

УДК 571.27, 616-005.6, 578.834.1

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ COVID-19. ПИЛОТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2024 г. П. П. Авдонин^{а, *}, Л. А. Комлева^а, М. С. Блинова^а, Е. С. Иванова^б,
О. Н. Котенко^б, Н. Ф. Фролова^б, Е. С. Столяревич^б, Е. Ю. Рыбакова^а, П. В. Авдонин^а

^а Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

^б ГБУЗ Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы,
Москва, 123182 Россия

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 11.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Одним из факторов риска при инфекции, вызванной SARS-CoV-2, является гиперактивация системы комплемента, которая может приводить к активации и повреждению эндотелия, тромбозу и, в ряде тяжелых случаев, развитию полиорганной недостаточности. Методом количественной иммуноцитохимии мы исследовали опсонизацию факторами комплемента C3/C3b эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) при воздействии на них плазмы крови пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, чтобы оценить возможность использования данного подхода к изучению состояния системы комплемента при COVID-19 *ex vivo*. Для этих целей были использованы FITC-меченые антитела, специфичные к C3c домену факторов C3/C3b. В качестве параметров для оценки связывания C3/C3b с клетками были выбраны интегральная интенсивность регистрируемой флуоресценции и число C3/C3b-иммунопозитивных структур. Мы показали, что при инкубации HUVES с плазмой больных общее число C3/C3b-иммунопозитивных структур, регистрируемых на мембране этих клеток, в 5.8 ± 2.8 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p < 0.001$) выше, чем при воздействии плазмы здоровых людей. При этом интегральная интенсивность флуоресценции возрастала в 6.3 ± 3.2 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p \leq 0.0001$) по сравнению с контролем. Площадь иммунопозитивных структур, регистрируемых после воздействия на клетки плазмы здоровых доноров и больных COVID-19 и выбранных для анализа, составляла от 2.2 до 70 μm^2 . Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–10.9 μm^2 после инкубации с плазмой больных COVID-19 имели более вытянутую форму в сравнении с контролем. Среднее число частиц на клетку составляло в контроле 0.49 ± 0.06 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 6$), при инкубации с плазмой больных 2.4 ± 0.4 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 13$, $p < 0.001$). Анализ распределения частиц по площади показал, что наиболее выраженные отличия в количестве C3/C3b-иммунопозитивных структур в сравнении с контролем наблюдались среди крупных частиц. Таким образом, мы показали рост уровня опсонизации эндотелиальных клеток факторами комплемента C3/C3b в присутствии плазмы больных COVID-19 в сравнении с контрольной плазмой. Прирост обусловлен увеличением числа C3/C3b-иммунопозитивных структур, в большей степени крупных. Мы предполагаем, что разработанный нами подход позволит исследовать роль системы комплемента в повреждении клеток эндотелия сосудов у больных COVID-19 на модели *ex vivo*, а также оценивать уровень активации комплемента в плазме больных и эффективность их лечения.

Ключевые слова: комплемент, эндотелиальные клетки, COVID-19, фактор C3, мембраноатакующий комплекс

DOI: 10.31857/S0233475524020058, **EDN:** xttsen

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) появилась в 2019 г. в КНР в г. Ухане и в кратчайшие сроки распространилась по всему миру. В первые два года пандемии общее количество заболевших превысило 700 млн человек, и смертность составила 2–3% (<https://covid19.who.int/>). Борьба с этим заболеванием прежде всего была направлена на разработку вакцин. С их помощью удалось устранить вал заболеваемости и смертности. Заболеваемость была стабилизирована на низком уровне, однако полностью справиться с этим инфекционным заболеванием не удастся. Смертность в настоящее время от коронавирусной инфекции остается достаточно высокой и доходит до 0.5–1%. Созданные вакцины оказываются неэффективными по отношению к новым штаммам вируса SARS-CoV-2.

Параллельно с разработкой методов прямой защиты от вируса проводятся исследования патогенетических механизмов данного заболевания. Одним из критических моментов прогрессирования COVID-19 является цитокиновый шторм, сопровождающийся гиперактивацией комплемента [1]. Комплемент — это врожденная система иммунной защиты организма, включающая более 30 белковых факторов [2]. При нормальной работе основная функция системы комплемента заключается в инактивации и удалении чужеродных биологических объектов и собственных отмирающих клеток. В случае же гиперактивации объектом атаки становятся нормальные клетки организма. К числу первых мишеней относится эндотелий сосудов. Его повреждение приводит к активации системы свертывания крови, секреции фактора Виллебранда, тромбозу микрососудов и в тяжелых случаях к полиорганной недостаточности и смерти больного. Этот патологический процесс описан при гемолитико-уремическом синдроме — заболевании, вызванном врожденными и приобретенными дефектами системы комплемента [3].

Многочисленные исследования пациентов с COVID-19 подтвердили, что нарушение регуляции комплемента является одним из основных, если не главным, патогенетическим фактором этого заболевания [4, 5]. По этой причине определение функциональной активности системы комплемента у больных может иметь важное значение как для более детальной оценки их состояния и подбора терапии, так и для прогнозирования течения болезни. Для оценки активности комплемента проводится определение ряда параметров: литической активности C5, концентраций фактора C3, анафилактических пептидов C3a и C5a, содержания

в плазме мембраноатакующего комплекса (МАК). В состав МАК входят факторы комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9, поэтому его также обозначают аббревиатурой C5b-9. Встраиваясь в мембрану микроорганизмов и поврежденных клеток организма, МАК формирует пору, проницаемую для ионов, воды и небольших молекул. Уровень растворенного в плазме МАК косвенно отражает его количество на поверхности инородных объектов (в данном случае на липидной оболочке вируса SARS-CoV-2) и на мембране собственных клеток организма.

