

УДК 578.233

АКТИВАЦИЯ ГИСТАМИНОМ СОРБЦИИ ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА C3/C3b НА ПОВЕРХНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ COVID-19

© 2024 г. П. П. Авдонин^а, Ю. В. Маркитантова^а, Е. Ю. Рыбакова^а, Н. В. Гончаров^б,
П. В. Авдонин^{а, *}

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

^бИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*e-mail: p.vavdonin@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

Подписана в печать 18.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

Повреждение эндотелия в результате активации системы комплемента является одной из причин тромботических осложнений при COVID-19. Ключевую роль в этом процессе играет фактор C3. Присоединение к мембране продукта его протеолиза C3b инициирует начало формирования мембраноатакующего комплекса C5b-9, образующего пору в плазматической мембране и гибель клетки. В настоящей работе мы исследовали, каким образом гистамин, секретируемый в организме в местах локального воспаления лейкоцитами и тучными клетками, может повлиять на связывание C3b с эндотелиальными клетками (ЭК). Для его визуализации были использованы конъюгированные с FITS антитела против C3c фрагмента. Данные антитела связываются с интактным C3 и с C3b, но не с C3a. Мы показали, что при инкубации плазмы крови человека с культивируемыми ЭК из пупочной вены человека происходит накопление фактора C3/C3b в виде округлых локальных и диффузных очагов на поверхности клеточного монослоя. Предварительная активация ЭК гистамином увеличивает количество мест прикрепления C3/C3b. Эти данные позволяют предполагать, что гистамин способен усиливать повреждение эндотелиального слоя при гиперактивации системы комплемента при COVID-19 и эндотелиопатиях, вызванных другими заболеваниями.

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

Список сокращений: МАК – мембраноатакующий комплекс; MASP-2 – сериновая протеаза-2, ассоциированная с связывающим маннозу белком; ЭК – эндотелиальные клетки; фВБ – фактор Виллебранда; HUVEC – эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells).

DOI: 10.31857/S0233475524010051, **EDN:** zmbcfc

ВВЕДЕНИЕ

Повреждение эндотелия в результате гиперактивации системы комплемента является одной из главных причин тромботических осложнений при COVID-19 и таких заболеваниях, как атипичный гемолитикоуремический синдром [1–7]. Комплемент представляет собой эволюционно древнюю врожденную систему иммунитета. Он включает в себя несколько десятков белковых факторов [8]. Часть из них — это протеазы. Классический путь активации комплемента начинается после связывания иммуноглобулина

G (IgG) или иммуноглобулина M (IgM) с антигенами чужеродного объекта. Далее белок комплемента C1 присоединяется к домену CH2 молекулы IgG или домену CH3 молекулы Ig M. После этого запускается каскад протеолитических реакций, который завершается формированием многокомпонентного мембраноатакующего комплекса (МАК), состоящего из факторов C5b, C6, C7, C8 и C9 и образующего пору в мембране микроорганизмов или собственных поврежденных клеток (рис. 1).

Помимо классического, система комплемента может активироваться по альтернативному

и лектиновому путям, но во всех случаях ключевую роль играет фактор С3 (рис. 1). Протеолиз С3 представляет собой точку схождения всех путей активации комплемента. При протеолизе С3 расщепляется на две части — анафилотоксин С3а и фактор С3b. Последний присоединяется к биологическим поверхностям — стенкам микроорганизмов, к собственным клеткам, межклеточному веществу за счет образования ковалентных связей с гидроксильными и аминогруппами углеводов и белковых молекул [9]. После прикрепления С3b в комплексе с другими факторами запускает дальнейший процесс активации комплемента, приводящий к формированию МАК. Кроме того, опсонизация проникших в кровь микроорганизмов фактором С3b делает их доступными мишенями для фагоцитоза. В нормальных условиях в здоровых клетках организма срабатывают регуляторные механизмы, предотвращающие активацию комплемента на следующих этапах после сорбции С3b.

Функция С3b в протеолитическом каскаде реакций активации комплемента заключается в расщеплении (конвертации) фактора С5. При классическом и лектиновом путях С5-конвертаза представляет собой комплекс С4b2a3b. При альтернативном пути С3b взаимодействует с фактором В с образованием сначала С3-конвертазы (С3bBb) и запуском петли амплификации альтернативного пути, т.е. расщепления С3 до С3а и С3b. Далее новообразованный С3b и С3bBb объединяются в комплекс С3bBbС3b. Он уже начинает работать как С5-конвертаза, расщепляющая неактивный фактор С5 до анафилактического пептида С5а и белка С5b. Как уже отмечено выше, к С5b на мембране последовательно присоединяются факторы С6, С7, С8 и С9. В итоге формируется мембраноатакующий комплекс (МАК) С5b-9 — крупная пора, нарушающая целостность мембраны бактерий [2].

