

Морфологические изменения головного мозга при COVID-19

А. С. Бабкина^{1,2*}, А. М. Голубев^{1,2}, И. В. Острова¹, А. В. Волков^{1,2,3}, А. Н. Кузовлев¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ Государственная клиническая больница им. Е. О. Мухина ДЗМ,
Россия, 111399, г. Москва, Федеративный проспект, д.17

Brain Morphological Changes in COVID-19

Anastasia S. Babkina^{1,2*}, Arkady M. Golubev^{1,2},
Irina V. Ostrova¹, Alexei V. Volkov^{1,2,3}, Artem N. Kuzovlev¹

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia
25 Petrovka Str., 2 bldg, 10703 Moscow, Russia

² Peoples Friendship University of Russia
6 Miklukho-Maklaya Str., 117198 Moscow, Russia

³ E. O. Mukhin State Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department
17 Federativny Prospekt, Moscow 111399, Russia

Для цитирования: А.С. Бабкина, А.М. Голубев, И.В. Острова, А.В. Волков, А.Н. Кузовлев. Морфологические изменения головного мозга при COVID-19. *Общая реаниматология*. 2021; 17 (3): 4–15. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-3-1-0> [На русск. и англ.]

For citation: Anastasia S. Babkina, Arkady M. Golubev, Irina V. Ostrova, Alexei V. Volkov, Artem N. Kuzovlev. Brain morphological changes in COVID-19. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2021; 17 (3): 4–15. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-3-1-0> [In Russ. and Engl.]

Резюме

Цель исследования — выявить морфологические признаки повреждения головного мозга умерших от COVID-19.

Материал и методы. Провели анализ протоколов вскрытий и аутопсийного материала головного мозга 17 умерших пациентов с прижизненно подтвержденной инфекцией COVID-19. В исследование включили случаи летального исхода, в которых COVID-19 явилась основной причиной смерти. У 5 человек диагностировали инфаркт головного мозга. Кусочки органов для гистологического исследования изымали в ходе патологоанатомического исследования. Для выявления морфологических изменений головного мозга срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ниссля. Для исследования состояния базальных мембран сосудов применяли ШИК-реакцию, для выявления фибрина в сосудах использовали окраску гематоксилином Р.Т.А.Н. фосфовольфрамовым кислотом, для выявления ДНК в ядрах срезы окрашивали по Фельгену, для выявления РНК в ядрах и цитоплазме нейронов срезы красили метиловым зеленым пиронином. Для оценки повреждения нейронов проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование нейронального маркера — ядерного белка NeuN.

Результаты. Выявили признаки повреждения нейронов у умерших от COVID-19, заключающиеся в неспецифических изменениях нервных клеток (острое набухание, первичное раздражение, кардиоцитоз, клетки-тени, нейронафагия и сателлитоз) и признаках нарушения кровообращения (периваскулярный и перичеселлярный отек, диапедезные кровоизлияния, стазы, полнокровие сосудов микроциркуляторного русла).

Заключение. Морфологические изменения головного мозга свидетельствуют о повреждении центральной нервной системы у больных COVID-19. Ишемический инсульт у пациентов с COVID-19 во многом обусловлен сочетанием гипоксии, развивающейся вследствие дыхательной недостаточности, и существующих у больного факторов риска — атеросклероза артерий основания головного мозга и гипертонической болезни.

Ключевые слова: COVID-19; головной мозг; нейротропность вируса SARS-CoV-2; ишемический инсульт; морфология; NeuN

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Адрес для корреспонденции:

*Анастасия Сергеевна Бабкина
E-mail: asbabkina@gmail.com

Correspondence to:

*Anastasia S. Babkina
E-mail: asbabkina@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60352.

Summary

The aim of the study was to identify the pathomorphology of brain damage in patients who died of COVID-19.

Material and methods. Autopsy reports and autopsy brain material of 17 deceased patients with pre-mortem confirmed COVID-19 infection were analyzed. Fatal cases in which COVID-19 was the major cause of death were included in the study. Five people were diagnosed with cerebral infarction. Organ samples were taken for histological examination during autopsy. Sections were stained with hematoxylin and eosin and by Nissl to assess brain histopathology. To study the vascular basal membranes the PAS reaction was used, to detect fibrin in vessels phosphotungstic acid-hematoxylin (PTAH) staining was used, to determine DNA in nuclei sections were stained according to Feulgen, to detect RNA in neuronal nuclei and cytoplasm sections were stained with methyl green-pyronin. Immunohistochemical study of a neuronal marker, nuclear protein NeuN, was performed to assess neuronal damage.

Results. The signs of neuronal damage found in patients who died of COVID-19 included nonspecific changes of nerve cells (acute swelling, retrograde degeneration, karyolysis and cytolysis, 'ghost' cells, neuronophagia and satellitosis) and signs of circulatory disorders (perivascular and pericellular edema, diapedesis, congested and engorged microvasculature).

Conclusion. Brain histopathological data indicate damage to the central nervous system in COVID-19 patients. Ischemic stroke in patients with COVID-19 is mostly caused by a combination of hypoxia resulting from respiratory failure and individual risk factors, including cerebrovascular atherosclerosis and hypertension.

Keywords: COVID-19; brain; neurotropic action of SARS-CoV-2 virus; ischemic stroke; morphology; NeuN

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The reported study was funded by RFBR, project number 20-04-60352.

DOI:10/15360/1813-9779-2021-3-1-0

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. По состоянию на апрель 2021 года с начала пандемии Всемирной организацией здравоохранения зарегистрировано около 3 млн смертей от новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 [1].

Морфологические исследования внутренних органов пациентов, умерших от COVID-19, выявляют признаки нарушения кровообращения, повреждения легких, характерные для острого респираторного дистресс-синдрома, а также неспецифические повреждения внутренних органов [2, 3].

Несмотря на преобладание респираторных симптомов при COVID-19, согласно данным разных исследований, у 36–69% заболевших новой коронавирусной инфекцией отмечаются anosmia, головная боль, головокружение, судороги, острые нарушения мозгового кровообращения, что подразумевает вероятность вовлечения центральной нервной системы в патогенез новой коронавирусной инфекции [4].

Ретроспективное когортное исследование 952 случаев ишемического инсульта при COVID-19 и 952 случаев ишемического инсульта без COVID-19 (контрольная группа) показало более низкую выживаемость у пациентов с ишемическим инсультом и COVID-19 (78,3% против 91,0%, $p < 0,0001$). Вероятность 60-дневной смертности была значительно выше для

Introduction

The novel coronavirus infection (COVID-19) is a major public health challenge worldwide. As of April 2021, about 3 million deaths from a novel coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 have been reported by the World Health Organization since the beginning of the pandemic [1].

Morphological studies of internal organs of patients who died from COVID-19 reveal signs of circulatory disorders, lung damage typical for acute respiratory distress syndrome, as well as nonspecific internal organ damage [2,3].

Despite the predominance of respiratory symptoms in COVID-19, according to various studies, anosmia, headache, dizziness, seizures, and acute cerebrovascular accidents are observed in 36–69% of patients with the novel coronavirus infection, suggesting involvement of the central nervous system in the pathogenesis of COVID-19 [4].

A retrospective cohort study of 952 ischemic strokes in COVID-19 patients and 952 ischemic strokes in COVID-19 free patients (control group) showed low survivability in patients with ischemic stroke and COVID-19 (78.3% vs 91.0%, $P < 0.0001$). The odds of 60-day mortality was significantly higher for patients with ischemic stroke and COVID-19 compared with controls (odds ratio 2.51, 95% confidence interval 1.88–3.34) [5].

It is still unclear whether the brain injury is directly caused by cytopathic effect of virus or due to hypoxia resulting from respiratory failure and coagulopathy complicating the COVID-19.

пациентов с ишемическим инсультом и COVID-19 по сравнению с контролем [5].