В настоящей работе для оценки активности системы комплемента в плазме крови больных COVID-19 был применен уже использованный нами ранее подход [6], позволяющий непосредственно исследовать процесс формирования МАК на поверхности эндотелиальных клеток. Для этого в экспериментах *ex vivo* эндотелиальные клетки (ЭК) из пупочной вены человека (HUVEC — human umbilical vein endothelial cells) инкубировали с плазмой пациентов, больных COVID-19, либо с плазмой здоровых людей. Известно, что при всех путях активации комплемента к поверхности атакуемого объекта присоединяется ключевой компонент каскада протеолитических реакций — фактор C3b [2]. Ковалентное связывание его с мембраной запускает финальную фазу активации системы комплемента — протеолиз фактора C5 и формирование МАК. Для визуализации связанного с мембраной HUVEC фактора C3b были использованы конъюгированные с флуоресцеином антитела, специфичные к фактору C3 и к его активированной форме C3b. Мы показали, что при инкубации HUVEC с плазмой больных сорбция C3/C3b на мембране многократно выше, чем при инкубации с плазмой здоровых людей. Таким образом, наши результаты показывают, что, во-первых, при коронавирусной инфекции резко усиливается активация комплемента на ЭК кровеносных сосудов. Во-вторых, используя данный метод оценки состояния системы комплемента *ex vivo*, можно непосредственно определять, каково повреждающее действие комплемента на сосуды у каждого конкретного больного и какова эффективность проводимого лечения и применяемых лекарственных препаратов. Также данная модель может быть использована для исследований патогенетических механизмов повреждения эндотелия сосудов при COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были выбраны пациенты, проходящие лечение в стационаре и отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ).

Критериями отбора были наличие подтвержденной методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) инфекции SARS-CoV-2 и вирусной пневмонии, подтвержденной компьютерной томографией (КТ). Плазму получали из крови, взятой из локтевой вены с антикоагулянтом, содержащим цитрат натрия.

HUVEC выделяли согласно методу, описанному ранее [7]. Клетки выращивали в покрытых желатином пластиковых флаконах в среде M199 с солями Эрла и 20 mM HEPES, содержащей 20% фетальной телячьей сыворотки (Invitrogen, США). К среде добавляли фактор роста эндотелия (300 мкг/мл), выделенный из мозга кролика, 100 мкг/мл гепарина и смесь антибиотиков (пенициллин со стрептомицином). Использовали клетки ранних пассажей. Для пассирования HUVEC применяли аккутазу® (Sigma-Aldrich, США).

Для определения связывания фактора C3b с клетками их пересаживали в 48-луночный планшет. HUVEC трижды отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (ФСР, pH 7.4), содержащим NaCl (145 mM), KCl (5 mM), HEPES (5 mM), MgCl₂ (1 mM), CaCl₂ (1.2 mM), глюкозу (10 mM). Далее HUVEC инкубировали 10 мин при комнатной температуре в присутствии 100 мкМ ADP, трижды отмывали ФСР и инкубировали 4 ч с плазмой крови, смешанной с ФСР в соотношении 1:2 при 35°C. После инкубации клетки отмывали холодным фосфатным солевым буфером (PBS – phosphate buffered saline) и фиксировали холодным 3% параформальдегидом в течение 25 мин. Клетки отмывали 3 раза раствором PBS, инкубировали 45 мин с 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS и далее в течение ночи инкубировали при 4°C с разведенными в 100 раз поликлональными FITC-конъюгированными антителами, специфичными к C3c-фрагменту фактора C3 и C3b и не связывающимися с C3a (DAKO, F0201) [8]. Затем клетки отмывали 3 раза PBS и инкубировали в растворе ядерного красителя Hoechst 33342 в PBS (2 мкг/мл) 15 мин при 35°C. Несвязавшийся краситель отмывали 3 раза PBS. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 (Leica, Германия) с использованием объектива $\times 10$, диодного осветителя с длиной волны 488 нм и флуоресцентного фильтра L5 ET (Leica, Германия), оснащенного камерой. С центрального участка каждой лунки получали 16 снимков не перекрывающихся друг друга микроскопических полей площадью 1.4 мм². Анализ снимков проводили с использованием компьютерной программы Cell Profiler. В рамках анализа производилось определение интегральной интенсивности флуоресценции, числа ядер

и C3/C3b-иммунопозитивных частиц площадью 2.2–70 мкм², минимального и максимального диаметра Ферета регистрируемых C3/C3b-иммунопозитивных частиц. Форму иммунопозитивных частиц оценивали по отношению максимального диаметра Ферета к минимальному.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Excel 10 и MedCalc 14.8.1. Каждое значение представляет собой среднее 6 независимых измерений $\pm$ стандартное отклонение.

Для проверки выборок на нормальность распределения использовали W-тест Шапиро–Уилка (уровень значимости >0.05).

Достоверность различий уровня опсонизации C3, а также количества ядер в поле зрения после инкубации клеток с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 (рис. 1) оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок, а также однофакторного параметрического дисперсионного анализа ANOVA.

Среднее число (N) иммунопозитивных структур заданного диапазона размеров и среднее значение интегральной интенсивности флуоресценции, полученные с 16 независимых случайных снимков, сравнивалось между опытной и контрольной группами при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Достоверность различий формы C3/C3b-иммунопозитивных структур ($dF_{\max}/dF_{\min}$) среди частиц одного размера (мкм²) между контролем и опытом (рис. 3) оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок.

Наличие корреляции между интегральной интенсивностью флуоресценции и числом выявляемых C3/C3b-иммунопозитивных структур проверялась путем расчета коэффициента корреляции Пирсона.