Кроме уничтожения инородных биологических объектов система комплемента осуществляет удаление собственных отмирающих или зараженных клеток организма хозяина. При патологических состояниях, связанных с гиперактивностью системы комплемента [1–7], клетки эндотелия кровеносных сосудов могут восприниматься комплементом как чужеродные, что приводит к повреждению сосудистой стенки, тромбообразованию и нарушению кровообращения в целом. Образование МАК на поверхности эндотелия зависит от присутствия в плазме крови активных факторов комплемента — прежде всего С3b, от функционального состояния фактора Н и других регуляторных компонентов этой системы, а также от состояния ЭК, т.е. от их способности сорбировать фактор С3b и другие факторы комплемента на своей поверхности [10,

11]. На активность ЭК влияет множество гормонов, нейромедиаторов, ростовых факторов, продуктов превращения арахидоновой кислоты и т.д., которые потенциально могут влиять на экспонирование участков связывания факторов комплемента с клеточной поверхностью.

Целью работы было исследовать, каким образом активация ЭК гистамином влияет на присоединение к ним фактора С3b. Гистамин является мощным активатором клеток эндотелия. В организме этот биогенный амин вырабатывается тучными клетками и базофилами [12, 13], а также лимфоцитами [14]. Действуя через рецепторы Н1 и Н2, гистамин вызывает в ЭК увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме [15, 16] и синтез сАМР [17] соответственно. В качестве объекта исследования были выбраны культивируемые ЭК из пупочной вены человека (HUVES — human umbilical vein endothelial cells). Используя флуоресцентно окрашенные антитела, мы показали, что гистамин активирует присоединение С3/С3b к поверхности HUVES.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

HUVES выделяли согласно методу, описанному ранее [18]. Клетки выращивали в покрытых желатином пластиковых флаконах в среде М199 с солями Эрла и 20 мМ 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 (2–4). Для пассирования HUVES применяли аккутазу® (SigmaAldrich, США).

Для определения связывания фактора С3b с клетками их пересаживали в 48-луночный планшет. HUVES трижды отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (ФСР, pH 7.4), содержащим NaCl (145), KCl (5), HEPES (10), MgCl₂ (1), CaCl₂ (1), глюкозу (10 мМ). Далее HUVES инкубировали 10 мин при комнатной температуре в отсутствие или в присутствии 100 мкМ гистамина, трижды отмывали ФСР и инкубировали 2 ч с ФСР и 20% плазмы крови здорового донора при 35°C. Плазму получали из крови, взятой из локтевой вены с антикоагулянтом, содержащим цитрат натрия. После инкубации клетки отмывали холодным фосфатным солевым буфером (ФСБ) и фиксировали холодным 3% параформальдегидом в течение 25 мин. Клетки отмывали 3 раза раствором ФСБ, инкубировали 45 мин с 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ и далее в течение ночи инкубировали при

