

# COVID-19 patológiai elemzése, különös tekintettel a májelváltozásokra

Doktori tézis

**Pesti Adrián István**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Horváth Tünde, Ph.D., főorvos

Dr. Pápay Judit, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga bizottság:

Elnök: Dr. Sági Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Tag: Dr. Juriga Dávid, Ph.D., tud. segéd munkatárs

Budapest  
2023

# 1. Bevezetés

Kína Hubei tartományában található Wuhan város Egészségügyi Bizottsága 2019. december 31-én ismeretlen eredetű tüdőgyulladásos betegekről tett bejelentést. Közzétették, hogy a koronavírusok új törzsét izolálták, melyet később SARS-CoV-2-nek (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) neveztek el. Bizonyítást nyert, hogy ezen vírus tekinthető a COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) kórokozójának, amely megbetegedést 2020. március 11-én az Egészségügyi Világszervezet (WHO) pandémiává nyilvánított.

A WHO adatai szerint 2023. február 8-ig, a COVID-19 több, mint 755 millió megbetegedést okozott világszerte és 6,8 millió beteg halt meg a fertőzés következtében. Magyarországon 2020. március 4-én igazolták az első COVID-19 megbetegedést, majd az első SARS-CoV-2 okozta haláleset 2020. március 15-én következett be. A szintén 2023. február 8-i WHO adatok szerint, Magyarországon a COVID-19 közel 2,2 millió beteget érintett és több, mint 48 ezer halálos áldozatot követelt a SARS-CoV-2 vírusfertőzés.

Már a pandémia elején nyilvánvalóvá vált, hogy a SARS-CoV-2 okozta fertőzés elsősorban és legsúlyosabban a tüdőt támadja. A kialakult úgynevezett akut légzési distressz szindróma (ARDS), a hyalin membrán betegség a légzőfelület jelentős beszűkülését okozza, mely az esetek jelentős részében a beteg halálához vezet. Az esetek elemzése azonban rávilágított arra, hogy a tüdön kívül egyéb szervek is érintettek lehetnek, így a szív, idegrendszer, vese, máj, melyek megbetegedése a klinikai tünetek között is változó mértékben mutatkozhat. Nem volt ismert, és jelenleg is vitatott, hogy az egyes szervekben mutatkozó elváltozások a SARS-CoV-2 közvetlen citopatogén hatásának, vagy másodlagosan, a tüdőben bekövetkező megbetegedés következményeinek tekinthetők-e. Kérdéses volt, hogy a szekunder tényezők között elsősorban az ún. „citokinvihar”, a súlyos hypoxia, a beteg kezelése kapcsán alkalmazott gyógyszerek mellékhatásai stb. szerepelnek-e, vagy a vírus a tüdön kívüli egyéb

szervek sejtjeiben történő replikációja. Ennek eldöntésében alapvető a SARS-CoV-2 egyes komponenseinek, így a tüske- és nukleokapszid fehérjéknek (NP) immunhisztokémiával, valamint a vírus-ribonukleinsavnak (RNS) *in situ* hibridizációval történő kimutatása, melyekre munkánk során magunk is törekedtünk.

A COVID-19 pandémia indulását követően boncolási adatok csak korlátozottan álltak rendelkezésre világszerte, így a megbetegedés patomechanizmusának elemzése nehézségekbe ütközött. A Semmelweis Egyetem (SE) Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetében (IBOI) a járvány kezdetétől nagyszámú boncolásra került sor, a SE-en elhunytak mellett a Dél-pesti Centrumkórház (DPCK)-ban elhalálozottak boncolása is itt történt, a SE II. Sz. Patológiai Intézete munkatársainak bevonásával. Az együttműködés eredményeképpen a világon az egyik legnagyobb, egy centrumból származó boncolási anyag elemzésére kerülhetett sor, 100, majd 150 eset részletes analízise során.

A 2019-ben felfedezett SARS-CoV-2, a *Coronaviridae* család *Betacoronavirus* nemzetségéhez tartozik és egyszálú, pozitív-szenz RNS-genommal, négy struktúrfehérjével: borítékfehérje, tüskefehérje, membránfehérje, nukleokapszid fehérje rendelkezik. A SARS-CoV-2 vírus a humán angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) receptoron keresztül jut be a sejtekbe, majd a kapcsolódás után a sejtmembránban található másik enzim, a transzmembrán proteáz szerin 2 (TMPRSS2) hasítja a vírustüske fehérjét, létrehozva a vírusburok és a sejt lipidmembrán fúzióját, így elősegítve a vírus sejtbe jutását. A replikáció során a SARS-CoV-2 vírus először a teljes örökítőanyagát (RNS) másolja le (negatív-szenz kópiák), majd a teljes genom sokszorozódása történik.