Значения p менее 0.05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследований была выбрана группа больных возрастом от 32 до 81 года с установленным диагнозом COVID-19, отягощенным вирусной пневмонией и нефрологической патологией разной степени тяжести. Данные о больных представлены в табл. 1. В качестве контроля была использована плазма от 6 здоровых добровольцев в возрасте от 22 до 68 лет.

За основу теста для определения активности комплемента нами был взят подход, разработанный Noris с соавторами [9] для анализа активности

системы комплемента в плазме больных атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС) с некоторыми изменениями [6]. В экспериментах исследователей активность системы комплемента в плазме крови оценивали по уровню связывания C3/C3b с ЭК микрососудов человека (НМЕС). Вместо культуры иммортализованных клеток НМЕС-1, которые по ряду свойств (скорости роста, чувствительности к плазме) отличаются от нативных эндотелиальных клеток, нами была выбрана первичная культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC. Опсонизацию клеток фактором C3/C3b оценивали двумя способами: по интегральной интенсивности флуоресценции и по количеству C3/C3b-иммунопозитивных частиц в мозаичном кадре.

Предварительно нами был проведен анализ динамики накопления C3/C3b на поверхности клеток HUVEC во время их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 в течение 4 ч. Клетки отмывали от плазмы и фиксировали через 15 мин, 30 мин, 1, 2, 3 и 4 ч после начала инкубации с раствором плазмы. Выраженные различия в опсонизации клеток HUVEC C3/C3b наблюдались уже на 3 ч инкубации и сохранялись без значительных изменений вплоть до 4 ч (данные не представлены). В дальнейшем инкубация клеток с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 проводилась 4 ч при 37°C.

После инкубации с раствором плазмы в ФСР клетки фиксировали, окрашивали и определяли интегральную интенсивность флуоресценции, как это ранее предлагалось Noris с соавторами [9], и число окрашенных антителами к C3/C3b структур на клетку. Сравнение опсонизации клеток HUVEC фактором комплемента C3/C3b показало, что после инкубации клеток с плазмой больных COVID-19 ($n = 13$) количество C3/C3b-иммунопозитивных структур возрастало в 5.76 ± 2.79 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p < 0.001$) по сравнению с контрольной плазмой ($n = 6$) (табл. 1, рис. 1). Среднее число частиц на клетку составляло в контроле 0.49 ± 0.06 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 6$), при инкубации с плазмой больных 2.4 ± 0.4 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 13$, $p < 0.001$). Регистрируемая интегральная интенсивность флуоресцентного сигнала с антител к C3/C3b после инкубации с плазмой больных возрастала в 6.31 ± 3.18 раз ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $p < 0.001$) в сравнении с контрольной плазмой (табл. 1). Сопоставление полученных данных показало практически полную положительную линейную корреляцию между числом C3/C3b-иммунопозитивных структур и интегральной интенсивностью флуоресценции ($r = 0.985$). Из этих данных следует, что рост интегральной интенсивности флуоресценции обусловлен увеличением

количества C3/C3b-иммунопозитивных структур. Подсчет ядер относительно площади сканирования не выявил различий в количестве клеток, инкубированных с плазмой здоровых доноров (254 ± 4.1 ; $\text{mean} \pm \text{SD}$) и плазмой больных COVID-19 (255 ± 2.2 ; $\text{mean} \pm \text{SD}$). Таким образом, можно говорить о том, что наблюдаемая разница в связывании C3/C3b не была обусловлена гибелью клеток (табл. 1, рис. 1).

Разница в опсонизации клеток HUVEC C3/C3b при их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19 может отражать более высокий уровень активности системы комплемента у больных. При этом в основе связывания клетками C3/C3b из плазмы больных может лежать сразу несколько механизмов. Следуя рекомендациям, данным Noris с соавторами [9] в описании предлагаемого ими подхода для оценки активности системы комплемента в плазме крови, мы также проводили предварительную активацию эндотелиальных клеток ADP. Эти авторы показали, что предварительная инкубация клеток с ADP вызывает экспонирование на их поверхности Р-селектина. Р-селектин синтезируется в эндотелиальных клетках, накапливается в специальных гранулах — тельцах Вейбеля—Паладе — и в случае повреждения тканей, развития воспаления и активации эндотелия экспонируется на клеточной поверхности, обеспечивая адгезию лейкоцитов [10]. Р-селектин способен связывать C3b, обеспечивая сборку C3-конвертазы альтернативного пути системы комплемента [10, 11]. Можно предположить, что преинкубация клеток HUVEC с ADP также вызывает экспонирование Р-селектина на их поверхности, делая их восприимчивыми к C3b. В этом случае разница в связывании C3/C3b обусловлена различиями в концентрации активной формы C3b в плазме здоровых доноров и больных COVID-19. Но также необходимо отметить, что в плазме больных коронавирусной инфекцией содержится целый комплекс факторов, которые могут стимулировать экспонирование Р-селектина на поверхности эндотелиальных клеток. Их стимулирующая экспонирование Р-селектина активность может быть выше, чем у ADP. В этой роли могут выступать тромбин, гистамин, анафилотоксины и провоспалительные цитокины. Ранее было показано, что тромбин, гистамин, анафилотоксин C5a, провоспалительные цитокины IL-3, IL-4, TNF α могут активировать эндотелиальные клетки, вызывая экспонирование на их поверхности молекул Р-селектина [12–17]. В свою очередь, клинические исследования показали рост уровня данных факторов в плазме больных на фоне заболевания COVID-19. Был отмечен рост уровня гистамина, как и других медиаторов воспаления, в плазме

