

# ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ МОНОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ COVID-19 МЕТОДОМ НИЗКОВОЛЬТНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

**А. А. Вельмискина<sup>1,2</sup>, Ю. В. Никитин<sup>3</sup>, В. Ю. Михайловский<sup>2</sup>, С. В. Мосенко<sup>1,2</sup>, А. Ю. Анисенкова<sup>1,2</sup>, С. В. Апалько<sup>1,2</sup>, Н. Н. Сушенцева<sup>1</sup>, С. Г. Щербак<sup>1,2</sup>, А. М. Иванов<sup>3</sup>, Н. К. Галактионов<sup>1</sup>, О. В. Шнейдер<sup>1</sup>, К. А. Кондратов<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>*СПб ГБУЗ «Городская больница №40», Сестрорецк, ул Борисова д. 9, г. Санкт-Петербург, 197706, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. д. 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия*

<sup>3</sup>*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева д. 6, г. Санкт-Петербург, 194044, Россия*

\*E-mail: [kondratovk.kirill@yandex.ru](mailto:kondratovk.kirill@yandex.ru)

Краткий реферат статьи.

Тяжелое течение COVID-19 в основном обусловлено гиперактивацией иммунной системы — цитокиновым штормом. Главные участники это клетки иммунной системы. (лимфоциты, моноциты, и др). Морфология этих клеток изучена недостаточно. Целью работы было изучение морфологии лимфоцитов и моноцитов при цитокиновом шторме с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Из крови контрольных доноров (n=6) и пациентов (n=5) с цитокиновым штормом, вызванным COVID-19 (интерлейкин-6 > 23нг/мкл, положительный мазок на COVID-19), с помощью флуоресцентного сортирования выделялись моноциты и лимфоциты. С помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения изучалась их морфология. Для каждого пациента исследовалось 11-32 индивидуальных клеток при увеличении в 18-32 тыс. раз. Измерение клеток показало увеличение размеров моноцитов при цитокиновом шторме (P=0.0001).

Ключевые слова: моноциты, лимфоциты, цитокиновый шторм, сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения, COVID-19.

## **Введение**

Высокая смертность при COVID-19 зачастую определяется не столько большой вирусной нагрузкой, сколько гиперактивацией иммунной системы, получившей название цитокинового шторма. Огромную роль в патогенезе цитокинового шторма, вызванного COVID-19, играют клетки моноциты и лимфоциты. Для этого заболевания характерно изменение состава субпопуляций моноцитов в периферической крови, миграция этих клеток в лёгкие [1]. Также известно, что как количество этих клеток в периферической крови [2], так и их морфология [3] могут являться важными диагностическими и прогностическими факторами факторами тяжелого течения COVID-19. По этой причине особую значимость приобретает изучение патологических изменений морфологии моноцитов и лимфоцитов.

Цитокиновый шторм вызывает большое количество аномалий морфологии лимфоцитов. А именно: при цитокиновом шторме наблюдается наличие больших гранулярных лимфоцитов [4-8], лимфоцитов с вакуолизацией и инвагинациями ядер [9,10], плазмцитоподобных [6] и удлинённых лимфоцитов [11]. У моноцитов наблюдается вакуолизация ядер [10] и цитоплазмы [7,8] увеличение объема клеток [12]. Следует отметить, что в большинстве работ в основном исследовалась внутренняя структура клеток при цитокиновом шторме (методами световой микроскопии [9] или трансмиссионной электронной микроскопии [11]) или их очертание и весьма приблизительные размеры (метод микрочипов) [12]. Однако морфология клеточной поверхности при цитокиновом шторме исследована недостаточно. Одним из наиболее мощных методов проведения таких исследований является сканирующая электронная микроскопия. Модификация этого метода, низковольтная сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения, позволяет детально исследовать клеточную поверхность без нанесения токопроводящего покрытия, а следовательно, искажения этой поверхности [13]. Задачами нашей работы было сравнение морфологии моноцитов и лимфоцитов в норме и при цитокиновом шторме, поиск морфологических особенностей, появляющихся у этих клеток, а также сравнение размеров моноцитов и лимфоцитов в этом состоянии.

Целью работы было изучение морфологии лимфоцитов и моноцитов при цитокиновом шторме с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения.