A SARS-CoV-2 kimutatására több módszer áll rendelkezésre, így a legfontosabbak: a reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR), immunhisztokémiai reakció (IHC), *in situ* hibridizáció (ISH), ritkábban elektronmikroszkópia. A fentiek alapján fogalmaztuk meg munkánk *Célkitűzéseit*, melyeket a következőkben foglalunk össze.

## 2. Célkitűzés

A COVID-19 járvány során elhunytak vizsgálata számos kérdést vetett fel, melyek megválaszolása érdekében magunk a Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet COVID-19 munkacsoportjának tagjaként, vizsgálatokat végeztünk, az alábbi **célkitűzésekkel**, melyeket alapvetően **két csoportra** osztottunk:

**I. A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási adatainak elemzése, kiemelve az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, ezek összefüggését a halálokkal és társbetegségekkel:**

1. A SARS-CoV-2 fertőzött, elhunyt boncoltak demográfiai jellemzőinek, így a kor, a nem és a társbetegségek SARS-CoV-2 fertőzéssel való összefüggésének elemzése a COVID-19 pandémia egyes hullámaiban.

2. A SARS-CoV-2, mint halálóki tényező szerepének a vizsgálata a fertőzöttekben, a társbetegségek figyelembevételével.

3. Az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyossági fokozatának statisztikai elemzése, összefüggése a tüdőben észlelt patológiai kép súlyosságával és a SARS-CoV-2 fertőzés halálookban betöltött szerepével.

**II. A SARS-CoV-2 egyes protein és RNS komponenseinek kimutatása a fertőzöttek boncolási anyagában hisztológiai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel:**

1. A SARS-CoV-2 vírus komponenseinek detektálása különböző szövetekben és sejtekben.

2. SARS-CoV-2 vírus immunhisztokémiai kimutatására vonatkozó országos körvizsgálat szervezése.

3. A szervi elváltozások primer (citopatogén) vagy szekunder jellegének összefüggése a vírus kimutathatóságával, fókuszálva a májra.

## 3. Módszerek

### 3.1 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási elemzése

A COVID-19 hullámai során értékeltük, és statisztikailag elemeztük a boncolásra került elhunytak adatait. A minták száma esetenként közelítőleg 40 (20-60 között) volt. A SARS-CoV-2 vírus kimutatásához az elhunytak (kór)boncolása során készült formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szöveteket használtuk.

A SARS-CoV-2 vírus májban okozott hatásainak vizsgálatához 20 olyan elhunyt esetét választottuk ki, akik boncolása a halál időpontjától számított 48 órán belül megkezdődött.

A vizsgálatok megfeleltek a Helsinkai Deklaráció irányelveinek, az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB) a IV/3961-2/2020/EKU (hosszabbítási engedély: BMEÜ/4354-1/2022/EKU), a IV/938-1/2022/EKU, valamint a IV/939-1/2022/EKU azonosító számú határozataiban hozzájárult elvégzésükhöz.

### 3.2 Hisztológia

A kórbonctani vizsgálatok során kimetszett minták Intézetünk rutin szövettani laboratóriumába kerültek, ahol a rutin eljárásoknál alkalmazott protokoll szerint történt a szövetek feldolgozása.

### 3.3 SARS-CoV-2 kimutatási módszerek

A vírus egyes alkotórészeinek (proteinek, RNS) kimutatására immunhisztokémiai, RT-PCR és *in situ* hibridizációs technikákat alkalmaztunk.

#### 3.3.1 Immunhisztokémia

A reakciókat Ventana márkájú BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona) típusú immunhisztokémiai automatákon végeztük, a rutin diagnosztikában megszokott módon, a gyártói ajánlásnak megfelelően. A megfelelő primer antitest hígítást a vizsgálatok megkezdése előtt állapítottuk meg, melynek szempontja a

reakció intenzitása és a háttér erősségének értékelése volt. *Pozitív* kontrollként RT-PCR-rel igazolt, SARS-CoV-2 fertőzött mintákat használtunk. A pozitív kontroll a tüdőből, majd a későbbiekben a SARS-CoV-2 pozitív placentákból került ki. *Negatív* kontrollként a primer antitest kihagyása, valamint RT-PCR-rel negatívnak bizonyult, a pandémia előtti (2018-2019) boncolásokból származó minták kerültek felhasználásra.

### **3.3.2 *In situ* hibridizáció (RNAscope®)**

Az *in situ* hibridizációs technikát az RNAscope® 2.5 Assay és RNAscope® 2.5 HD Detection Reagent – RED kitekkel (Advanced Cell Diagnostics Inc. (ACD), Newark, CA) végeztük, a 322452 és 322360-USM számú felhasználói utasítások alapján. A felhasznált hibridizációs próbákat szintén az ACD gyártotta [848561 katalógus szám (bp 21631-23303)].