Таблица 1. Связывание C3/C3b клетками HUVEC: влияние плазмы крови больных COVID-19

Паци- енты	Возраст	Стацио- нар – 1, ОРИТ – 2	Пнев- мония, КТ	Среднее число ядер в поле зрения	Среднее число структур C3/C3b на клетку	Средняя интегральная интенсивность флуоресценции, ОЕФ	Связывание C3, % от контроля	
							Количество C3/C3b структур, %	Интег- ральная интенсив- ность флуорес- ценции, %
1	81	2	3	243±9	2.2±0.3	16611±3962	453±71	321±78
2	50	1	1	244±7	4.2±0.3	49244±11623	861±108	953±227
3	60	1	2	252±5	1.1±0.1	14433±3477	229±30	279±68
4	68	2	3	251±6	5±0.3	53588±1660	1016±125	1037±34
5	60	1	2	258±4	2.6±0.1	33336±4126	528±57	645±81
6	61	1	2	253±2	3±0.2	35648±5122	620±74	690±100
7	37	1	3	259±7	4.7±0.3	57797±4216	955±119	1118±84
8	32	1	2	264±1	3.4±0.4	43897±5796	699±108	850±113
9	37	1	3	262±7	2.1±0.1	26279±2472	437±48	509±48
10	75	1	1	251±3	1.2±0.1	12439±1654	251±37	241±32
11	58	1	3	267±7	0.5±0.1	6681±2636	104±13	129±51
12	40	1	2	262±9	3.3±0.2	39562±993	665±83	766±20
13	52	1	1	247±10	3.3±0.2	33493±3001	667±81	648±59
Пациенты, среднее	54	-	-	254±4	2.8±0.4***	32539±16439***	576±279***	631±318***
Контроль								
1	23	-	-	249±4	0.5±0.01	5110±1384	98±10	99±27
2	24	-	-	264±3	0.5±0.02	5373±1871	104±12	104±36
3	19	-	-	262±1	0.36±0.02	4372±248	74±9	85±4
4	69	-	-	259±9	0.65±0.07	6650±1680	132±19	129±32
5	39	-	-	251±3	0.34±0.01	3679±337	69±8	71±7
6	34	-	-	237±6	0.62±0.04	5759±1350	126±15	111±27
Контроль, среднее	34	-	-	255±2	0.49±0.13	5158±1045	100	100

Примечание. ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии. КТ – степень поражения легких, определяемая на основании компьютерной томограммы. *** $p < 0.001$.

больных COVID-19 [18]. Есть данные о том, что прием блокатора H2-рецепторов гистамина фоматидина больными COVID-19 сопровождался достоверным снижением риска развития тромботических осложнений и более легким течением данного заболевания [18]. Нами, в свою очередь, показано, что гистамин увеличивает связывание C3/C3b с HUVEC при инкубации их с плазмой здоровых людей [6]. Эти данные свидетельствуют об активной роли гистамина в патогенезе инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Также течение COVID-19 сопровождается активацией системы свертывания крови, продуктом функциональной активности которой является тромбин [19]. У больных COVID-19 отмечается существенный рост эндогенного тромбинового потенциала [20]. Наконец, в процессе исследования роли провоспалительных

цитокинов в патогенезе COVID-19 был отмечен рост уровня IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α у больных COVID-19 и установлена корреляция между уровнем IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, TNF α и тяжестью заболевания [21–24]. Можно предположить, что перечисленные выше факторы могут усиливать экспонирование Р-селектина на поверхности клеток HUVEC, создавая тем самым дополнительные сайты связывания C3b при действии плазмы больных COVID-19 на клетки.

Помимо Р-селектина связывание C3/C3b клетками HUVEC может быть опосредовано другими белками. В качестве такого белка может выступать фактор Виллебранда [25]. Этот сложный гликопротеин синтезируется эндотелиальными клетками и, так же как Р-селектин, накапливается в тельцах