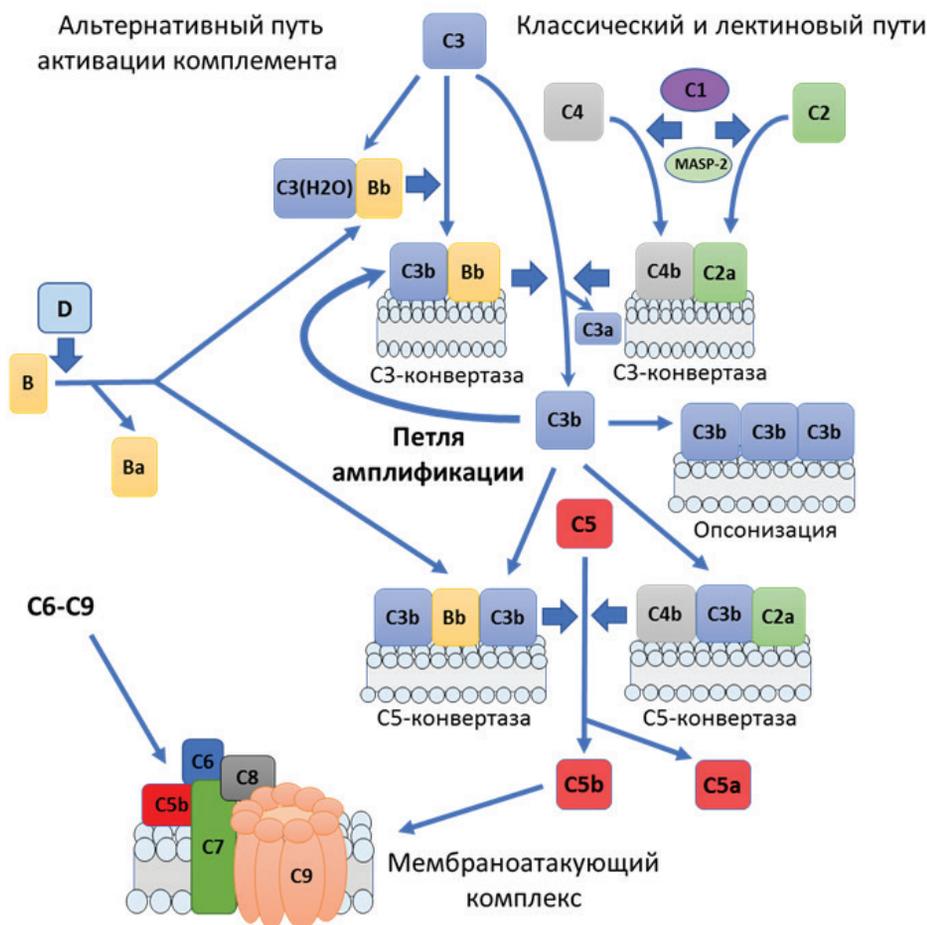


Рис. 1. Пути активации комплемента. Жирными стрелками обозначены места протеолиза факторов комплемента. MASP-2 — сериновая протеаза-2, ассоциированная с связывающим маннозу белком (mannose-binding protein-associated serine protease).

4°C с разведенными в 100 раз поликлональными FITS-конъюгированными антителами, специфичными к C3c (DAKO, F0201). C3c — это следующий после C3b продукт протеолитического расщепления фактора C3. Антитела против C3c связываются с C3 и C3b и не связываются с C3a [19]. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 (Leica, Германия) с использованием объектива 10×, диодного осветителя с длиной волны 488 нм и флуоресцентного фильтра L5 ET (Leica).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Excel 10. Достоверность отличий оценивали согласно *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Каждое значение представляет собой среднее 6 независимых измерений ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс активации системы комплемента по альтернативному пути с небольшой скоростью идет в организме постоянно [20]. При этом образующийся в плазме в небольших количествах C3b ковалентно связывается с биологической поверхностью, где он инактивируется либо запускает в комплексе с фактором Bb петлю амплификации альтернативного пути (рис. 1). В последнем случае идет локальное накопление C3b с переходом к следующему этапу активации системы комплемента. В нормальных условиях работа системы комплемента направлена на инактивацию появляющихся в крови в небольшом количестве чужеродных микроорганизмов, на удаление отмирающих клеток, однако при ее избыточной активности может происходить повреждение нормальных клеток