### **3.3.3 RT-PCR**

A RNS izolálását RNeasy FFPE Kit (Qiagen N.V., Venlo, Hollandia) kittel végeztük, a gyártó által mellékelt HB-0375-006 számú protokoll szerint. Az izolátum minőségét, tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) spektrofotométerrel ellenőriztük.

Az izolált RNS további vizsgálata az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) által kiadott CDC-006-00019 számú diagnosztikus panel protokollja alapján zajlott. A vizsgálat Light Cycler 480 II (Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, IN) készüléken történt. A kiértékelés során 40 ciklusnál (negyedik fázis) húztuk meg a jel detektálás ciklus-küszöbértékét (Ct, Cycle Threshold).

## **3.4 Digitális képalkotás**

A leírt módokon elkészült metszeteket 3DHistech Panoramic® 1000 (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) típusú metszetszkennerrel digitalizáltuk, mely hozzávetőlegesen a

fénymikroszkópiában használt 80x és 40x nagyításnak megfelelő képet eredményez. A digitalizált képeket a PIBOI digitális archívumába (SlideCenter) töltöttük fel. A képek megjelenítésére, illetve jelölésére a SlideViewer (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) szoftvert használtuk.

### **3.5 Minták kiértékelése**

A digitalizált szövettani metszeteket patológus szakorvosaink konzultációs csapatokban, közösen tekintették át. Az értékelés objektivizálására konszenzuson alapuló pontozási értékelési rendszert hoztunk létre, mely az adott elváltozás, reakció jelenléte mellett annak súlyossági fokozatát is számszerűsítette, előre meghatározott pontértékkel. A számszerűsített eredmények rögzítésére online űrlapokat készítettünk Microsoft O365 Forms (Microsoft Corporation, Redmond, WA) szoftver segítségével, valamint a Microsoft O365 Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA) programot is használtuk. Négy szerv, így a tüdő, a szív, a máj és a vese vonatkozásában állítottunk fel külön értékelő táblázatot.

A PIBOI Patológus Munkacsoportja közösen végezte el a kórelőzmények, társbetegségek, makroszkópos elváltozások és a pontértékek együttes figyelembevételével az elhunytak halálói csoportokba sorolását az alábbi 1. táblázat alapján.

**1. táblázat** *Haláloki kategóriák definíciói SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak esetében.*

KATEGÓRIA	KÖZVETLEN HALÁLOK	SARS-CoV-2 FERTŐZÖTTség ÉS A HALÁLOK ÖSSZEFÜGGÉSE
<b>1. kategória</b>	Súlyos COVID-19 pneumónia: DAD, ARDS, pulmonális intravaszkuláris és intraalveoláris fibrin koaguláció.	“Erős” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, a társbetegségek nem súlyosak, súlyos pneumónia.
<b>2. kategória</b>	Súlyos meglévő társbetegség.	“Kiegészítő” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, COVID-19 pneumónia, mint társbetegség.
<b>3. kategória</b>	A halál egyéb okai, melyek nincsenek kapcsolatban a SARS-CoV-2 fertőzéssel.	“Gyenge” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, nincs COVID-19 pneumónia.

### 3.6 Országos patológiai körvizsgálat

A négy hazai orvosegyetem, így a Szegedi Tudományegyetem (SZTE), a Pécsi Tudományegyetem (PTE), a Debreceni Tudományegyetem (DTE), valamint a SE (PIBOI) Patológiai Intézeteinek bevonásával végeztük a vizsgálatokat.

A SE PIBOI szervezésében RT-PCR-rel bizonyítottan SARS-CoV-2 pozitív tüdő és placenta mintákat, valamint igazoltan negatív mintákat választottunk ki, melyeket kódszámmal láttuk el. A SE PIBOI által rendelt SARS-CoV-2 tüske és nukleokapszid ellenes antitestek 20 - 20 µl-nyi mennyiségét juttattuk el, a natív metszetekkel együtt a vizsgálóhelyekre. A reakciókat minden intézetben Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ) automatákon végezték. A továbbiakban az adott laboratóriumban rutinszerűen alkalmazott IHC reakciók végzésére használt



másodlagos antitesteket alkalmazták, a detektálás DAB kromogénnel történt. Az IHC reakciók elvégzése után a reakciót tartalmazó tárgylemezeket a vizsgálóhelyek a SE PIBOI-be küldték, ahol azokat a 3D Histech készülékével szkenneltük, a fent leírt módon. Az értékeléshez az egyes vizsgálóhelyek belépési lehetőséget kaptak a SE SlideCenterbe. A látott reakciókat a vizsgálóhelyek hozzáértő képviselői értékelték: intenzitás és háttér vonatkozásában, előre egyeztetett szempontok figyelembevételével. Az adható pontok mindkét kategóriában a 0-tól 3-ig terjedő skála egész számai voltak.