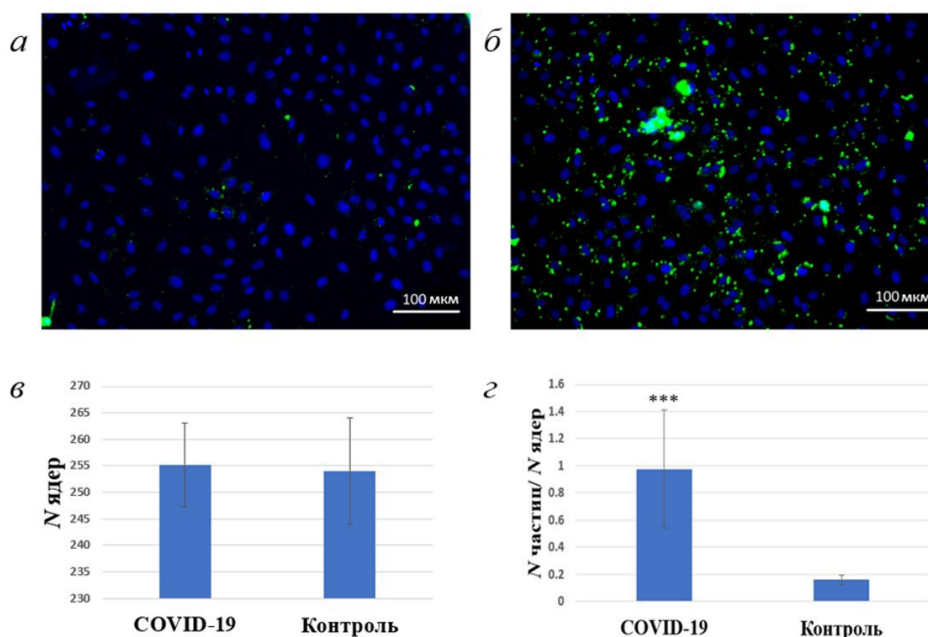


Рис. 1. Связывание С3/С3b клетками HUVEC под воздействием плазмы крови здоровых доноров и больных COVID-19. а – Окрашивание клеток антителами к С3/С3b и ядерным красителем Hoechst 33258 после инкубации с плазмой крови здоровых доноров; б – окрашивание клеток антителами к С3/С3b и ядерным красителем Hoechst 33258 после инкубации с плазмой крови больных COVID-19; в – количество ядер в поле зрения после инкубации клеток с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 ($p \geq 0.8$); г – среднее количество С3/С3b-иммунопозитивных частиц на ядро в культуре клеток HUVEC после инкубации с плазмой крови здоровых доноров и больных COVID-19 ($***p < 0.001$).

Вейбеля—Паладе. В процессе секреции фактор Виллебранда подобно Р-селектину экспонируется на поверхности ЭК. Перед поступлением в кровеносное русло он подвергается расщеплению специальным ферментом — металлопротеиназой ADAMTS13 на мультимеры различной молекулярной массы. Фактор Виллебранда выполняет две важные функции в системе гемостаза. Он обеспечивает связывание тромбоцитов в месте повреждения сосуда и формирование тромбоцитарного тромба, а также является носителем фактора VIII, защищая его от инактивации. Фактор Виллебранда взаимодействует с С3b через три своих домена типа А (A1, A2, A3) и инициирует активацию альтернативного пути системы комплемента, однако сборка активной С5-конвертазы и образование МАК происходят только на домене А2 [25]. Приводимые в литературе данные говорят о повышенной секреции клетками эндотелия фактора Виллебранда при COVID-19 [26]. Поскольку фактор Виллебранда имеет с Р-селектином общие гранулы депонирования — тельца Вейбеля—Паладе, его секреция может запускаться теми же факторами. Показано, что тромбин, гистамин, анафилотоксин С5а и IL-6 стимулируют секрецию фактора Виллебранда [27–30]. При этом важно отметить, что активаторы ЭК стимулируют

экспонирование Р-селектина и секрецию фактора Виллебранда с разной эффективностью. В частности, это связано со способностью дифференциально запускать экзоцитоз разных популяций телец Вейбеля—Паладе. Так, гистамин, в отличие от тромбина, активирует экзоцитоз телец Вейбеля—Паладе, содержащих Р-селектин и фактор Виллебранда, одновременно запуская перемещение субпопуляции телец Вейбеля—Паладе, не содержащих Р-селектин, в центр организации микротрубочек [31]. В свою очередь, стабилизация связавшегося с Р-селектином и фактором Виллебранда С3b, источником которого, по всей видимости, является плазма, и локальная активация альтернативного пути системы комплемента приводят к образованию и накоплению нового С3b, амплификации сигнала и увеличению регистрируемых различий.

Наконец, С3b способен образовывать стабильные комплексы с другими компонентами плазматических мембран, в том числе с зимозаном [32]. Данные комплексы, по-видимому, являются результатом гидрофобного взаимодействия и ковалентного связывания [32].

Таким образом, наблюдаемые нами отличия в связывании С3b клетками HUVEC при их инкубации с плазмой здоровых доноров и больных

COVID-19 могут быть обусловлены как различиями в его концентрации, так и воздействием на клетки HUVEC целого комплекса активных биологических веществ, присутствующих в высоких концентрациях в плазме крови больных.

Также нами были проанализированы размеры и форма C3/C3b-иммунопозитивных частиц, выявляемых после инкубации клеток с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. Выявляемые при анализе иммунопозитивные частицы имели разный размер. Площадь частиц варьировала от 2.2 до 72.5 мкм². Все частицы были распределены на группы согласно их площади. Видно, что количество частиц малого размера значительно превышало число крупных частиц. После инкубации HUVEC с плазмой больных количество иммунопозитивных частиц выше для всех представленных размеров (рис. 2), однако различия в группах, включающих небольшие частицы площадью 2.2–11 мкм², были менее выражены в сравнении с группами больших размеров. Для объяснения этого можно предположить, что гиперактивация системы комплемента в плазме больных COVID-19 приводит к локальной генерации C3b на мембране, следствием чего является образование на поверхности клеток более крупных иммунопозитивных частиц.

Для оценки формы нами было использовано отношение максимального диаметра Ферета к минимальному, или, иными словами, отношение условной длины к условной ширине объекта, имеющего неправильную форму. Было установлено, что иммунопозитивные частицы разного размера, регистрируемые в культуре клеток после инкубации с плазмой больных и здоровых, различались по форме (рис. 3). Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–11 мкм², образующиеся на поверхности HUVEC после инкубации с плазмой

больных COVID-19, имели более вытянутую форму в сравнении с контролем.

