S. Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. *JAMA Neurol.* 2020;77(8):1018–27. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2065>
2. Pleasure SJ, Green AJ, Josephson SA. The spectrum of neurologic disease in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pandemic infection: neurologists move to the frontlines. *JAMA Neurol.* 2020;77(6):679–80. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1065>
3. Leung A. K., Davies H. D., Hon K. L. Rabies: epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. *Adv. Ther.* 2007;24(6):1340–1347. <https://doi.org/10.1007/BF02877781>
4. Masmejan S., Musso D., Vouga M., Pomar L., Dashraath P., Stojanov M., Panchaud A., Baud D. Zika Virus. *Pathogens.* 2020;9:155–163. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110898>

5. Yamamoto Y., Ihara M., Tham C., Low R. W.C., Slade J. Y., Moss T., Oakley A. E., Povlikoski T., Kalaria R. N. Neuropathological Correlates of Temporal Pole White Matter Hyperintensities in CADASIL. *Stroke*. 2009;40(6):2004–11. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528299>
6. Garden G. A. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia*. 2002;40(2):240–251. <https://doi.org/10.1002/glia.10155>
7. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7:3. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00003>
8. Skuja S., Jain N., Smirnovs M., Murovska M. Alcohol-induced alterations in the vascular basement Membrane in the Substantia Nigra of the Adult Human Brain. *Biomedicines*. 2022;10(4):830. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040830>