### **3.7 Alkalmazott elemzési, statisztikai módszerek**

A rögzített eredmények megjelenítése, ellenőrzése, áttekintése, statisztikai elemzésre előkészítése, valamint a statisztikai vizsgálatok egy része is a Microsoft O365 Excel szoftver segítségével történt. Az adatok elemzéséhez felhasználtuk az IBM SPSS Statistics 28.0.1.0(142) verziójú (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), az R 4.0.2 kiadású (The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria), valamint a Statistica 14.0.1.25 verziószámú (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA) szoftvereket. A statisztikai vizsgálatok során a kialakított csoportok összefüggéseinek jellemzéséhez Cohen-féle Kappa, Fleiss-Kappa mutatókat, korrelációs együtthatókat, számoltunk. Az eloszlások vizsgálatához varianciaanalízist (ANOVA, Analysis of variance), Friedman-teszteket, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Khi-négyzet (kis mintaszámoknál Fisher-féle egzakt próbát) és t-próbákat alkalmaztunk. A normalitás vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk teszteket végeztünk. A beállított szignifikanciaszint 5% ( $\alpha=0,05$ ) volt minden statisztikai vizsgálatunk esetében.

## **4. Eredmények**

### **4.1 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási adatainak elemzése, kiemelve az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, ezek összefüggését a halálokkal és társbetegségekkel**

#### **4.1.1 A SARS-CoV-2 fertőzött, elhunyt boncoltak demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatainak elemzése a COVID-19 pandémia egyes hullámaiban (kor, nem, társbetegségek, laboratóriumi eredmények)**

2020. márciusa és decembere között a 495 DPCK-ban elhunyt SARS-CoV-2 pozitív beteg közül 100 egyén boncolására került sor a SE PIBOI-ban. A nemek eloszlása azonos volt (50 – 50), az átlagéletkor 74,73 év, medián 77 év volt. A hospitalizáció 1 – 116 nap, mely statisztikailag különbözött a pandémia két hulláma között, az „első hullámban” átlagosan 24, a „másodikban” 10 nap volt ( $p < 0,001$ ).

Számos társbetegség fordult elő az elhunytakban, legnagyobb arányban a hipertónia, kardiovaszkuláris megbetegedés, diabetes stb. Ugyancsak kiemelendő a túlsúlyosak (34%) és az elhízottak (36%) nagy száma.

Az elvégzett laboratóriumi vizsgálatok közül a CRP (C-reaktív protein), D-dimer, ferritin és interleukin-6 emelkedés fordult elő leggyakrabban.

A vizsgálat második szakaszában további 50, azaz így már összesen 150 elhunyt adatait elemeztük, 2020. márciusa és 2022. márciusa között. Az átlagéletkor 69,6 év, míg a medián 71,5 évnek adódott, a férfi/nő arány 69/78 volt. A szelektált, releváns laboratóriumi eredmények közül a CRP 96,1%-ban volt emelkedett, ezt követte a GGT (75,8%), a csökkent limfocita szám (74,8%) és az emelkedett neutrofil szám (67,2%).

#### **4.1.2 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak kórbonctani mintáiban észlelt hisztológiai elváltozások szemikvantitatív értékelése**

##### **A tüdő hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése**

A patológus szakorvosok által értékelt súlyossági pontértékek alapján legnagyobb arányban az alveolaris ödéma, az infarktusz és vérzés, a DAD (diffúz alveolaris megbetegedés exudatív és proliferatív fázisa) fordult elő, a limfocita és leukocita reakció mellett.

##### **A szív hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése**

A szívben észlelt elváltozások közül az ún. hullámos rostok (*wavy fibers*), intersticiális fibrózis, akut myocardialis ischemiás károsodás és szépszis fordult elő legnagyobb arányban.

##### **A vese hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése**

A vesében az arteriosclerosis, az intersticiális fibrózis és a glomerulosclerosis volt a leggyakoribb.

##### **A máj hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése**

A májban észlelt elváltozások közül, az első 100 eset elemzése során a pangás, szteatózis, fibrózis, kolesztázis, krónikus gyulladás volt észlelhető. A májban észlelt további, részletesebb elváltozások analizisét a későbbiekben, a 150 eset bemutatása során ismertetjük.