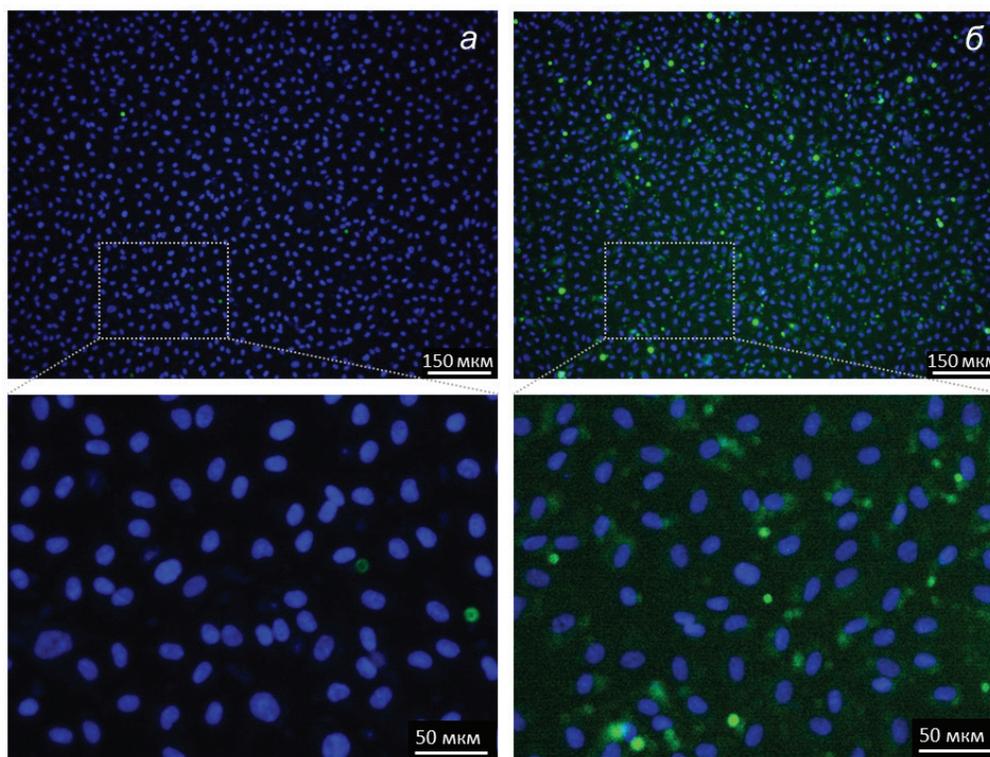


Рис. 2. Связывание фактора комплемента C3/C3b с HUVEC после инкубации их плазмой крови человека. *а* — Клетки инкубировали с ФСР без плазмы; *б* — в течение 2 ч HUVEC инкубировали с разведенной в 3 раза в ФСР плазмой крови здорового донора. Ядра окрашены Hoechst 33342.

и тканей. В такой ситуации объектом повреждения в числе первых становится эндотелий сосудов.

Взаимодействие комплемента с эндотелием можно оценивать в модельных экспериментах *ex vivo* при инкубации культивируемых клеток эндотелия с плазмой крови человека [20]. Мы проводили определение иммобилизованного на поверхности HUVEC фактора C3/C3b с помощью FITS-меченых антител. Используемые нами антитела активно применяются для визуализации фактора C3b на клетках [3, 10], но они могут связываться также с интактным фактором C3, но не с C3a. Поэтому, строго говоря, мы не можем исключить, что помимо C3b при флуоресцентной микроскопии мы получаем также изображение сорбированного на HUVEC интактного C3. Поэтому мы используем обозначение C3/C3b.

На рис. 2*а* показаны клетки HUVEC, которые инкубировали 2 ч в среде ФСР без добавления плазмы, и клетки, которые инкубировали с разведенной в 3 раза в среде ФСР плазмой крови человека (рис. 2*б*). По плотности расположения ядер видно, что HUVEC образуют сплошной монослой. После инкубации HUVEC с плазмой крови на поверхности клеток происходит сорбция фактора комплемента C3/C3b. Иммунопозитивные

структуры имеют вид округлых пятен диаметром в несколько микрон, наиболее крупные из которых сопоставимы по размерам с клеточными ядрами. Общее количество ярких пятен в поле зрения составляло около трех десятков. Помимо яркоокрашенных округлых пятен на HUVEC после инкубации с плазмой можно увидеть участки диффузного окрашивания клеток антителами, а также большое количество более бледных округлых пятен (рис. 2*б*). На поверхности контрольных клеток иммунопозитивных структур в виде пятен было многократно меньше — при внимательном рассмотрении можно увидеть несколько слабоокрашенных антителами пятен (рис. 2*а*). Диффузные иммунопозитивные структуры на поверхности контрольных клеток полностью отсутствовали. Мы предполагаем, что участки окрашивания фактора C3/C3b, которые выглядят как округлые пятна, — это места, где происходит запуск петель амплификации альтернативного пути активации комплемента, локальная генерация C3b и его аккумуляция на HUVEC.

На рис. 3 показано влияние гистамина на связывание C3/C3b с HUVEC. Видно, что после инкубации клеток с гистамином число участков клеточной поверхности, окрашенных FITS-мечеными