Вопрос о том, является ли повреждение головного мозга прямым следствием цитопатических эффектов вируса или обусловлен гипоксией, возникающей вследствие дыхательной недостаточности, коагулопатией, осложняющими течение COVID-19, остается открытым.

Исходя из проведенных на сегодняшний день исследований, нельзя исключить возможность непосредственного повреждения головного мозга вследствие нейротропности вируса. Предполагают, что существует два пути проникновения вируса в центральную нервную систему (ЦНС):

1) ретроградный аксональный путь из инфицированных обонятельного или блуждающего нервов;

2) гематогенный путь, при котором вирус распространяется в ЦНС через поврежденные эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [6].

Известно, что ангиотензинпревращающий фермент II типа (АПФ2), который является основным рецептором для проникновения в клетку SARS-CoV-2 присутствует в эндотелиальных клетках сосудов мозга человека [7, 8]. Согласно исследованию Paniz-Mondolfi и соавт., в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга пациента, умершего от COVID-19, были обнаружены вирусные частицы с помощью электронной микроскопии [9].

В исследовании Т. Р. Buzhdygan и соавт. на микрофлюидной 3D-модели ГЭБ продемонстрирована способность субъединицы S1 S-белка коронавируса SARS-CoV-2 нарушать целостность ГЭБ, а также индуцировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов и матричных металлопротеиназ в эндотелиальных клетках мозга, что также может способствовать изменению состояния ГЭБ [8]. В экспериментальном исследовании на мышах также была показана возможность проникновения коронавируса через ГЭБ. [10]

Механизмы повреждения ЦНС при COVID-19 могут быть уточнены в результате тщательных морфологических исследований, так как патологоанатомический анализ является необходимым условием для наиболее полного представления о закономерностях патологических процессов. В настоящее время данные о патоморфологических изменениях в головном мозге при COVID-19 малочисленны и не систематизированы.

Цель исследования — выявить морфологические признаки повреждения головного мозга умерших от COVID-19.

Based on currently available data, the possibility of direct brain damage due to the neurotropic nature of the virus cannot be ruled out. There are two possible ways for the virus to enter the central nervous system (CNS):

1) the retrograde axonal route from infected olfactory or vagal nerves;

2) the hematogenous route with the virus invading the CNS through damaged endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB) [6].

Angiotensin-converting enzyme type II (ACE2), which is the main receptor for SARS-CoV-2 cell entry, is known to be present in vascular endothelial cells of human brain [7, 8]. According to a study by Paniz-Mondolfi et al., the viral particles were detected in the endothelial cells of brain arteries of a patient who died of COVID-19 using electron microscopy [9].

A study by T. P. Buzhdygan et al. using a 3D microfluidic model of the BBB demonstrated the ability of the S1 subunit of the Sars-CoV-2 coronavirus protein to disrupt the BBB integrity and induce the expression of proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase genes in brain endothelial cells, which can also promote BBB alterations [8]. An experimental murine study also showed the possibility of coronavirus crossing the BBB. [10]

The mechanisms of brain damage in COVID-19 can be clarified by meticulous morphological studies, since pathological analysis is a prerequisite for a comprehensive understanding of disease patterns. Currently, data on pathomorphological changes in the brain in COVID-19 are scarce and not systematized.

The aim of the study was to reveal morphological evidence of brain damage in patients who died from COVID-19.

Materials and Methods

We analyzed autopsy reports and autopsy brain material of 17 patients (12 men and 5 women) who died between October 20 and November 10, 2021, with the coronavirus infection confirmed while alive. The study included fatal cases in which novel coronavirus infection (COVID-19) was the primary cause of death. In all cases, the infection was complicated by multisegmental pneumonia with total/subtotal involvement of both lungs. Five patients were diagnosed with brain infarction. Autopsy protocols revealed evidence of chronic hypertension in 15 patients (88%), whereas cerebrovascular atherosclerosis in combination with hypertension was detected in 11 persons (64%). The average age of victims was 63 years (ranging from 45 to 79 years). The hospital stay averaged 11 days (ranging from a few hours to 19 days).

Organ specimens for histological examination were taken during autopsy in accordance with the current legislation to verify the pathological diagnosis and to clarify the cause of death. In accordance with the current guidelines of the Ministry of Health of the Russian Federation, the organ specimens were fixed for 72 hours in the neutral 10% formalin solution [11]. After that, the material

Материал и методы

Провели анализ протоколов вскрытий и аутопсийного материала головного мозга 17 пациентов (12 мужчин и 5 женщин), умерших за период с 20 октября по 10 ноября 2020 года, с прижизненно подтвержденной новой коронавирусной инфекцией. В исследование включили случаи летального исхода, в которых новая коронавирусная инфекция (COVID-19) явилась основной причиной смерти. Во всех случаях осложнением основного заболевания была полисегментарная пневмония с тотальным/субтотальным поражением обоих легких. У 5 человек был диагностирован инфаркт головного мозга. Гипертонической болезнью, согласно протоколам патологоанатомических исследований, страдали 15 человек (88% умерших), атеросклероз сосудов основания головного мозга в сочетании с гипертонической болезнью выявили у 11 человек (64%). Средний возраст умерших составил 63 года (диапазон от 45 до 79 лет). Длительность пребывания в стационаре составляла в среднем 11 койко-дней (диапазон от нескольких часов до 19 койко-дней).

Кусочки органов для гистологического исследования изымали в ходе патологоанатомического исследования в соответствии с действующим законодательством для верификации патологоанатомического диагноза и уточнения причины смерти. В соответствии с действующими Методическими рекомендациями Минздрава Российской Федерации кусочки органов в обязательном порядке фиксировали в течение 72 часов в нейтральном 10% растворе формалина [11]. После чего материал заливали в парафин. Для выявления морфологических изменений головного мозга срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ниссля. Для исследования состояния базальных мембран сосудов применяли ШИК-реакцию, для выявления фибрина в сосудах использовали окраску гематоксилином Р.Т.А.Н. фосфовольфрамовым кислым, для выявления ДНК в ядрах срезы окрашивали по Фельгену, для выявления РНК в ядрах и цитоплазме нейронов срезы красили метиловым зеленым-пионином (БиоВитрум, Россия).

Для оценки повреждения нейронов проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование нейронального маркера — ядерного белка NeuN. Для этого депарафинизированные срезы мозга обрабатывали 3% перекисью водорода в течение 10 минут при комнатной температуре для блокирования эндогенной пероксидазной активности. Затем срезы промывали в 3-х сменах дистиллированной воды, заключали в кассеты для ИГХ окрашивания, промывали в фосфатном буфере (PBS IHC Wash Buffer + Tween, Cell Marque, США). Для предотвращения неспецифического связывания первичных или вторичных антител с белками ткани использовали Protein Block Serum-free (DAKO, Дания) в течение 15 минут. Затем срезы инкубировали 1 ч при температуре 37°C с первичными поликлональными антителами против NeuN (Invitrogen, США) (разведение 1:200 в Antibody Diluent, Abcam, Великобритания). Срезы промывали 2 раза в фосфатном буфере. Иммунохимическую реакцию выявляли с помощью визуализирующей системы Dako REAL TM EnVision TM Detection Systems, Peroxidase/DAB+ (DAKO, Дания). После

was embedded in paraffin. To detect morphological changes in the brain, the sections were stained with hematoxylin and eosin and according to Nissl. To examine the vascular basal membranes, PAS staining was used, to detect fibrin in vessels, the PTAH staining was employed, to find nuclear DNA the sections were stained according to Feulgen method, while for detection of RNA in neuronal nuclei and cytoplasm the methyl green-pyronin staining was used (BioVitrum, Russia).