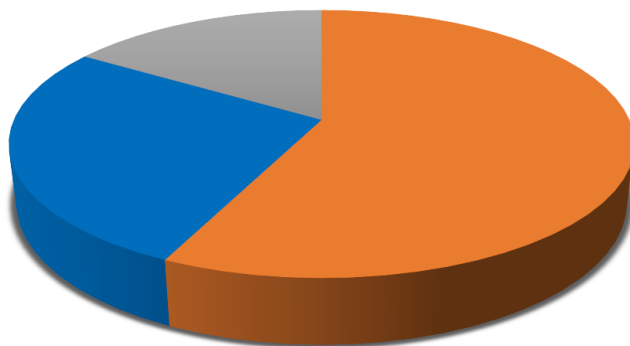
#### **4.1.3 A SARS-CoV-2, mint halálóki tényező szerepének vizsgálata a fertőzöttekben, a társbetegségek figyelembevételével**

A hisztológiai elváltozások súlyosságát összevetettük a klinikopatológiai adatokkal a halál okának megállapítására, annak elemzésére, hogy a vírusfertőzés mennyiben járult hozzá közvetlenül a halál bekövetkezéséhez. Az elemzés során az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, a komorbiditások fennállását, a laboratóriumi eredményeket, a klinikai lefolyást vizsgáltuk, esetről – esetre, melynek alapján történt az egyes esetek valamely halálóki kategóriába történő besorolása.

Az egyes haláloki kategóriák eloszlását mutatja a 1. ábra az első 100 eset elemzése során, melyben az erős összefüggésű esetek domináltak (1. ábra). Az első hullámban azonban az arány a kiegészítő kategória (1. ábra), míg a második hullámban (1. ábra) az erős összefüggést mutató kategória javára tolódott el.

**a**  
n=100

## TELJES



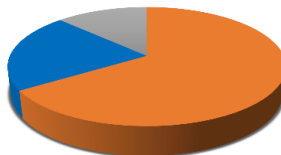
erős kiegészítő gyenge  
COVID-19 összefüggés

**b** első hullám  
n=21



erős kiegészítő gyenge

**c** második hullám  
n=79



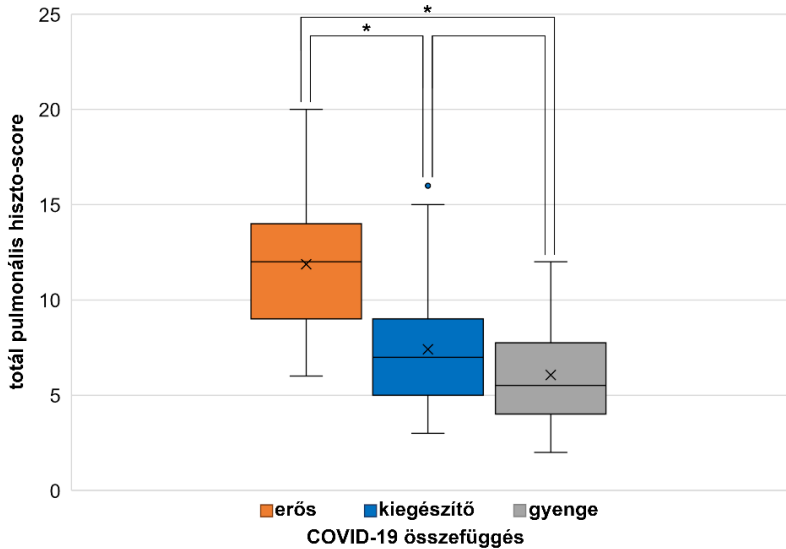
erős kiegészítő gyenge

**1. ábra** A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak (100 eset) eloszlása haláloki kategóriák szerint, összesítve (a), az első (b) és a második (c) hullámban.

#### 4.1.4 Az egyes szervekben észlelt hisztológiai elváltozások súlyossági fokozatának elemzése, összefüggése a tüdőben észlelt patológiai kép súlyosságával és a SARS-CoV-2 fertőzés halálokban betöltött szerepével

A tüdőben észlelt egyes hisztológiai eltérések súlyosságának értékelésével, a pontértékek (0-3) összeadásával képeztük az ún.

„Totál pulmonális hiszto-score” (TP) értéket. A TP értékeket a három haláloki kategória szerint csoportosítva, különbséget észleltünk a kategóriák között (2. ábra). Az erős és kiegészítő, valamint az erős és gyenge kategóriák között ( $p < 0,0001$ ) szignifikáns, a kiegészítő és a gyenge csoport között viszont nem észleltünk szignifikáns összefüggést ( $p > 0,05$ ) (2. ábra).



**2. ábra** Totál pulmonális hiszto-score értékek összehasonlítása haláloki kategóriánként. A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.1.5 A májban észlelt hisztológiai elváltozások SARS-CoV-2 fertőzésben

Az egyes elváltozásokban észlelt súlyossági fokozatot (0-3, fibrózis 0-4) értékeltük. 7 esetben volt jelen cirrózis (F4), 3-ban F3, 68-ban F1-2, míg fibrózist nem detektáltunk 48%-ban (72/150). Szteatózis igen nagy arányban mutatkozott (93/147; 63,27%), változó súlyossági fokozatban. Jelentős lobuláris, portális, periportális gyulladás nem volt jelen.