Причины выявленной нами гетерогенности C3/C3b-иммунопозитивных структур остаются невыясненными. Можно предположить, что выявленные различия в форме малых частиц обусловлены влиянием плазмы больных на экспонирование дополнительных участков связывания C3/C3b и разной локальной активностью системы комплемента. Так, как уже отмечалось выше, в плазме больных COVID-19 повышена концентрация веществ, стимулирующих секрецию фактора Виллебранда. Фактор Виллебранда представляет собой набор мультимеров разной длины, которая определяет их емкость связывания C3b. При этом мультимеры фактора Виллебранда в сравнении с Р-селектином способны связать больше молекул C3b и создать больше сайтов активации альтернативного пути комплемента. При связывании C3b с гипермультимерами фактора Виллебранда возможно формирование иммунопозитивных частиц вытянутой формы. Помимо присоединения к нормальным клеткам, C3b может связываться с апоптотическими и некротическими клетками и их фрагментами, что необходимо для ускорения их фагоцитоза [33]. Как уже было отмечено, мы не выявили различий в плотности ядер в культурах клеток, подвергшихся воздействию плазмы здоровых доноров и больных COVID-19. Косвенно это говорит о том, что плазма больных не привела к значимому снижению жизнеспособности клеток и их гибели. С другой стороны, нельзя исключить, что данный процесс мог быть запущен, но не успел вступить в активную фазу в отведенный нами на инкубацию период времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы установили, что клетки HUVEC способны связывать C3/C3b при взаимодействии с плазмой

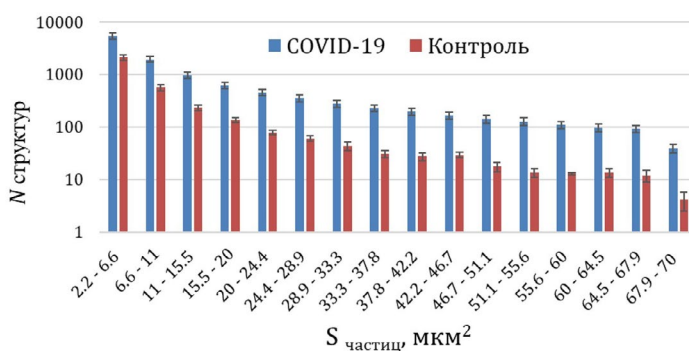


Рис. 2. Распределение C3/C3b-иммунопозитивных структур по количеству и площади в культуре клеток HUVEC после инкубации с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. *N* — среднее число иммунопозитивных структур заданного диапазона размеров в сканируемом поле зрения, полученное с 12 независимых случайных кадров ($p \leq 0.001$).

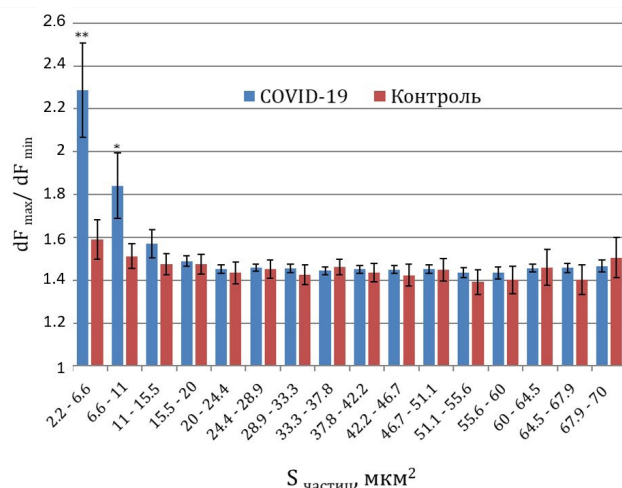


Рис. 3. Различия в форме C3/C3b-иммунопозитивных структур, регистрируемых после инкубации клеток HUVEC с плазмой здоровых доноров и больных COVID-19. $dF_{\max}$ — максимальный диаметр Ферета объекта, $dF_{\min}$ — минимальный диаметр Ферета объекта. Форму оценивали по отношению $dF_{\max}/dF_{\min}$. Чем выше это соотношение, тем более вытянутую форму имеют частицы. Иммунопозитивные частицы площадью 2.2–10.9 мкм² после инкубации с плазмой больных COVID-19 имели более вытянутую форму в сравнении с контролем (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

крови человека. Количество связавшегося C3/C3b с мембраной клеток при их контакте с плазмой крови больных COVID-19 была в несколько раз выше, чем при контакте с плазмой здоровых доноров. Полученные нами данные говорят о том, что связывание C3/C3b на поверхности клеток HUVEC может отражать уровень активности системы комплемента в плазме. Мы предполагаем, что этот подход может найти свое применение как способ комплексной оценки активности комплемента и его повреждающего воздействия на эндотелий при COVID-19 и других вирусных заболеваниях, сопровождаемых гиперактивацией комплемента и развитием тромботических микроангиопатий.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21–15–00441).

Соответствие принципам этики. Выполненные исследования соответствуют этическим принципам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям и этическим правилам клинических исследований, принятых в Российской Федерации. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное письменное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cugno M., Meroni P.L., Gualtierotti R., Griffini S., Grovetti E., Torri A., Lonati P., Grossi C., Borghi M.O., Novembrino C., Boscolo M., Uceda Renteria S.C., Valenti L., Lamorte G., Manunta M., Prati D., Pesenti A., Blasi F., Costantino G., Gori A., Bandera A., Tedesco F., Peyvandi F. 2021. Complement activation and endothelial perturbation parallel COVID-19 severity and activity. *J. Autoimmun.* **116**, 102560. doi 10.1016/j.jaut.2020.102560
2. Noris M., Benigni A., Remuzzi G. 2020. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* **98**, 314–322. doi 10.1016/j.kint.2020.05.013
3. Cugno M., Gualtierotti R., Possenti I., Testa S., Tel F., Griffini S., Grovetti E., Tedeschi S., Salardi S., Cresseri D., Messa P., Ardisino G. 2014. Complement functional tests for monitoring eculizumab treatment in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1440–1448. doi 10.1111/jth.12615
4. Zelek W.M., Harrison R.A. 2023. Complement and COVID-19: Three years on, what we know, what we don't know, and what we ought to know. *Immunobiology.* **228**, 152393. doi 10.1016/j.imbio.2023.152393
5. Afzali B., Noris M., Lambrecht B.N., Kemper C. 2022. The state of complement in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 77–84. doi 10.1038/s41577-021-00665-1
6. Avdonin P.P., Markitantova Yu. V., Rybakova E.Yu., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 2023. Activation of complement factor C3/ C3b deposition on the endothelial cell surface by histamine as one of the causes of endothelium damage in COVID-19. *Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **17** (Suppl.1), S51–S58. doi 10.1134/S1990747823070012
7. Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sankelidze O.G. 1987. [Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man]. *Bull. Eksp. Biol. Med.* **104**, 376–378.
8. Galbusera M., Noris M., Gastoldi S., Bresin E., Mele C., Breno M., Cuccarolo P., Alberti M., Valoti E., Piras R., Donadelli R., Vivarelli M., Murer L., Pecoraro C., Ferrari E., Perna A., Benigni A., Portalupi V., Remuzzi G. 2019. An *ex vivo* test of complement activation on endothelium for individualized eculizumab therapy in hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* **74**, 56–72. doi 10.1053/j.ajkd.2018.11.012
9. Noris M., Galbusera M., Gastoldi S., Macor P., Bantlerla F., Bresin E., Tripodo C., Bettoni S., Donadelli R., Valoti E., Tedesco F., Amore A., Coppo R., Ruggenenti P., Gotti E., Remuzzi G. 2014. Dynamics of complement activation in aHUS and how to