To assess neuronal damage, immunohistochemical (IHC) study of a neuronal marker, the nuclear protein NeuN, was performed. For this purpose, deparaffinized brain sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase activity. The sections were then washed 3 times with distilled water, placed in IHC staining cassettes, and washed in phosphate buffer (PBS IHC Wash Buffer + Tween, Cell Marque, USA). Protein Block Serum-free (DAKO, Denmark) was used for 15 min to prevent nonspecific binding of primary or secondary antibodies to tissue proteins. Then the sections were incubated for 1 h at 37°C with primary polyclonal antibodies against NeuN (1:200 dilution in Antibody Diluent, Abcam, UK) (Invitrogen, USA). Sections were washed 2 times in phosphate buffer. Immune response was detected using Dako REAL TM EnVision TM Detection Systems, Peroxidase/DAB+ (DAKO, Denmark). After washing the sections in phosphate buffer, they were additionally stained with hematoxylin (BioVitrum, Russia) and embedded in Immumount water-soluble medium (Shandon, USA).

Histological preparations were examined using a Nikon Eclipse Ni-U microscope, a digital camera, and the Nis-Elements BR software (Nikon, Japan).

Results and Discussion

The brain morphological study in patients who died from COVID-19.

The molecular layer of the large hemisphere cortex. In the molecular layer of the large hemisphere cortex, few small rounded neurons with normochromatic nuclei were revealed. The nuclei demonstrated heterochromatin and decentralized nucleoli predominantly. Pericellular and pericapillary edema was noted. In some cases, single hemorrhages per diapedesis were found (fig. 1, a).

The external granular layer contained small neurons with rounded normochromatic nuclei. The preparations stained with hematoxylin and eosin, according to the Feulgen method, demonstrated mainly the peripheral location of chromatin in the nuclei forming small clumps (heterochromatin). Nucleoli were revealed not in all the neurons using the hematoxylin and eosin and methyl green-pyronin staining. Satellitosis of some neurons was noted. Pericellular edema was detected around the majority of neurons.

The pyramidal cell layer showed pyramidal and rounded neurons. Hyperchromic, deformed neurons, and pericellular edema were detected (fig. 1, b). Swelling of some neurons, as well as neuronophagia and satellitosis, were noted (fig. 1, c). In some neurons, the nuclei were not stained (karyolysis). Gran-

промывки срезов в фосфатном буфере их докрашивали гематоксилином (БиоВитрум, Россия) и заключали в водорастворимую среду ImmuMount (Shandon, США).

Исследование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U, цифровой камеры и программы Nis-Elements BR (Nikon, Япония).

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование головного мозга умерших от COVID-19.

Кора больших полушарий головного мозга. В молекулярном слое коры больших полушарий немногочисленные мелкие округлые нейроны с нормохромными ядрами. Выявили в ядрах преимущественно гетерохроматин и децентрализацию ядрышек. Отметили перичеселлюлярный и перикапиллярный отек. В отдельных случаях обнаружили единичные диапедезные кровоизлияния (рис. 1, *a*).

В наружном зернистом слое небольшие нейроны с округлыми нормохромными ядрами. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и методом Фельгена, выявили, что хроматин в ядрах в виде мелких глыбок (гетерохроматин) расположен преимущественно по периферии ядра. При окраске гематоксилином и эозином и метиловым зеленым пиронином ядрышки обнаружили не во всех нейронах. Отметили сателлитоз части нейронов. Вокруг большинства нейронов выявили перичеселлюлярный отек.

В слое пирамидных клеток нейроны пирамидной и округлой формы. Выявили гиперхромные, деформированные нейроны, перичеселлюлярный отек (рис. 1, *b*). Отметили набухание некоторых нейронов, а также нейронофагию, сателлитоз (рис. 1, *c*). В части нейронов ядра не окрашены (кариолизис). Хроматин в ядрах расположен в виде гранул. В ядрах нейронов отметили децентрализацию ядрышек (рис. 1, *d*). Вокруг некоторых капилляров обнаружили небольшие скопления глии, единичные диапедезные кровоизлияния, умеренный перичеселлюлярный и перикапиллярный отек. В области периваскулярного отека отметили разрыхление и разволокнение базальной мембраны стенок сосудов микроциркулярного русла (рис. 1, *e*).

Во внутреннем зернистом слое нейроны округлые небольших размеров. Ядра содержат гранулярный хроматин (гетерохроматин). Выявили сателлитоз, перичеселлюлярный и перикапиллярный отек, полнокровие капилляров, стазы.

Во внутреннем пирамидном слое многие нейроны округлой формы, деформированы. Выявили гиперхромные нейроны с гомогенной цитоплазмой (при окраске гематоксили-

уляр-shaped arrangement of chromatin was seen in nuclei. Decentralized nucleoli were found in the neuronal nuclei (fig. 1, *d*). Small clusters of glia, single diapedetic hemorrhages, moderate pericellular and pericapillary edema were found around some capillaries. In the area of perivascular edema, the basal membrane of microcirculatory vessels was loose and dissociated (fig. 1, *e*).

In the internal granular layer, neurons were rounded and small. The nuclei contained granular chromatin (heterochromatin). Satellitosis, pericellular and pericapillary edema, capillary congestion and stasis were revealed.

In the inner pyramidal layer, many neurons were rounded and deformed. Hyperchromic neurons with homogeneous cytoplasm (hematoxylin and eosin and Nissl staining), neuronal swelling, satellitosis were detected. Lipofuscin granules in the cytoplasm of some neurons were found. Neuronal swelling (fig. 1, *f*), decentralized nucleoli in the neuronal nuclei, pericellular edema were seen. Venules were dilated, engorged and deformed. Stasis, perivascular edema, capillary deformation, small clusters of glia near capillaries were detected.

The polymorphic cell layer revealed dark deformed neurons, satellitosis, neuronophagia, and decentralized nucleoli in the neuronal nuclei. Pericellular edema, venular engorgement, perivascular edema, stasis, and clusters of glia near capillaries were documented.

Subcortical zone. The subcortical neurons were predominantly rounded and light. Nuclei and nucleoli in neurons were displaced. No nucleoli were detected in some neurons. Some neurons had vacuoles and lipofuscin granules in their cytoplasm. Karyolysis, satellitosis, and neuronophagia were detected. Oligodendrocytes in the white matter were arranged in small clusters. Pericellular and pericapillary edema, congested and engorged venules were noted.

Morphological examination of the brains of patients with cerebrovascular accidents who died from COVID-19 revealed areas of necrosis. Microglia cells were found in the necrosis areas. In some preparations granular globules were detected in the areas of necrosis. In several preparations granular globules were absent in the necrosis zone but were found in angiogenesis areas along the infarct periphery. Outside the necrotic zones, the morphological abnormalities observed in the large hemisphere cortex were similar to those seen in patients without stroke. They included pericellular edema, displaced nuclei and nucleoli, satellitosis, neuronophagia, dark deformed neurons, swelling of neuronal bodies and processes, karyolysis. Lipofuscin was detected in the cytoplasm of some neurons. We noted engorged venules and capillaries, small single hemorrhages, perivascular edema. Fibrin was detected in some microcirculatory vessels (fig. 2).