A fenti viszonylag enyhébb parenchyma sejt elváltozásokkal szemben súlyos elváltozásokat figyeltünk meg a vascularis és sinusoidalis endothelsejtekben. Az endothel elváltozások együtt jártak a 3. zóna sinusoidok és a Disse-tér ektáziával és fibrin akkumulációval. A sinusoid ektázia (S), endothel károsodás (E) és fibrin akkumuláció (F) mértékét részelemeenként 0-3 súlyossági pontértékkel jelöltük (SEF-score), mely legmagasabb pontértéke így 9 lehetett. A máj SEF pontok és a tüdő TP értékek között nem találtunk szignifikáns összefüggést ( $p=0,96$ ).

#### **4.1.6 Egyes sejttípusok identifikálására használt IHC reakciók**

Az egyes sejttípusok identifikálására megfelelő antitesteket használtunk, így az endothel sejteket CD31, CD34, Claudin-5 ellenes, a makrofágokat CD68, a cholangiocytákat CK7 ellenes antitestekkel azonosítottuk. Az IHC reakciók eredményeként egyértelműen azonosítani lehetett, a hisztológiai vizsgálatot kiegészítve, a sejteket, valamint segítette a károsodás mértékének a megállapítását. Ennek kiemelt jelentőséget tulajdonítottunk az endothelsejtek vizsgálata során.

## **4.2 A SARS-CoV-2 egyes protein és RNS komponenseinek kimutatása a fertőzöttek boncolási anyagában immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel**

### **4.2.1 A SARS-CoV-2 vírus komponenseinek detektálása különböző szövetekben és sejtekben**

#### **Immunhisztokémia**

A vírus fehérjének eloszlása fokális mintázatban volt megfigyelhető a metszeteken, egyes területeken nem volt reakció, míg a tüdőmetszetek más területein intenzív reakció mutatkozott. Általánosan megfigyelhető volt, hogy a NP IHC intenzívebb festődést adott a tüskefehérjénél. Mindkét fehérje jelentős mennyiségben kimutatható volt intraalveolárisan, a levált alveoláris sejtekben és a

szövettermelékben. A továbbiakban kiemelten vizsgáltuk a SARS-CoV-2 proteinek expresszióját a *májszövetben* (20 eset, PMI<2 nap). A NP 15 esetben volt detektálható, míg a tüskefehérje összesen 4 esetben. A vírus proteinek egyenletlenül, fókálisan jelentek meg az endothel sejtekben, a Kupffer sejtekben és a portális makrofágokban. A hepatocytákban és a cholangiocytákban SARS-CoV-2 fehérjéket nem tudtunk detektálni (2. táblázat).

**2. táblázat** SARS-CoV-2 RNS kimutatása RT-PCR, ISH vizsgálatokkal, fehérjekimutatása IHC-val máj mintákban.

Minta száma	TÜDŐ RT-PCR	TÜDŐ NP IHC	TÜDŐ SPIKE IHC	MÁJ RT-PCR	MÁJ NP IHC	MÁJ TŰSKE IHC	MÁJ ISH (RNAscope®)
#01	+	-	-	+	+	-	+
#02	+	+	+	+	+	-	-
#03	+	-	-	-	+	-	+
#04	+	+	+	+	+	+	+
#05	+	+	+	-	-	-	-
#06	+	-	-	+	+	-	+
#07	-	-	-	-	-	-	-
#08	+	+	+	+	+	-	+
#09	+	+	+	+	+	-	-
#10	+	+	+	+	+	+	-
#11	+	-	-	+	-	-	-
#12	+	-	-	-	+	-	-
#13	+	+	+	+	+	-	+
#14	+	-	-	-	-	-	-
#15	+	+	+	+	+	-	+
#16	+	+	+	+	+	+	-
#17	+	-	-	+	+	-	+
#18	-	-	-	+	+	-	+
#19	+	+	+	-	+	+	-
#20	+	+	-	-	-	-	-

### ***In situ* hibridizáció**

A fenti 20 májmintában az RT-PCR és IHC reakcióval párhuzamosan SARS-CoV-2 ISH végeztünk. Az alkalmazott RNAscope® technika a 20 májesetből kilencben mutatott pozitivitást (2. táblázat).

### **RT-PCR**

A 20 kiválasztott, 2 napon belül végzett boncolások májeseteihez tartozó tüdőminták közül az RT-PCR 18 esetben adott pozitív eredményt. A 18-ból 12 esetben a májmintákban is detektálható volt a SARS-CoV-2 RNS (2. táblázat).