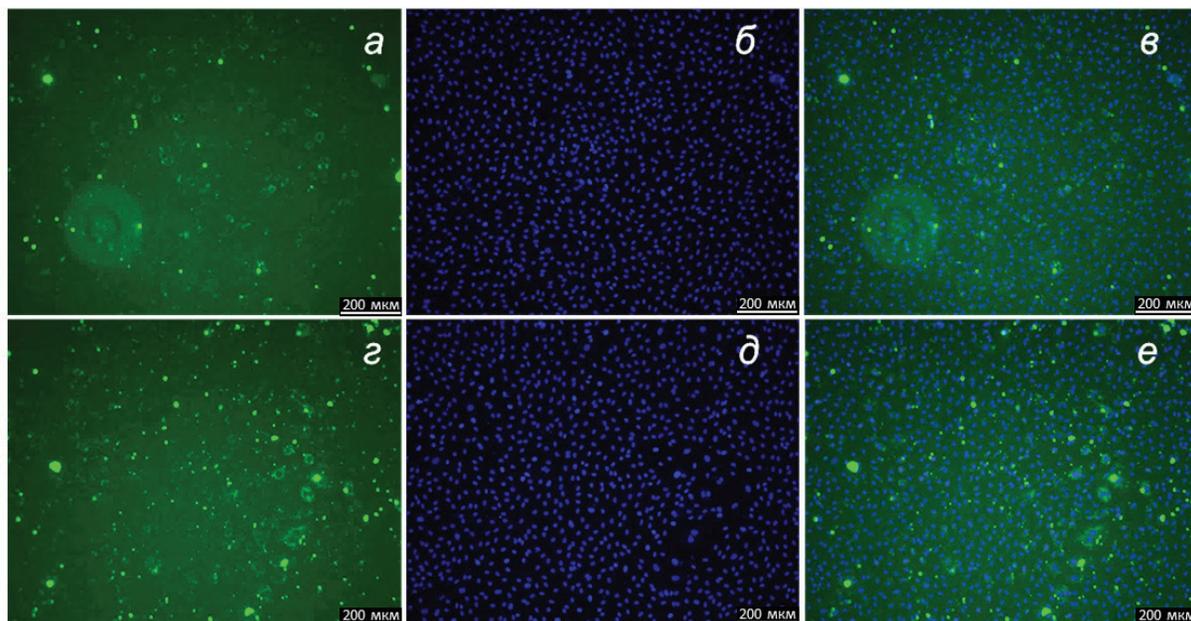


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание фактора C3/C3b и клеточных ядер в контрольных HUVEC (*a, б, в*) и в HUVEC, активированных гистамином (*г, д, е*). *a, г* — Клетки, окрашенные FITC-мечеными антителами против C3/C3b; *б, д* — ядра клеток, окрашенные с помощью Hoechst 33342; *в* — наложение изображений *a* и *б*, *е* наложение изображений *г* и *д*. Клетки 10 мин инкубировали в ФСР в отсутствие (*a, в*) или в присутствии 100 мкМ гистамина (*б, г*). После этого отмывали от гистамина и инкубировали в течение 2 ч в ФСР с разведенной в 3 раза плазмой крови здорового донора.

антителами, значительно возрастает. Для количественной оценки действия гистамина была использована программа CellProfiler. При анализе проводился подсчет иммунопозитивных структур разной степени яркости и количества ядер в поле зрения для определения числа клеток. Количество окрашенных антителами против C3/C3b пятен в пересчете на число клеток в отсутствие гистамина составляло чуть более 3 на 10 клеток (рис. 4*a*). После 10-минутной инкубации HUVEC с гистамином количество окрашенных антителами участков клеточной поверхности возрастало в 1.7 ± 0.2 раза.

Основным источником фактора поступления C3 в плазму крови являются печень, однако известно, что в эндотелии также происходит синтез этого фактора комплемента, где он может расщепляться до C3b и экспонироваться на ЭК [21]. С помощью программы CellProfiler было определено количество окрашенных антителами участков в клетках, которые инкубировали без плазмы. Оно составило менее 1% от числа участков экспонирования C3/C3b в HUVEC после инкубации в присутствии плазмы, причем в условиях без плазмы гистамин не увеличивал количество окрашенных частиц (рис. 4*б*).

Присоединение C3/C3b из плазмы крови человека к поверхности культивируемых ЭК показано в работах Noris и соавт. [10]. Этими авторами была продемонстрирована количественная связь между содержанием в плазме фактора C3b и его сорбцией на поверхности культивируемых ЭК. На основе этого метода ими предложен тест для оценки состояния системы комплемента при гемолитикоуремическом синдроме. Наши исследования говорят о том, что количество фактора C3/C3b, присоединяющегося к мембране, зависит не только от содержания его в плазме, но и от количества посадочных мест на клетках. Как показали результаты представленного эксперимента (рис. 3, 4), плотность участков связывания C3/C3b увеличивается при активации клеток гистамином. Присоединение C3b к поверхности клеток приводит к следующему этапу активации комплемента — образованию C5-конвертазы, расщепляющего фактор C5 до C5b и C5a. При этом можно ожидать, что для данного процесса характерно самоусиление, поскольку высвобождение анафилактического пептида C5a будет стимулировать секрецию гистамина находящимися рядом базофилами и тучными клетками [12, 13].

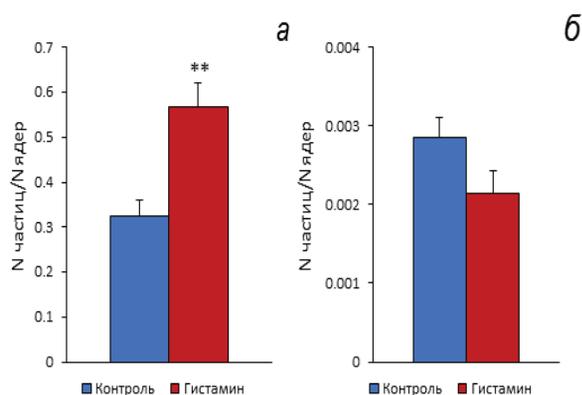


Рис. 4. Влияние гистамина на присоединение фактора С3/С3b к HUVEC. Клетки инкубировали с разведенной в 3 раза в ФСР плазмой крови (а) или в ФСР без плазмы (б). Показано среднее количество участков отложения С3/С3b в пересчете на одну клетку без инкубации с гистамином или после предварительной активации HUVEC гистамином. Приведены результаты 6 независимых измерений (** $p < 0.01$).