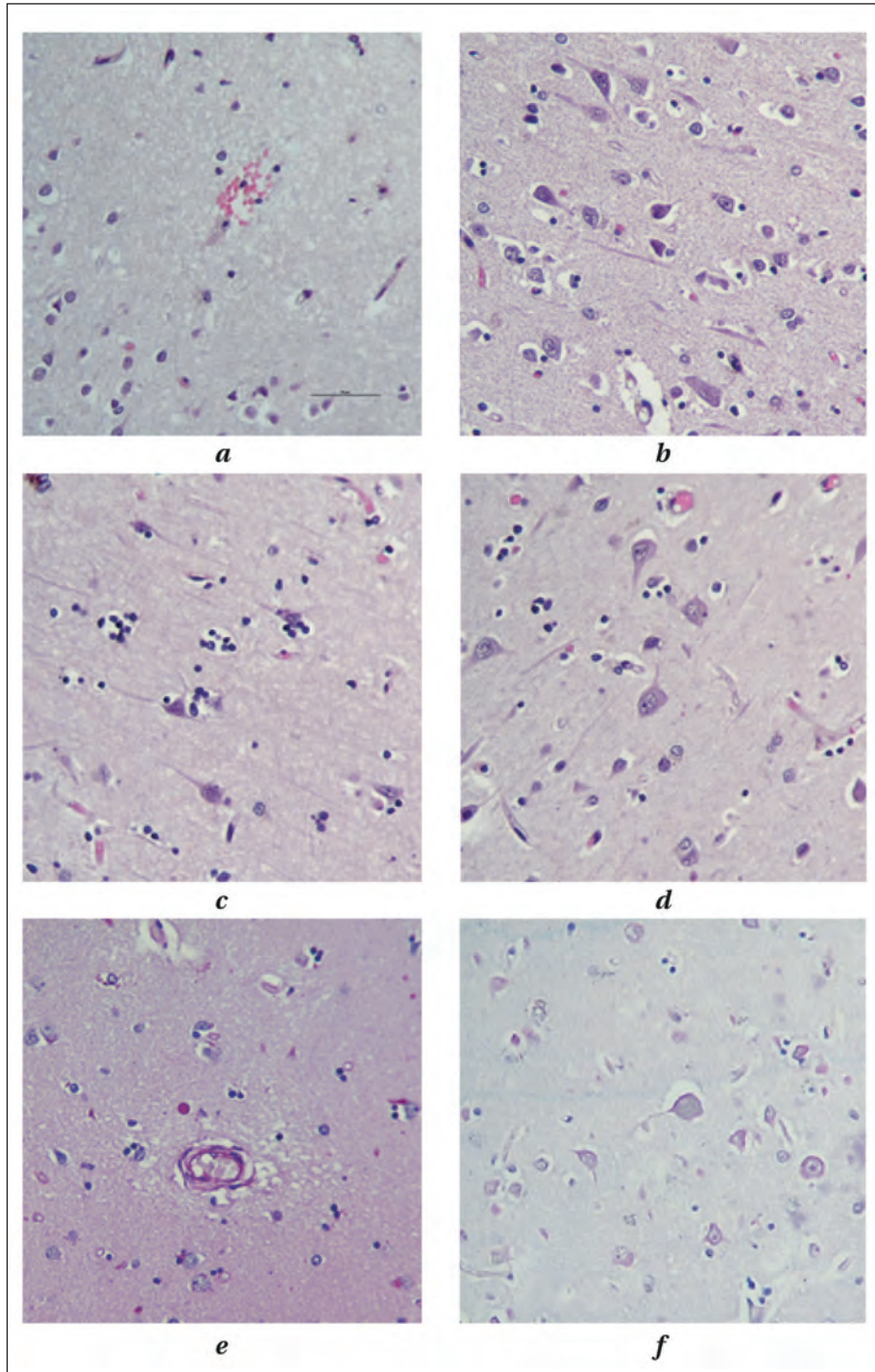


Рис. 1. Кора головного мозга.

Fig. 1. Microscopy of brain cortex sections.

Note. *a* — layer 1: pericellular and pericapillary edema and hemorrhage are seen; *b* — layer 3: hyperchromic neurons, pericellular edema, satellitosis; *c* — layer 3: neuronophagia; *d* — layer 3: de-centralized nuclei and nucleolus; *e* — loosening and dissociation of basal membrane of the vascular wall; *f* — neuronal swelling. Nucleoli were not stained. Hematoxylin and eosin staining (*a-d*). PAS staining (*e*). Methyl green-pyronin staining (*f*), $\times 400$.

Примечание. *a* — 1-й слой: перичеселлюлярный и перикапиллярный отек, кровоизлияние; *b* — 3-й слой: гиперхромные нейроны, перичеселлюлярный отек, сателлитоз; *c* — 3-й слой: нейронафагия; *d* — 3-й слой: децентрализация ядер и ядрышек; *e* — разрыхление и разволокнение базальной мембраны стенки сосуда; *f* — набухание нейрона. Отсутствие окрашивания ядрышка. Окраска гематоксилин-эозином (*a-d*). ШИК-реакция (*e*). Окраска метиловым зеленым пиронином (*f*), $\times 400$.

The IHC study revealed a positive reaction to NeuN protein in all brain tissue samples. At the same time, areas with a complete absence of staining for NeuN protein were detected. These areas corresponded to the areas of necrotic tissue in the preparations stained with hematoxylin and eosin (fig. 3).

The immunohistochemical staining for NeuN protein allowed in most cases to clearly visualize the interface between the necrotic and ischemic penumbra zone (fig. 3). Interestingly, the neurons and even areas with variable IHC staining patterns for NeuN were observed when examining the brain tissue of the patients (fig. 4). Areas with reduced IHC staining for NeuN were detected in the patients both with and without ischemic stroke.

To date, despite numerous studies on the pathogenesis of neurological complications in COVID-19, there is no evidence of a direct neuropathic effect of the Sars-CoV-2 virus [12]. The few studies that have detected viral RNA or particles in the brains of patients who died from COVID-19 cannot be considered as proof of the role of Sars-CoV-2 in the pathogenesis of neurological complications [13].

The present study found nonspecific changes in nerve cells and signs of circulatory disorders in patients who died from COVID-19. Neuronal changes included evidence of severe damage such as gross disruption of cytoplasmic, nuclear, and

ном и эозином и по методу Ниссля), набухание нейронов, сателлитоз. В цитоплазме части нейронов гранулы липофусцина. Отметим набухание нейронов (рис. 1, *ж*), децентрализацию ядрышек в ядрах нейронов, перичеселлюлярный отек. Венулы расширены, полнокровны, деформированы. Выявили стазы, периваскулярный отек, деформацию капилляров, небольшие скопления глии около капилляров.

В слое полиморфных клеток выявили темные деформированные нейроны, сателлитоз, нейронафагию, в ядрах нейронов — децентрализацию ядрышек. Зарегистрировали перичеселлюлярный отек, полнокровие венул, периваскулярный отек, стазы, скопления глии около капилляров.

Подкорковая зона. В подкорковой зоне нейроны преимущественно округлой формы, светлые. Отметим смещение в нейронах ядер и ядрышек. В части нейронов ядрышки не выявили. В цитоплазме некоторых нейронов вакуоли, гранулы липофусцина. Выявили кариолизис, сателлитоз, нейронафагию. В белом веществе олигодендроциты расположены небольшими группами клеток. Отметим перичеселлюлярный и перекапиллярный отек, полнокровие и расширение венул.

При морфологическом исследовании головного мозга умерших от COVID-19 с диагностированными острыми нарушениями мозгового кровообращения зарегистрировали участки некроза. В зоне некроза обнаружили клетки микроглии. В части препаратов в зоне некроза выявили зернистые шары. В некоторых препаратах зернистые шары отсутствовали в зоне некроза, но были обнаружены в участках ангиогенеза по периферии инфаркта. Вне зон некроза в коре больших полушарий отметили такие же морфологические изменения, как и в случаях без острых нарушений мозгового кровообращения: перичеселлюлярный отек, смещение ядер и ядрышек, сателлитоз, нейронафагия, темные деформированные нейроны, набухание тел и отростков нейронов, кариолизис. В цитоплазме части нейронов обнаружили липофусцин. Отметим полнокровие венул и капилляров, небольшие одиночные кровоизлияния, периваскулярный отек. В некоторых сосудах мик-

nucleolar structure, along with karyolysis (pallor of cytoplasm and nucleus, diffuse total lysis of Nissl substance, 'ghost' cells). As a rule, karyolysis was accompanied by neuronophagia. The study also revealed reversible changes consisting in acute neuronal swelling and retrograde degeneration. A large number of neurons with eccentric nuclei and nucleoli is also noteworthy. This feature was most often associated with acute neuronal swelling. According to a study by D. L. McIlwain et al., decentralized nuclei are related to structural changes in the cytoskeleton caused by axonal damage [14]. Damage to axons can be both due to edema-related compression (pericellular edema was found in all the cases studied) and a manifestation of the damaging effect of the virus on the nervous tissue.