### **4.2.2 SARS-CoV-2 vírus immunhisztokémiai kimutatására vonatkozó országos körvizsgálat**

A négy vizsgálóhelyen (SE IBOI, SZTE, DE, PTE) elvégzett IHC-k pozitivitását, intenzitását és a háttérét hasonlítottuk össze és értékeltük. A SARS-CoV-2 fertőzött tüdő és placenta mintákban minden esetben észlelhető volt a pozitív reakciót jelentő barna színreakció, míg a negatív kontrollokban nem.

Statisztikailag az intenzitásra vonatkozóan a pontozást végző szakértők valódi egyezést mutattak: Fleiss-kappa=0,62. A háttéresség megítélésének tekintetében némileg nagyobb eltérés volt kimutatható az értékelők között: Fleiss-kappa=0,45, ez mérsékelt egyezést jelent. A reakcióintenzitások aspektusában a vizsgálóhelyek között az eltérő laboratóriumi körülmények ellenére sem volt észlelhető különbség. Ezt a Friedmann-teszt által adott érték: szignifikancia=0,75 igazolja, mely bőségesen meghaladja a 0,05-ös határt mely a különbséget hivatott jelezni.



## 5. Következtetések, új eredmények

A bemutatott 100, később 150 SARS-CoV-2 vírus fertőzött elhunyt egyén boncolási eredményeinek elemzése világviszonylatban is **jelentős esetszám** alapján vont le klinikopatológiai következtetéseket és tárt fel haláloki láncolatokat, az elváltozások szemikvantitatív elemzése alapján.

A vizsgált populáció **demográfia**lag megfelelt a nemzetközileg vizsgált csoportoknak, mind kor, nem, komorbiditás tekintetében stb., így az észlelt patológiai eltérések más kohorszokra is nagy valószínűséggel kiterjeszthetők.

1. A klinikopatológiai elemzések alapján **három haláloki kategóriát** különítettünk el, mely a SARS-CoV-2-vel való összefüggés alapján csoportosította az eseteket. Ennek alapján az esetek a halálok szempontjából a vírussal való „**erős**”, „**kiegészítő**”, vagy „**gyenge**” kategóriába voltak sorolhatók.
2. Rámutattunk, hogy a pandémia egyes hullámaiban a haláloki kategóriák **arányában lényeges különbségek** mutatkoztak, az első hullámban a „kiegészítő”, míg a második hullámban az „erős” összefüggés aránya dominált. Összességében az „erős” összefüggés bizonyult a legnagyobb arányúnak.
3. A tüdőben észlelt elváltozások digitalizált, szemikvantitatív elemzése alapján az ú.n. „**Totál pulmonális hiszto-score**” (TP) értéket vezettük be, mely szorosan összefüggött a haláloki kategóriákkal. Az „erős” összefüggésű haláloki kategóriákban a TP érték szignifikánsan nagyobb volt, mint a kiegészítő és gyenge csoportban ( $p < 0,0001$ ).
4. A tüdő hisztológiai elemzése mellett, részletesen vizsgáltunk számos extrapulmonális szervet, kiemelten a **májszövetet**. Megállapítottuk, hogy a leggyakoribb elváltozás, a változó mértékű szteatózis és a pangás volt, a fibrózis mértéke alacsonyabbnak bizonyult, a nekrozis/apoptózis nem volt jelentős és hepatitis nem fordult elő.