Вопрос о том, каким образом гистамин стимулирует сорбцию С3/С3b на мембране HUVEC, требует дальнейшего изучения. Нам представляется наиболее вероятным сценарий, согласно которому под влиянием гистамина на мембране HUVEC увеличивается количество участков, по которым происходит ковалентное присоединение С3b к клеткам. С3b и С3а постоянно образуются в плазме крови в результате протеолиза С3 так называемой жидкофазной С3-конвертазой (рис. 1а). Эта ферментативная активность появляется у фактора С3 после спонтанного гидролиза в его молекуле тиоэфирной связи. Изоформа фактора С3 с гидролизованной внутренней тиоэфирной связью носит название С3(Н₂О). В С3b сохраняется внутренняя тиоэфирная связь. Ее разрыв сопровождается образованием ковалентной эфирной связи с гидроксильными или аминогруппами углеводных остатков гликопротеинов на поверхности клеток [22]. В качестве посадочного места на HUVEC могут выступать фактор Виллебранда (фВБ) и Р-селектин. Bettoni и соавт. [1] показали, что С3b присоединяется к экспонированной на мембране ЭК молекуле фВБ по трем А-доменам его мономера, но сборка активной С5-конвертазы и запуск альтернативного пути активации комплемента с расщеплением С5 и формированием С5b-9 происходит на домене А2. В свою очередь, группа Del Conde продемонстрировала способность Р-селектина связывать С3b и инициировать активацию комплемента [23].

Известно, что гистамин вызывает экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе, содержащих фВБ и Р-селектин, и таким образом увеличивает экспонирование этих гликопротеинов на поверхности ЭК [24–27]. Помимо образования ковалентных связей с гидроксильными и аминогруппами поверхностных гликопротеинов и углеводов, С3b может нековалентно связываться с фактором Н, с мембранным кофакторным белком (МСР или CD46) [28, 29]. В ряде клеток организма человека (В- и Т-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, эритроцитах и эпителиальные клетках клубочков) экспрессируется специфический рецептор С3b — CR1/CD35, однако в ЭК данный рецептор отсутствует [30].

Можно предположить, что, помимо присоединения к HUVEC фактора С3/С3b из плазмы крови, на поверхности клеток происходит активация системы комплемента и локальная генерация С3b. Ранее было показано, что активация комплемента по альтернативному пути может происходить на апоптозных клетках HUVEC, отрывающихся от монослоя [31]. Установлено, что при этом С3b присоединяется к клеткам за счет образования эфирных и амидных связей с мембранными белками. Помимо альтернативного, на ЭК может происходить активация классического пути комплемента. Этот путь запускается после связывания первого компонента системы комплемента С1q со своим рецептором на мембране ЭК — gC1qR/p33. Активация комплемента по классическому пути происходит на HUVEC при апоптозе, вызванном гипоксией/реоксигенацией [32, 33] и при воздействии на клетки напряжения сдвига [34]. При классическом пути так же, как и при альтернативном, происходит накопление на мембране фактора С3b.

При коронавирусной инфекции у умерших больных на поверхности эндотелия капилляров легких, печени и почек выявлено отложение факторов комплемента Вb, С1q, С4, С3 и С5b-9, что указывает на активацию комплемента по классическому и альтернативному путям [35]. Маркеры лектинового пути MBL и MASP-2 в легких практически не обнаруживались. В сосудах головного мозга повреждение эндотелия у больных COVID-19 происходит в результате активации комплемента по классическому пути [36]. Есть данные о запуске N-белком коронавируса SARS-CoV-2 лектинового пути активации комплемента [37]. Как уже отмечено выше, точкой конвергенции всех путей активации системы комплемента является образование активного компонента С3b (рис. 1) в результате протеолиза фактора С3. С3b присоединяется к ЭК сосудов и запускает финальные этапы процесса формирования мембраноатакующего комплекса

C5b-9. Увеличение связывания C3b с эндотелием под влиянием гистамина должно усиливать этот процесс и оказывать дополнительное отягощающее действие при тромботических осложнениях у больных с коронавирусной инфекцией.