The detected karyolysis and cytolysis may be due to hypoxic brain damage, possible neurotropic effects of the Sars-CoV-2 virus, toxic action of drugs used during the hospital treatment of the novel coronavirus infection.

Hypoxia is the most likely cause of neuronophagia detected in all cases. One of the mechanisms of microglia activation under hypoxia is known to be mediated by cytokines [15]. Interleukin-6 and interferon-gamma have a particularly important role in microglial activation and regulation of microglial receptor expression involved in phagocytosis [16]. Increased levels of cytokines, including interleukin-6, have been demonstrated in COVID-19 [17, 18]. An alternative hypothesis is the direct effect of the virus leading to neuronal damage and neuronophagia. Based on the results of our study, we cannot confirm or refuse this hypothesis. However, considering the literature data indicating that the viral invasion into neurons has never been proved, this hypothesis is improbable [19].

The IHC staining for NeuN protein allowed in most cases to clearly visualize the boundary between

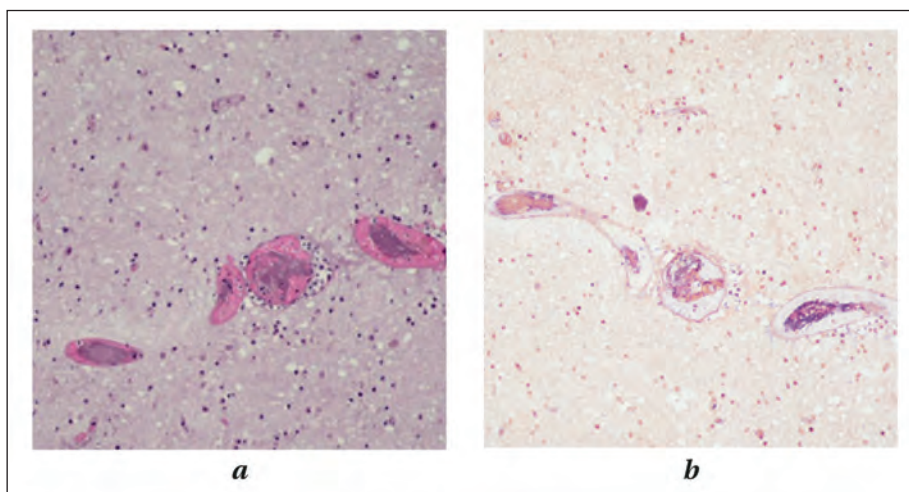


Рис. 2. Подкорковая область головного мозга. Фибрин в сосудах.

Fig. 2. Subcortical brain area. Vascular fibrin visualized.

Note. *a* — hematoxylin and eosin staining; *b* — PTAH staining. $\times 200$.

Примечание. *a* — окраска гематоксилин-эозином; *b* — окраска гематоксилином Р.Т.А.Н. фосфовольфрамовым кислотом. $\times 200$.

роциркуляторного русла выявили фибрин в сосудах (рис. 2).

При ИГХ-исследовании во всех образцах ткани мозга выявили положительную реакцию на белок NeuN. При этом выявили зоны с полным отсутствием окрашивания на белок NeuN. Данные области соответствовали участкам некротизированной ткани на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином (рис. 3).

ИГХ-окрашивание на белок NeuN позволило в большинстве случаев четко визуализировать границу между зоной некроза и зоной так называемой ишемической полутени или пенумбры (рис. 3). Следует отметить, что при исследовании мозговой ткани умерших наблюдали нейроны и даже области с разной ИГХ-реакцией на NeuN (рис. 4). Области с пониженной ИГХ-реакцией на NeuN выявляли как у умерших с диагностированным ишемическим инсультом, так и без него.

На сегодняшний день, несмотря на множество исследований патогенеза неврологических осложнений при COVID-19, не существует доказательств нейрорепаративности вируса SARS-CoV-2 [12]. Немногочисленные исследования, выявившие в отдельных случаях в головном мозге умерших от COVID-19 вирусную РНК или вирусные частицы, не доказывают роль SARS-CoV-2 в патогенезе неврологических осложнений [13].

В настоящем исследовании у пациентов умерших при COVID-19 мы выявили неспецифические изменения нервных клеток и признаки нарушения кровообращения. Изменения нейронов включали в себя признаки тяжелых повреждений (грубое нарушение структуры цитоплазмы, ядра, ядрышек), в том числе — кариолизис (побледнение цитоплазмы и ядра,

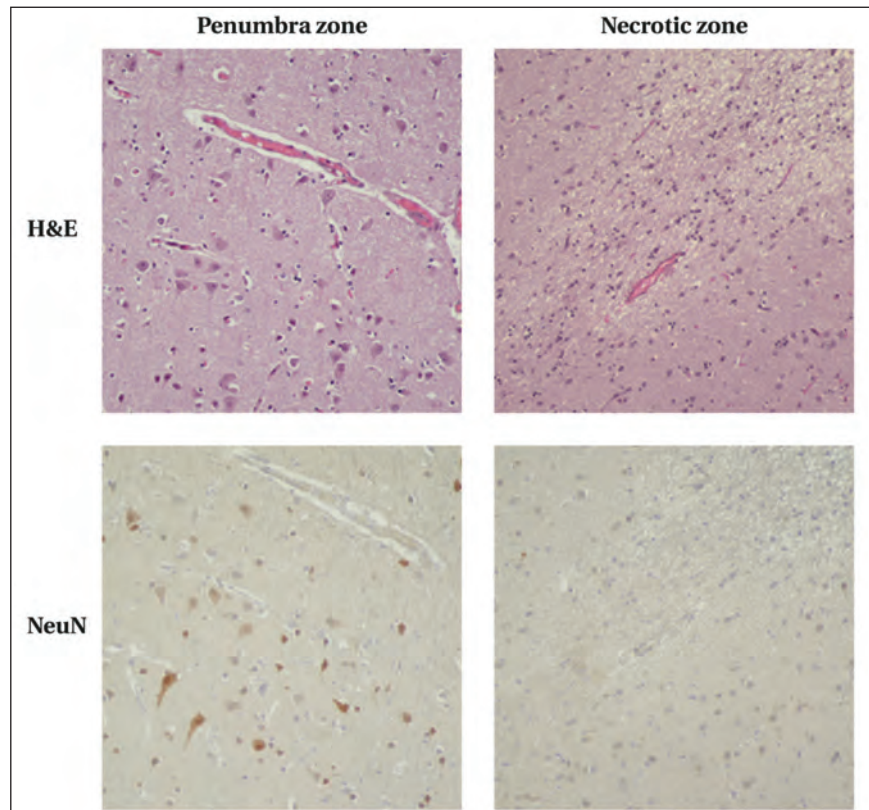


Рис. 3. Экспрессия белка NeuN в разных областях головного мозга.

Fig. 3. The NeuN protein expression in various brain areas.

Note. H&E — hematoxylin and eosin staining; NeuN — immunohistochemical staining for the NeuN protein. $\times 200$.

Примечание. Penumbra/Necrotic zone — зона пенумбры/некроза; H&E — окраска гематоксилин-эозином; NeuN — иммуногистохимическая реакция на белок NeuN. $\times 200$.