- monitor eculizumab therapy. *Blood*. **124**, 1715–1726. doi 10.1182/blood-2014-02-558296
10. Naß J., Terglane J., Gerke V. 2021. Weibel palade bodies: Unique secretory organelles of endothelial cells that control blood vessel homeostasis. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 813995. doi 10.3389/fcell.2021.813995
11. Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.A., Afshar-Kharghan V. 2005. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* **201**, 871–879. doi 10.1084/jem.20041497
12. Cleator J.H., Zhu W.Q., Vaughan D.E., Hamm H.E. 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*. **107**, 2736–2744. doi 10.1182/blood-2004-07-2698
13. Whiss P.A., Andersson R.G., Srinivas U. 1998. Kinetics of platelet P-selectin mobilization: Concurrent surface expression and release induced by thrombin or PMA, and inhibition by the NO donor SNAP. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 289–300. doi 10.3109/15419069809010788
14. Burns A.R., Bowden R.A., Abe Y., Walker D.C., Simon S.I., Entman M.L., Smith C.W. 1999. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 299–306. doi 10.1002/jlb.65.3.299
15. Repka-Ramirez M.S. 2003. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 227–231. doi 10.1007/s11882-003-0044-3
16. Foreman K.E., Vaporciyan A.A., Bonish B.K., Jones M.L., Johnson K.J., Glovsky M.M., Eddy S.M., Ward P.A. 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **94**, 1147–1155. doi 10.1172/JCI117430
17. Khew-Goodall Y., Butcher C.M., Litwin M.S., Newlands S., Korpelainen E.I., Noack L.M., Berndt M.C., Lopez A.F., Gamble J.R., Vadas M.A. 1996. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood*. **87**, 1432–1438.
18. Conti P., Caraffa A., Tete G., Gallenga C.E., Ross R., Kritas S.K., Frydas I., Younes A., Di Emidio P., Ronconi G. 2020. Mast cells activated by SARS-CoV-2 release histamine which increases IL-1 levels causing cytokine storm and inflammatory reaction in COVID-19. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. **34**, 1629–1632. doi 10.23812/20-2EDIT
19. Conway E.M., Mackman N., Warren R.Q., Wolberg A.S., Mosnier L.O., Campbell R.A., Gralinski L.E., Rondina M.T., van de Veerdonk F.L., Hoffmeister K.M., Griffin J.H., Nugent D., Moon K., Morrissey J.H. 2022. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 639–649. doi 10.1038/s41577-022-00762-9
20. Campello E., Bulato C., Spiezia L., Boscolo A., Polletto F., Cola M., Gavasso S., Simion C., Radu C.M., Cattelan A., Tiberio I., Vettor R., Navalesi P., Simioni P. 2021. Thrombin generation in patients with COVID-19 with and without thromboprophylaxis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **59**, 1323–1330. doi 10.1515/cclm-2021-0108
21. Chang Y., Bai M., You Q. 2022. Associations between serum interleukins (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and disease severity of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* **2022**, 2755246. doi 10.1155/2022/2755246
22. Benard A., Jacobsen A., Brunner M., Krautz C., Klosch B., Swierzy I., Naschberger E., Podolska M.J., Kouhestani D., David P., Birkholz T., Castellanos I., Trufa D., Sirbu H., Vetter M., Kremer A.E., Hildner K., Hecker A., Edinger F., Tenbusch M., Muhl-Zurbes P., Steinkasserer A., Richter E., Streeck H., Berger M.M., Brenner T., Weigand M.A., Swirski F.K., Schett G., Grutzmann R., Weber G.F. 2021. Interleukin-3 is a predictive marker for severity and outcome during SARS-CoV-2 infections. *Nat. Commun.* **12**, 1112. doi 10.1038/s41467-021-21310-4
23. Del Valle D.M., Kim-Schulze S., Huang H.H., Beckmann N.D., Nirenberg S., Wang B., Lavin Y., Swartz T.H., Madduri D., Stock A., Marron T.U., Xie H., Patel M., Tuballes K., Van Oekelen O., Rahman A., Kovatch P., Aberg J.A., Schadt E., Jagannath S., Mazumdar M., Charney A.W., Firpo-Betancourt A., Mendu D.R., Jhang J., Reich D., Sigel K., Cordon-Cardo C., Feldmann M., Parekh S., Merad M., Gnjjatic S. 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* **26**, 1636–1643. doi 10.1038/s41591-020-1051-9
24. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. **395**, 497–506. doi 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
25. Bettoni S., Galbusera M., Gastoldi S., Donadelli R., Tentori C., Sparta G., Bresin E., Mele C., Alberti M., Tortajada A., Yebenes H., Remuzzi G., Noris M. 2017. Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A fresh look to the pathophysiology of microvascular thrombosis. *J. Immunol.* **199**, 1021–1040. doi 10.4049/jimmunol.1601121
26. Favalaro E.J., Henry B.M., Lippi G. 2021. Increased VWF and decreased ADAMTS-13 in COVID-19: Creating a milieu for (micro)thrombosis. *Semin.*