5. A viszonylag enyhébb parenchyma elváltozásokkal szemben viszont jelentős sinusoidealis ektáziát, endothelsejtek károsodást és fibrin akkumulációt észleltünk. Ennek szemikvantitatív mértékét az ú.n. **SEF-score**-ral fejeztük ki, mely nem mutatott összefüggést a haláloki kategóriákkal.
6. SARS-CoV-2 proteinek kimutatására megfelelő, IHC célra szolgáló antitestek kiválasztására, a magyarországi eljárások egységesítése céljából szervezett  **hazai körvizsgálaton** – a négy orvosi egyetem részvételével – kiválasztottuk a legmegfelelőbbben használható és ajánlható primer antitesteket. Ez alapján megállapítottuk, hogy az **IHC** minősége és értékelése **nem függött a vizsgálohelytől**.
7. A SARS-CoV-2 NP és tüskefehérjéket IHC, a virális RNS-t RT-PCR és ISH módszerekkel mutattuk ki a **máj különböző sejtjeiben**, ugyanazon betegektől származó tüdőszövettel összehasonlítva. Igazoltuk, hogy a SARS-CoV-2 NP és tüskefehérjéi, valamint a virális RNS a fertőzött májban kimutathatók, az endothel, a Kupffer sejtekben és a makrofágokban. A vírus a parenchyma sejtekben (hepatocytá, cholangiocytá) nem volt detektálható.
8. A májban észlelt eltérések, kiemelten az **endothelsejt károsodás** (akár primer citopatogén, akár másodlagos tényezők következménye), arra hívja fel a figyelmet, hogy a tüdőn kívüli szervek, így a máj, későbbi károsodásával is számolni kell a betegséget sikeresen túlélő betegekben. Ennek alapján a súlyosabb COVID-19 fertőzésen átesett és „gyógyult”, vírus negatívvá vált egyének esetében **is indokolt a betegek követése**, időszakos ellenőrzése.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Danics K, **Pesti A**, Törő K, Kiss-Dala N, Szlávik J, Lakatos B, Radnai A, Balázs T, Bacsikai M, Dobi D, Várkonyi T, Glasz T, Lotz G, Kiss A, Schaff Z, Vályi-Nagy I. A COVID-19-association-dependent categorization of death causes in 100 autopsy cases. *Geroscience*. 2021;43(5):2265-87. IF: 7,581 (2021)
2. Lotz G, Danics K, **Pesti A**, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A, Schaff Z. A COVID-19-betegség okozta szervi károsodások patológiája. *Klinikai Onkológia*. 2021;8(7):211-8. IF: -
3. Schaff Z, Danics K, **Pesti A**, Lotz G, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A. A COVID-19 patológiája.: Halálok SARS-CoV-2-fertőzésben: vírusfertőzésben vagy vírusfertőzéssel? *Scientia et Securitas*. 2021;2(1):94-9. IF: -
4. **Pesti A**, Gyömörei C, Juhász P, Kálmán E, Kiss A, Kuthi L, Lotz G, Méhes G, Schaff Z, Tiszlavicz L. SARS-CoV-2-fehérjék kimutatása immunhisztokémiai módszerrel emberi szövetekben. *Orvosi Hetilap*. 2022;163(25):975-83. IF: 0,707(2021)
5. **Pesti A**, Danics K, Glasz T, Várkonyi T, Barbai T, Reszegi A, Kovalszky I, Vályi-Nagy I, Dobi D, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. Liver alterations and detection of SARS-CoV-2 RNA and proteins in COVID-19 autopsies. *Geroscience*. 2023;45(2):1015-31. IF: 7,581 (2021)

### 6.2 Disszertációtól független közlemények

6. Lendvai G, Szekerczés T, Gyöngyösi B, Schlachter K, Kontsek E, **Pesti A**, Patonai A, Werling K, Kovalszky I, Schaff Z, Kiss A. MicroRNA Expression in Focal Nodular Hyperplasia in Comparison with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.

- Pathology and Oncology Research. 2019;25(7):1103-9. IF: 2,826 (2019)
7. Kontsek E, **Pesti A**, Bjornstedt M, Üveges T, Szabó E, Garay T, Gordon P, Gergely S, Kiss A. Mid-Infrared Imaging Is Able to Characterize and Separate Cancer Cell Lines. Pathology and Oncology Research. 2020;26(4):2401-7. IF: 3,201 (2020)
  8. Kontsek E, **Pesti A**, Slezsák J, Gordon P, Tornóczki T, Smuk G, Gergely S, Kiss A. Mid-Infrared Imaging Characterization to Differentiate Lung Cancer Subtypes. Pathology and Oncology Research. 2022;28:1610439. IF: 2,874 (2021)
  9. Pataki AB, Olár A, Ribli D, **Pesti A**, Kontsek E, Gyöngyösi B, Bilecz A, Kovács T, Kovács KA, Kramer Z, Kiss A, Szócska M, Pollner P, Csabai I. HunCRC: annotated pathological slides to enhance deep learning applications in colorectal cancer screening. Scientific Data. 2022;9(1):370. IF: 8,501 (2021)
  10. Szeitz B, Pipek O, Kulka J, Szundi C, Rusz O, Tőkés T, Szász AM, Kovács KA, **Pesti A**, Ben Arie TB, Gángó A, Fülöp Z, Drágus E, Vári-Kakas SA, Tőkés AM. Investigating the Prognostic Relevance of Tumor Immune Microenvironment and Immune Gene Assembly in Breast Carcinoma Subtypes. Cancers. 2022;14(8):1942. IF: 6,575 (2021)
  11. Kádár R, Maros K, Drégelyi Z, Szedenik Á, Lukácsi A, **Pesti A**, Besenyeyi M, Egri B. Incidence of compulsive behavior (stereotypies/abnormal repetitive behaviors) in populations of sport and race horses in Hungary. Journal of Veterinary Behavior. 2023;61:37-49. IF: 2,172 (2021)

**Összesített IF (6.1+6.2): 42,018**