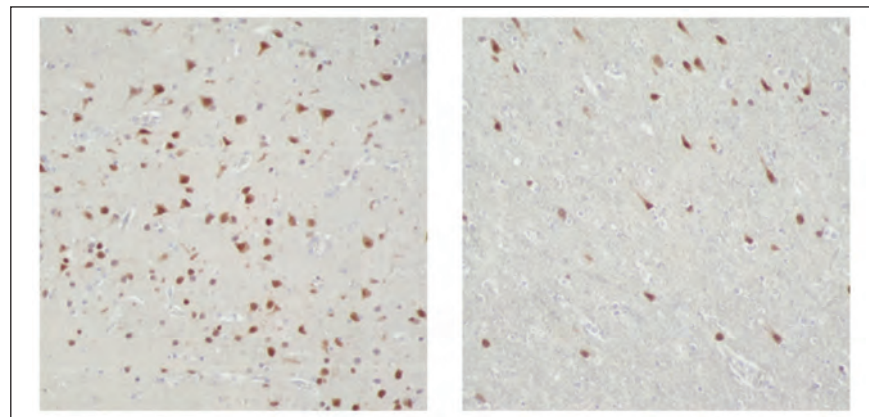


Рис. 4. Участки среза с разной ИГХ-реакцией на NeuN ($\times 200$).

Fig. 4. Sections with different IHC staining for NeuN ($\times 200$).

the necrotic and penumbra zones in the brain of patients with ischemic stroke. The pathophysiological studies have shown that reduced staining for NeuN helps distinguishing the ischemic focus [20, 21]. This method may be used in pathologic histology as well. The NeuN nuclear protein of nerve cells was discovered in 1992. It is present in most mature neurons with rare exceptions but has never been detected in

диффузный тотальный лизис субстанции Ниссля, клетки-тени). Как правило, кариолизис сопровождался нейронофагией. Также выявили обратимые изменения, заключающиеся в остром набухании нейронов и первичном раздражении. Обращает на себя внимание большое количество нейронов с эксцентричным расположением ядер и ядрышек. Этот признак наиболее часто сочетался с острым набуханием нейронов. Согласно исследованию D. L. McIlwain и соавт., децентрализация ядер связана со структурными изменениями цитоскелета, обусловленными повреждением аксонов [14]. Повреждение аксонов может быть как следствием сдавливания их отеком (перичеселлюлярный отек выявили во всех исследуемых случаях), так и проявлением повреждающего действия вируса на нервную ткань.

Выявленные признаки кариоцитолита могут быть обусловлены гипоксическим повреждением головного мозга, возможными нейротропными свойствами вируса SARS-CoV-2, токсическим действием лекарственных препаратов, использовавшихся в стационаре при лечении новой коронавирусной инфекции.

Наиболее вероятной причиной нейронофагии, выявленной во всех исследованных случаях, является гипоксия. Известно, что один из механизмов активации микроглии в условиях гипоксии опосредован цитокинами [15]. Особенно важная роль в активации микроглии и регулировании экспрессии микроглиальных рецепторов, участвующих в фагоцитозе, отводится интерлейкину-6 и интерферону-гамма [16]. Показано, что при COVID-19 отмечается повышенные уровни цитокинов, включая интерлейкин-6 [17, 18]. Альтернативной гипотезой является прямое действие вируса, ведущее к повреждениям нейронов и нейронофагии. Исходя из результатов нашего исследования, подтвердить или опровергнуть данную гипотезу не представляется возможным. Однако, учитывая данные литературы, согласно которым инвазия вируса в нейроны так и не была доказана, данная гипотеза является маловероятной [19].

ИГХ-окрашивание на белок NeuN позволило в большинстве случаев четко визуализировать границу между зоной некроза и зоной пенумбры в головном мозге умерших с диагностированным ишемическим инсультом. Следует отметить, что в патофизиологических исследованиях снижение реакции на NeuN позволяет выделить очаг ишемии [20, 21]. Не исключено, что данный метод может быть применен и в патогистологической практике. Ядерный белок нервных клеток NeuN был открыт в 1992 году. Он присутствует в большинстве зрелых нейронов за редким исключением, но

glial cells. Due to this fact, antibodies to NeuN protein have been actively used for more than 20 years in immunohistochemical studies of neuronal differentiation for assessing the neuronal state and, in the last decade, for the differential diagnosis in neuro-oncological pathology [21–26].

Experimental data indicate that the intensity of the immunocytochemical staining for NeuN in the nucleus and cytoplasm may differ both among nerve cells of the same type and between neurons of different types. Obviously, the differences in the intensity of staining for NeuN represent the differences in cellular expression of this protein related to both the constitutive features of the neuron and its functional state [20].

In general, the loss of NeuN staining properties indicates neuronal damage, but cannot be considered absolute evidence of neuronal death (expected or occurred), which should be remembered when interpreting data from quantitative immunohistochemical studies [20]. In our study, areas with decreased NeuN protein expression were detected in patients both with and without ischemic stroke.

One should note that during autopsy cerebrovascular atherosclerosis as well as evidence of chronic hypertension with predominant heart and kidney damage were detected in 100% (5 cases) of patients diagnosed with ischemic stroke. Importantly, those who had both COVID-19 and cerebral infarction demonstrated 50% and greater stenosis of basilar cerebral arteries, whereas in patients without cerebrovascular accidents, basilar artery atherosclerosis was noted in 42% of cases (5 of 12) and was less than 30%. The above-mentioned conditions are major risk factors for ischemic stroke. Ischemic stroke occurring in COVID-19 is likely to result from a combination of hypoxia, underlying disease, and risk factors. The neurotropic effect of the virus also cannot be excluded since neuronal changes detected in patients with ischemic stroke outside the necrotic zone and in the ones without cerebrovascular accidents are similar.

Conclusion

The present study provides evidence of brain damage in patients who died from COVID-19 manifested as nonspecific neuronal changes (acute swelling of neurons, retrograde degeneration, karyolysis and cytolysis, 'ghost' cells, neuronophagia and satellitosis) along with the signs of circulatory disorders (perivascular and pericellular edema, hemorrhage per diapedesis, stasis, microcirculatory engorgement), which can be due to hypoxia, but also might associate with a direct neurotropic effect of the virus. Ischemic stroke in COVID-19 could be largely due to hypoxia resulting from respiratory failure and coexisting risk factors such as atherosclerosis of basilar cerebral arteries and hypertension.

никогда не обнаруживался в клетках глии. Благодаря этому антитела к белку NeuN уже более 20 лет активно используются в иммуногистохимических исследованиях нейрональной дифференцировки, для оценки состояния нервных клеток в норме и при различных патологических воздействиях, а в последнее десятилетие и в дифференциальной патогистологической диагностике в нейроонкологии [21–26].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что интенсивность иммуногистохимической реакции на NeuN в ядре и цитоплазме может различаться как в пределах нервных клеток одного типа, так и между нейронами разного типа. Очевидно, что различия в интенсивности реакции на NeuN отражают различия в экспрессии данного белка в клетке, связанные как с конститутивными особенностями нейрона, так и с его функциональным состоянием [20].

В целом, считается, что потеря нервными клетками свойства окрашиваться на белок NeuN указывает на их повреждение, но не может быть безусловным свидетельством гибели нейронов (ожидаемой или произошедшей), что следует учитывать при интерпретации данных количественного иммуногистохимического исследования [20]. В нашем исследовании области с пониженной экспрессией белка NeuN выявлялись как у умерших с диагностированным ишемическим инсультом, так и без него.

Следует отметить, что у 100% (5 человек) умерших с ишемическим инсультом при проведении патологоанатомического исследования был выявлен атеросклероз артерий основания головного мозга, а также гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца и почек. Обращает на себя внимание тот факт, что у умерших с COVID-19 и инфарктом

головного мозга стеноз артерий основания головного мозга был больше 50%, в то время как у пациентов, у которых не были отмечены острые нарушения мозгового кровообращения, атеросклероз артерий основания головного мозга был отмечен в 42% случаев (5 человек из 12) и был менее 30%. Эти заболевания являются основными фактором риска ишемического инсульта. Вероятно, ишемический инсульт, возникающий при COVID-19, является следствием сочетания гипоксии, имеющихся заболеваний и факторов риска ишемического инсульта у больного. Также нельзя исключить нейтропатогенность вируса, так как выявленные изменения нервных клеток у пациентов с ишемическими инсультами вне зоны некроза и у пациентов без нарушения мозгового кровообращения аналогичны.