- Thromb. Hemost.* **47**, 400–418.
doi 10.1055/s-0041–1727282
27. McConnell M.J., Kawaguchi N., Kondo R., Sonzogni A., Licini L., Valle C., Bonaffini P.A., Sironi S., Alessio M.G., Previtali G., Seghezzi M., Zhang X., Lee A., Pine A.B., Chun H.J., Zhang X., Fernandez-Hernando C., Qing H., Wang A., Price C., Sun Z., Utsumi T., Hwa J., Strazzabosco M., Iwakiri Y. 2021. Liver injury in COVID-19 and IL-6 trans-signaling-induced endotheliopathy. *J. Hepatol.* **75**, 647–658
doi 10.1016/j.jhep.2021.04.050
 28. Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Moake J.F., Dong J.F. 2004. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood.* **104**, 100–106.
doi 10.1182/blood-2004–01–0107 2004–01–0107
 29. Wagner D.D. 1990. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 217–246.
doi 10.1146/annurev.cb.06.110190.001245
 30. Aiello S., Gastoldi S., Galbusera M., Ruggerenti P., Portalupi V., Rota S., Rubis N., Liguori L., Conti S., Tironi M., Gamba S., Santarsiero D., Benigni A., Remuzzi G., Noris M. 2022. C5a and C5aR1 are key drivers of microvascular platelet aggregation in clinical entities spanning from aHUS to COVID-19. *Blood Adv.* **6**, 866–881.
doi 10.1182/bloodadvances.2021005246
 31. Miteva K.T., Pedicini L., Wilson L.A., Jayasinghe I., Slip R.G., Marszalek K., Gaunt H.J., Bartoli F., Deivasigamani S., Sobradillo D., Beech D.J., McKeown L. 2019. Rab46 integrates Ca^{2+} and histamine signaling to regulate selective cargo release from Weibel-Palade bodies. *J. Cell Biol.* **218**, 2232–2246.
doi 10.1083/jcb.201810118
 32. Law S.K., Levine R.P. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 2701–2705.
doi 10.1073/pnas.74.7.2701
 33. Martin M., Blom A.M. 2016. Complement in removal of the dead – balancing inflammation. *Immunol. Rev.* **274**, 218–232.
doi 10.1111/imr.12462

A New Approach to Analyze the State of the Complement System in Patients with COVID-19. Pilot Study

© 2024 г. P. P. Avdonin^{1, *}, L. A. Komleva¹, M. S. Blinova¹, E. S. Ivanova², O. N. Kotenko², N. F. Frolova², E. S. Stolyarevich², E. Y. Rybakova¹, P. V. Avdonin¹

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

² Moscow City Clinical Hospital 52, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

One of the risk factors for infection caused by SARS-CoV-2 is hyperactivation of the complement system, which can lead to activation and damage to the endothelium, thrombosis and, in some severe cases, the development of multiple organ failure. Using quantitative immunohistochemistry, we studied the opsonization of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by complement factors C3/C3b when exposed to blood plasma from patients with a confirmed diagnosis of COVID-19 in order to evaluate the possibility of using this approach to study the state of the complement system in COVID-19 ex vivo. For these purposes, FITC-labeled antibodies specific to the C3c domain of factors C3/C3b were used. The integral intensity of the recorded fluorescence and the number of C3/C3b-immunopositive structures were chosen as parameters for assessing the binding of C3/C3b to cells. We have shown that when HUVEC are incubated with plasma from patients, the total number of C3/C3b-immunopositive structures recorded on the membrane of these cells is 5.8 ± 2.8 times (mean $\pm$ SD, $p < 0.001$) higher than when exposed to plasma from healthy people. In this case, the integrated fluorescence intensity increased by 6.3 ± 3.2 times (mean $\pm$ SD, $p \leq 0.0001$) compared to the control. The area of immunopositive structures recorded after exposure to plasma cells from healthy donors and patients with COVID-19 and selected for analysis ranged from 2.2 to 70 μm^2 . Immunopositive particles with an area of 2.2–10.9 μm^2 after incubation with plasma of COVID-19 patients had a more elongated shape compared to controls. The average number of particles per cell was 0.49 ± 0.06 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) in the control, and 2.4 ± 0.4 (mean $\pm$ SD, $n = 13$, $p < 0.001$) during incubation with patient plasma. Analysis of particle area distribution showed that the most pronounced differences in the number of C3/C3b-immunopositive structures compared to the control were observed among large particles. Thus, we showed an increase in the level of opsonization of endothelial cells by complement factors C3/C3b in the presence of plasma from COVID-19 patients in comparison with control plasma. The increase is due to an increase in the number of C3/C3b-immunopositive structures, mostly large ones. We assume that the proposed approach will allow us to study the role of the complement system in damage to vascular endothelial cells in patients with COVID-19 using an ex vivo model, as well as to evaluate the level of complement activation in the plasma of patients and the effectiveness of their treatment.

Keywords: complement system, endothelial cells, COVID-19, factor C3, membrane attack complex