Действительно, клинические данные свидетельствуют о вкладе гистамина в патогенез коронавирусной инфекции. Вирус SARS-CoV-2 активирует секрецию гистамина тучными клетками [38]. Гистамин, в свою очередь, способствует цитокиновому шторму и усиливает воспалительные реакции. Напротив, при подавлении действия гистамина течение болезни становится более благоприятным. По данным Hogan и соавт. [39], применение блокаторов H1 и H2 рецепторов цетиризина (cetirizine) и фамотидина (famotidine) у тяжелых и крайне тяжелых больных COVID-19 на 15.5% снижало смертность и уменьшало продолжительность госпитализации. В эксперимента *ex vivo* мы показали, что гистамин усиливает активацию комплемента на HUVEC. Исходя из этих результатов, мы предполагаем, что при COVID-19 гистамин также способствует гиперактивации системы комплемента, повреждению сосудистого эндотелия и развитию тромботических осложнений. Такой эффект гистамина представляет еще одно звено в патогенетическом механизме коронавирусной инфекции.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00441).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601121>
- Blasco M., Guillen-Olmos E., Diaz-Ricart M., Palomo M. 2022. complement mediated endothelial damage in thrombotic microangiopathies. *Front Med (Lausanne)*. **9**, 811504. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.811504>
- Noris M., Benigni A., Remuzzi G. 2020. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* **98**, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.013>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102560>
- Ge X., Yu Z., Guo X., Li L., Ye L., Ye M., Yuan J., Zhu C., Hu W., Hou Y. 2023. Complement and complement regulatory proteins are upregulated in lungs of COVID-19 patients. *Pathol. Res. Pract.* **247**, 154519. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154519>
- Marchetti M. 2020. COVID-19-driven endothelial damage: complement, HIF-1, and ABL2 are potential pathways of damage and targets for cure. *Ann. Hematol.* **99**, 1701–1707. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04138-8>
- Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. 2021. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**, 46–64. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>
- Arbore G., Kemper C., Kolev M. 2017. Intracellular complement — the complosome — in immune cell regulation. *Mol. Immunol.* **89**, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.012>
- Boudhabhay I., Grunenwald A., Roumenina L.T. 2021. Complement C3 deposition on endothelial cells revealed by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **2227**, 97–105. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1016-9_9
- Noris M., Galbusera M., Gastoldi S., Macor P., Banterla 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-558296>
- Noris M., Mescia F., Remuzzi G. 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 622–633. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.195>
- Ponomaryov T., Payne H., Fabritz L., Wagner D.D., Brill A. 2017. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice. *Circ. Res.* **121**, 941–950. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311185>
- Borriello F., Iannone R., Marone G. 2017. histamine release from mast cells and basophils. *Handb. Exp. Pharmacol.* **241**, 121–139. https://doi.org/10.1007/164_2017_18
- Schmutzler W., Bolsmann K., Zwadlo-Klarwasser G. 1995. Comparison of histamine release from human blood monocytes, lymphocytes, adenoidal and skin

- mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 194–196. <https://doi.org/10.1159/000236974>
15. Hamilton K.K., Sims P.J. 1987. Changes in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *J. Clin. Invest.* **79**, 600–608. <https://doi.org/10.1172/JCI112853>
 16. Ryan U.S., Avdonin P.V., Posin E.Y., Popov E.G., Danilov S.M., Tkachuk V.A. 1988. Influence of vasoactive agents on cytoplasmic free calcium in vascular endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* **65**, 2221–2227. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.65.5.2221>
 17. Hekimian G., Cote S., Van Sande J., Boeynaems J.M. 1992. H2 receptor-mediated responses of aortic endothelial cells to histamine. *Am.J. Physiol.* **262**, H220–H224. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.262.1.H220>
 18. Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sakandelidze 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. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **104**, 376–378.
 19. 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. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.11.012>
 20. Meuleman M.S., Duval A., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T., Chauvet S. 2022. Ex vivo test for measuring complement attack on endothelial cells: From research to bedside. *Front. Immunol.* **13**, 860689. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.860689>
 21. West E.E., Kemper C. 2023. Complosome — the intracellular complement system. *Nat. Rev. Nephrol.* **19**, 426–439. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00704-1>
 22. Law S.K.A., Levine R.P. 1919. The covalent binding story of the complement proteins C3 and C4 (I) 1972–1981. *Immunobiology.* **224**, 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.003>
 23. 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. <https://doi.org/10.1084/jem.20041497>
 24. Esposito B., Gambarà G., Lewis A.M., Palombi F., D'Alessio A., Taylor L.X., Genazzani A.A., Ziparo E., Galione A., Churchill G.C., Filippini A. 2011. NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells. *Blood.* **117**, 4968–4977. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266338>
 25. Avdonin P.V., Rybakova E.Y., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Mironova G.Y., Tsitrina A.A., Goncharov N.V. 2019. VAS2870 inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells. *Cells.* **8** (2), 196. <https://doi.org/10.3390/cells8020196>
 26. Avdonin P.P., Trufanov S.K., Rybakova E.Y., Tsitrina A.A., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 2021. The use of fluorescently labeled ARC1779 aptamer for assessing the effect of H₂O₂ on von Willebrand factor exocytosis. *Biochemistry (Mosc).* **86**, 123–131. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020012>
 27. Jones D.A., Abbasi O., McIntire L.V., McEver R.P., Smith C.W. 1993. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys. J.* **65**, 1560–1569. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81195-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81195-0)
 28. Schramm E.C., Roumenina L.T., Rybkine T., Chauvet S., Vieira-Martins P., Hue C., Maga T., Valoti E., Wilson V., Jokiranta S., Smith R.J., Noris M., Goodship T., Atkinson J.P., Fremeaux-Bacchi V. 2015. Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* **125**, 2359–2369. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-609073>
 29. McNearney T., Ballard L., Seya T., Atkinson J.P. 1989. Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **84**, 538–545. <https://doi.org/10.1172/JCI114196>
 30. Alexander J.J., He C., Adler S., Holers V.M., Quigg R.J. 1997. Characterization of C3 receptors on cultured rat glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* **51**, 1124–1132. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.155>
 31. Tsuji S., Kaji K., Nagasawa S. 1994. Activation of the alternative pathway of human complement by apoptotic human umbilical vein endothelial cells. *J. Biochem.* **116**, 794–800. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124598>
 32. Collard C.D., Vakeva A., Bukusoglu C., Zund G., Sperati C.J., Colgan S.P., Stahl G.L. 1997. Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation.* **96**, 326–333. <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.1.326>
 33. Mold C., Morris C.A. 2001. Complement activation by apoptotic endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Immunology.* **102**, 359–364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01192.x>
 34. Yin W., Ghebrehiwet B., Weksler B., Peerschke E.I. 2007. Classical pathway complement activation on human endothelial cells. *Mol. Immunol.* **44**, 2228–2234. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.11.012>
 35. Macor P., Durigutto P., Mangogna A., Bussani R., De Maso L., D'Errico S., Zanon M., Pozzi N., Meroni P.L., Tedesco F. 2021. Multiple-organ complement deposition on vascular endothelium in COVID-19 patients. *Biomedicines.* **9**, 1003. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081003>

36. Maicu S.I., Tatomir A., Cuevas J., Rus V., Rus H. 2023. COVID, complement, and the brain. *Front Immunol.* **14**, 1216457. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1216457>
37. Gao T., Zhu L., Liu H., Zhang X., Wang T., Fu Y., Li H., Dong Q., Hu Y., Zhang Z., Jin J., Liu Z., Yang W., Liu Y., Jin Y., Li K., Xiao Y., Liu J., Zhao H., Liu Y., Li P., Song J., Zhang L., Gao Y., Kang S., Chen S., Ma Q., Bian X., Chen W., Liu X., Mao Q., Cao C. 2022. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct. Target Ther.* **7**, 318. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01133-5>
38. 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. <https://doi.org/10.23812/20-2EDIT>
39. Hogan Ii R.B., Hogan Iii R.B., Cannon T., Rappai M., Studdard J., Paul D., Dooley T.P. 2020. Dual-histamine receptor blockade with cetirizine — famotidine reduces pulmonary symptoms in COVID-19 patients. *Pulm Pharmacol Ther.* **63**, 101942. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2020.101942>

Activation of Complement Factor C3/C3b Deposition on the Surface of Endothelial Cells by Histamine As one of the Causes of Endothelium Damage in COVID-19

© 2024 г. П. П. Авдонин¹, Ю. В. Маркитантова¹, Е. Ю. Рыбакова¹, Н. В. Гончаров², П. В. Авдонин^{1, *}

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

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

Damage of the endothelium as a result of activation of the complement system is one of the causes of thrombotic complications in COVID-19. Factor C3 plays a key role in this process. The attachment of its proteolytic product C3b to the cells initiates the formation of the membrane attack complex C5b-9, which forms a pore in the plasma membrane and cell death. Here, we investigated how histamine, secreted in the body by leukocytes and mast cells, can affect the binding of C3b to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). To visualize it, FITS-conjugated antibodies against the C3c were used. These antibodies bind to intact C3 and to C3b but not to C3a. We have shown that when cultured HUVECs are incubated with human blood plasma, factor C3/C3b accumulates in the form of rounded and diffuse foci on the surface of the endothelial cell monolayer. Pre-activation of HUVEC by histamine increases the number of C3/C3b attachment sites. These data suggest that histamine may enhance endothelial damage during complement hyperactivation in COVID-19 and in endotheliopathies caused by other diseases.

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