Заключение

Настоящее исследование доказывает наличие повреждения ЦНС у умерших от COVID-19, заключающееся в неспецифических изменениях нервных клеток (острое набухание, первичное раздражение, кариоцитоллиз, клетки-тени, нейтрофагия и сателлитоз) и признаках нарушения кровообращения (периваскулярный и перичеллюлярный отек, диапедезные кровоизлияния, стазы, полнокровие сосудов микроциркуляторного русла), что может быть обусловлено гипоксией, но также не исключает прямое нейтропатогенное действие вируса. Можно предположить, что случаи ишемического инсульта при COVID-19 во многом обусловлены гипоксией, развивающейся вследствие дыхательной недостаточности, и существующих у больного факторов риска — сочетания атеросклероза артерий основания головного мозга и гипертонической болезни.

Литература

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2021. Feb. 8 [cited 2021 April.12]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Самсонова М.В., Михалева Л.М., Зайратьянц О.В., Варясин В.В., Быканова А.В., Мишнев О.Д., Березовский Ю.С., Тишкевич О.А., Гомзикова Е.А., Чернышев А.Л., Хованская Т.Н. Патология легких при COVID-19 в Москве. *Архив патологии*. 2020; 82 (4): 32–40. DOI: 10.17116/patol20208204132
3. Rimmelink M., De Mendonça R., D'Haene N., De Clercq S., Verocq C., Lebrun L., Lavis P., Racu M. L., Trépant A. L., Maris C., Rorive S., Goffard J. C., De Witte O., Peluso L., Vincent J. L., Decaestecker C., Taccone F. S., Salmon I. Unspecific post-mortem findings despite multiorgan viral spread in COVID-19 patients. *Critical care*. 2020; 24 (1): 495. DOI: 10.1186/s13054-020-03218-5
4. Sisniega D.C., Reynolds A.S. Severe Neurologic Complications of SARS-CoV-2. *Curr Treat Options Neurol*. 2021; 23 (5): 14. DOI: 10.1007/s11940-021-00669-1. PMID: 33814894; PMCID: PMC8009931
5. Harrison S.L., Fazio-Eynullayeva E., Lane D.A., Underhill P., Lip G.Y.H. Higher Mortality of Ischaemic Stroke Patients Hospitalized with COVID-19 Compared to Historical Controls. *Cerebrovasc Dis*. 2021; 26: 1-6. DOI: 10.1159/000514137. PMID: 33774618
6. Desforges M., Le Coupanec A., Dubeau P., Bourgouin A., Lajoie L., Dubé M., Talbot P.J. Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous Sy-

References

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2021. Feb. 8 [cited 2021 April.12]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Samsonova M.V., Mikhaleva L.M., Zairatyants O.V., Varyasin V.V., Bykanova A.V., Mishnev O. D., Berezovsky Yu. S., Tishkevich O. A., Gomzikova E. A., Chernyshev A. L., Khovanskaya T.N. Lung pathology of COVID-19 in Moscow. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2020; 82 (4): 32–40. [In Russ.]. DOI: 10.17116/patol20208204132
3. Rimmelink M., De Mendonça R., D'Haene N., De Clercq S., Verocq C., Lebrun L., Lavis P., Racu M. L., Trépant A. L., Maris C., Rorive S., Goffard J. C., De Witte O., Peluso L., Vincent J. L., Decaestecker C., Taccone F. S., Salmon I. Unspecific post-mortem findings despite multiorgan viral spread in COVID-19 patients. *Critical care*. 2020; 24 (1): 495. DOI: 10.1186/s13054-020-03218-5
4. Sisniega D.C., Reynolds A.S. Severe Neurologic Complications of SARS-CoV-2. *Curr Treat Options Neurol*. 2021; 23 (5): 14. DOI: 10.1007/s11940-021-00669-1. PMID: 33814894; PMCID: PMC8009931
5. Harrison S.L., Fazio-Eynullayeva E., Lane D.A., Underhill P., Lip G.Y.H. Higher Mortality of Ischaemic Stroke Patients Hospitalized with COVID-19 Compared to Historical Controls. *Cerebrovasc Dis*. 2021; 26: 1-6. DOI: 10.1159/000514137. PMID: 33774618
6. Desforges M., Le Coupanec A., Dubeau P., Bourgouin A., Lajoie L., Dubé M., Talbot P.J. Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous Sy-

- stem? *Viruses*. 2019; 12 (1): 14. DOI: 10.3390/v12010014. PMID: 31861926; PMCID: PMC7020001
7. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., Lely A.T., Navis G., van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203 (2): 631–637. DOI: 10.1002/path.1570. PMID: 15141377; PMCID: PMC7167720
8. Buzhdygan T.P., DeOre B.J., Baldwin-Leclair A., Bullock T.A., McGary H.M., Khan J.A., Razmpour R., Hale J.E., Galie P.A., Potula R., Andrews A.M., Ramirez S.H. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2020; 146: 105131. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.105131. Epub 2020 Oct 11. PMID: 33053430; PMCID: PMC7547916.
9. Paniz-Mondolfi A., Bryce C., Grimes Z., Gordon R.E., Reidy J., Lednický J., Sordillo E.M., Fowkes M. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Med Virol.* 2020; 92 (7): 699–702. DOI: 10.1002/jmv.25915. PMID: 32314810; PMCID: PMC7264598.
10. Rhea E.M., Logsdon A.F., Hansen K.M., Williams L.M., Reed M.J., Baumann K.K., Holden S.J., Raber J., Banks W.A., Erickson M.A. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat Neurosci.* 2021; 24 (3): 368–378. DOI: 10.1038/s41593-020-00771-8. PMID: 33328624.
11. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 9 (26.10.2020) https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachements/000/052/548/original/%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.9%29.pdf
12. Maury A., Lyoubi A., Peiffer-Smadja N., de Broucker T., Meppiel E. Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A narrative review for clinicians. *Rev Neurol.* 2021; 177 (1–2): 51–64. DOI: 10.1016/j.neurol.2020.10.001. PMID: 33446327; PMCID: PMC7832485.
13. Mukerji S.S., Solomon I.H. What can we learn from brain autopsies in COVID-19? *Neurosci Lett.* 2021; 742: 135528. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135528. PMID: 33248159; PMCID: PMC7687409
14. McIlwain D.L., Hoke V.B. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. *BMC Neurosci.* 2005; 6: 19. DOI: 10.1186/1471-2202-6-19. PMID: 15774011; PMCID: PMC1079867.
15. Brown G.C., Neher J.J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014; 15: 209–216. DOI: 10.1038/nrn3710.
16. Lively S., Schlichter L.C. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ + TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10) *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 215. DOI: 10.3389/fncel.2018.00215.
17. Chen X., Zhao B., Qu Y., Chen Y., Xiong J., Feng Y., Men D., Huang Q., Liu Y., Yang B., Ding J., Li F. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020; 71 (8): 1937–1942. DOI: 10.1093/cid/ciaa449. PMID: 32301997; PMCID: PMC7184354..
18. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine.* 2020; 55: 102763. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102763.
19. Al-Dalahmah O., Thakur K.T., Nordvig A.S., Prust M.L., Roth W., Lignelli A., Uhlemann A.C., Miller E.H., Kunnath-Velayudhan S., Del Portillo A., Liu Y., Hargus G., Teich A.E., Hickman R.A., Tanji K., Goldman J.E., Faust P.L., Canoll P. Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; 8 (1): 147. DOI: 10.1186/s40478-020-01024-2. PMID: 32847628; PMCID: PMC7447601.
20. Алексеева О. С., Гусельникова В. В., Безнин Г. В., Коржевский Д. Э. Перспективы использования ядерного белка NeuN в качестве показателя функционального состояния нервных клеток у позвоночных. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2015; 51 (5): 313–323. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_28359537_60959756.pdf
21. Sommer C. Histology and Infarct Volume Determination in Rodent Models of Stroke. In: Dirnagl U. (ed.) *Rodent models of stroke.* New York, USA: Springer Science+Business Media LLC; 2016: 263–278.
22. Гусельникова В.В., Коржевский Д.Э. NeuN — нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток. *Acta Naturae (русскоязычная версия).* 2015; 7 (2): 25: 46–51. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_23555354_52689797.pdf
23. Ferrucci M., Biagioni F., Lenzi P., Gambardella S., Ferese R., Calierno M.T., Falleni A., Grimaldi A., Frati A., Esposito V., Limatola C., Fornai F. Rapamycin promotes differentiation increasing β III-tubulin, NeuN, and NeuroD while suppressing nestin expression in glioblastoma cells. stem? *Viruses*. 2019; 12 (1): 14. DOI: 10.3390/v12010014. PMID: 31861926; PMCID: PMC7020001
7. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., Lely A.T., Navis G., van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203 (2): 631–637. DOI: 10.1002/path.1570. PMID: 15141377; PMCID: PMC7167720
8. Buzhdygan T.P., DeOre B.J., Baldwin-Leclair A., Bullock T.A., McGary H.M., Khan J.A., Razmpour R., Hale J.E., Galie P.A., Potula R., Andrews A.M., Ramirez S.H. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2020; 146: 105131. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.105131. Epub 2020 Oct 11. PMID: 33053430; PMCID: PMC7547916.
9. Paniz-Mondolfi A., Bryce C., Grimes Z., Gordon R.E., Reidy J., Lednický J., Sordillo E.M., Fowkes M. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Med Virol.* 2020; 92 (7): 699–702. DOI: 10.1002/jmv.25915. PMID: 32314810; PMCID: PMC7264598.
10. Rhea E.M., Logsdon A.F., Hansen K.M., Williams L.M., Reed M.J., Baumann K.K., Holden S.J., Raber J., Banks W.A., Erickson M.A. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat Neurosci.* 2021; 24 (3): 368–378. DOI: 10.1038/s41593-020-00771-8. PMID: 33328624.
11. Iterim guidelines «Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)». Version 9 (26.10.2020). Access mode: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachements/000/052/548/original/%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.9%29.pdf [In Russ.]
12. Maury A., Lyoubi A., Peiffer-Smadja N., de Broucker T., Meppiel E. Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A narrative review for clinicians. *Rev Neurol.* 2021; 177 (1–2): 51–64. DOI: 10.1016/j.neurol.2020.10.001. PMID: 33446327; PMCID: PMC7832485.
13. Mukerji S.S., Solomon I.H. What can we learn from brain autopsies in COVID-19? *Neurosci Lett.* 2021; 742: 135528. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135528. PMID: 33248159; PMCID: PMC7687409
14. McIlwain D.L., Hoke V.B. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. *BMC Neurosci.* 2005; 6: 19. DOI: 10.1186/1471-2202-6-19. PMID: 15774011; PMCID: PMC1079867.
15. Brown G.C., Neher J.J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014; 15: 209–216. DOI: 10.1038/nrn3710.
16. Lively S., Schlichter L.C. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ + TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10) *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 215. DOI: 10.3389/fncel.2018.00215.
17. Chen X., Zhao B., Qu Y., Chen Y., Xiong J., Feng Y., Men D., Huang Q., Liu Y., Yang B., Ding J., Li F. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020; 71 (8): 1937–1942. DOI: 10.1093/cid/ciaa449. PMID: 32301997; PMCID: PMC7184354.
18. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine.* 2020; 55: 102763. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102763.
19. Al-Dalahmah O., Thakur K.T., Nordvig A.S., Prust M.L., Roth W., Lignelli A., Uhlemann A.C., Miller E.H., Kunnath-Velayudhan S., Del Portillo A., Liu Y., Hargus G., Teich A.E., Hickman R.A., Tanji K., Goldman J.E., Faust P.L., Canoll P. Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; 8 (1): 147. DOI: 10.1186/s40478-020-01024-2. PMID: 32847628; PMCID: PMC7447601.
20. Alekseeva O.S., Guselnikova V.V., Beznin G.V., Korzhevsky D.E. Prospects of using the NeuN nuclear protein as an indicator of the functional state of nerve cells in vertebrates. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii.* 2015; 51 (5): 313–323 [In Russ.]. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_28359537_60959756.pdf
21. Sommer C. Histology and Infarct Volume Determination in Rodent Models of Stroke. In: Dirnagl U. (ed.) *Rodent models of stroke.* New York, USA: Springer Science+Business Media LLC; 2016: 263–278.
22. Guselnikova V.V., Korzhevsky D.E. NeuN-neuronal nuclear antigen and marker of differentiation of nerve cells. *Acta Naturae.* 2015; 7 (2): 25: 46–51 [In Russ.]. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_23555354_52689797.pdf
23. Ferrucci M., Biagioni F., Lenzi P., Gambardella S., Ferese R., Calierno M.T., Falleni A., Grimaldi A., Frati A., Esposito V., Limatola C., Fornai F. Rapamycin promotes differentiation increasing β III-tubulin, NeuN, and NeuroD while suppressing nestin expression in glioblastoma cells.

- Oncotarget. 2017; 8 (18): 29574–29599. DOI: 10.18632/oncotarget.15906. PMID: 28418837; PMCID: PMC5444688
24. Rauniyar S., Shen Zh., Lei W., Gu J., Pengjin M., Yu R. Primary granulo-
soma cell tumor of cerebellum: A rare case report. *Interdisciplinary
Neurosurgery*. 2021; 23: 100992 DOI: 10.1016/j.inat.2020.100992.
25. Yoshikawa T., Akiyoshi Y., Susumu T., Tokado H., Fukuzaki K., Nagata
R., Samukawa K., Iwao H., Kito Go. Ginsenoside Rb1 Reduces Neuro-
degeneration in the Peri-infarct Area of a Thromboembolic Stroke
Model in Non-human Primates. *Journal of Pharmacological Sciences*.
2008; 107 (1): 32–40. DOI: 10.1254/jphs.FP0071297.
26. Luo S.Y, Li R., Le Z.Y., Li Q.L., Chen Z.W. Anfibatide protects against
rat cerebral ischemia/reperfusion injury via TLR4/JNK/caspase-3 pa-
thway. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 807: 127–137. DOI: 10.1016/j.ejp-
har.2017.04.002.. PMID: 28390871.

Поступила 18.04.21

- Oncotarget. 2017; 8 (18): 29574–29599. DOI: 10.18632/oncotarget.15906. PMID: 28418837; PMCID: PMC5444688
24. Rauniyar S., Shen Zh., Lei W., Gu J., Pengjin M., Yu R. Primary granu-
losa cell tumor of cerebellum: A rare case report. *Interdisciplinary
Neurosurgery*. 2021; 23: 100992 DOI: 10.1016/j.inat.2020.100992.
25. Yoshikawa T., Akiyoshi Y., Susumu T., Tokado H., Fukuzaki K., Nagata
R., Samukawa K., Iwao H., Kito Go. Ginsenoside Rb1 Reduces Neuro-
degeneration in the Peri-infarct Area of a Thromboembolic Stroke
Model in Non-human Primates. *Journal of Pharmacological Sciences*.
2008; 107 (1): 32–40. DOI: 10.1254/jphs.FP0071297.
26. Luo S.Y, Li R., Le Z.Y., Li Q.L., Chen Z.W. Anfibatide protects against
rat cerebral ischemia/reperfusion injury via TLR4/JNK/caspase-3 pa-
thway. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 807: 127–137. DOI: 10.1016/j.ejp-
har.2017.04.002.. PMID: 28390871.

Received 18.04.21