## **Методика исследования**

После получения информированного согласия периферическую кровь здоровых доноров (3-х мужчин и 3-х женщин) и пациентов с цитокиновым штормом, вызванным COVID-19, (4-х мужчин и 1-ой женщины) забирали в пробирки с К<sub>3</sub>ЭДТА. Критерием отбора

пациентов с цитокиновым штормом, вызванным COVID-19, было наличие положительного мазка из носоглотки на COVID-19 по крайней мере на начальной стадии заболевания, и уровень интерлейкина-6 в крови больше 23 нг/мкл (хорошо известный маркер цитокинового шторма и тяжелого течения COVID-19 [14]). Клинические данные пациентов приведены в таблице 1.

Номер пациента	Пол	Возраст, годы	Лимфоциты 10 <sup>9</sup> /л	Моноциты 10 <sup>9</sup> /л	Нейтрофилы 10 <sup>9</sup> /л	Эозинофилы 10 <sup>9</sup> /л	Базофилы 10 <sup>9</sup> /л	Тромбоциты 10 <sup>9</sup> /л	Эритроциты 10 <sup>12</sup> /л	Интерлейкин-6 пг/мл	Состояние на момент забора
1	М	53	2,73	1,73	9,61	0,33	0,03	395	3,18	34	Тяжелое
2	М	57	0,36	0,26	8,6	0,19	0,1	340	4,07	204	Тяжелое
3	М	73	1,03	0,5	11,16	0	0,01	127	4,69	62	Тяжелое
4	Ж	75	0,71	0,45	1,04	0	0,01	127	3,72	24	Средней тяжести
5	М	76	0,65	0,11	3,16	0,03	0,01	210	3,77	2398	Средней тяжести

Таблица 1. Клинические данные пациентов с цитокиновым штормом, вызванным COVID-19.

Из полученной крови отделяли клеточную массу центрифугированием в течение 10 минут при 1500 g. Плазму удаляли, эритроциты лизировали раствором VersaLyse (Beckman Coulther), а затем окрашивали клетки антителами против белков CD45-APC, CD14-PC5.5 и CD16-PC7 (Beckman Coulther). После окраски препарат смешивали с PBS и проводили сортировку на приборе MoFlow Astrious (Beckman Coulther). Выделение популяции мононуклеаров осуществляли по показателям прямого и бокового светорассеяния (fsc vs ssc), затем выделяли моноцитарную популяцию по экспрессии CD14. После этого, методом исключения (not CD14), гейтировали лимфоциты (CD45 vs SSC). Фиксацию на стеклах, обезвоживание и сканирующую электронную микроскопию полученных отсортированных клеток проводили по ранее описанной процедуре [15] на микроскопе Zeiss Merlin.

Для дальнейшего анализа использовали только изображения одиночных клеток, полученные при увеличении в 18-32 тыс. раз, по 11-32 индивидуальных изображений для каждого пациента. Всего был измерен 131 лимфоцит у контрольных доноров и 126 у пациентов с цитокиновым штормом; 133 моноцита у контрольных доноров и 97 у

пациентов с цитокиновым штормом. Анализ изображений выполнялся в программе Fiji. После калибровки масштаба изображения, сопоставляя известную цену деления шкалы прибора в микрометрах с соответствующей величиной в пикселях («Set Scale»). Затем выделяли клетку («Wang (tracing) tool») и измеряли диаметр Ферета, соответствующий максимальному расстоянию между двумя точками по границе выделения, с помощью команды «Measure». Статистическая обработка проводилась в программе R-studio (версия 4.2.2). Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (U-критерий).

### Результаты исследования

Одним из главнейших недостатков метода сканирующей электронной микроскопии является невозможность точно идентифицировать тип лейкоцита на микрофотографии, поскольку виды этих клеток (моноциты, лимфоциты, нейтрофилы и др.) зачастую обладают схожей морфологией [16]. По этой причине мы решили разделить клетки с помощью антител против разных молекул клеточной поверхности. Разделение проводили методом флуоресцентного сортирования и исследовали каждый из полученных типов клеток отдельно. Некоторые из полученных фотографий представлены на рисунках 1 (лимфоциты контрольных доноров), 2 (лимфоциты пациентов с цитокиновым штормом), 3 (моноциты контрольных доноров) и 4 (моноциты пациентов с цитокиновым штормом). Изображения клеток отобраны специально для демонстрации разнообразия их морфологии.

Как видно на представленных рисунках 1 и 2, форма клеток лимфоцитов сильно варьировала и в норме, и при цитокиновом шторме. Встречались сферические клетки с относительно гладкой поверхностью (рисунок 1, панель а; рисунок 2, панель а), так и сферические клетки с поверхностью покрытой рафлами (рисунок 1, панель б; рисунок 2, панель б), пузырями (рисунок 1, панель в; рисунок 2, панель в). Часть клеток теряла сферическую форму (рисунок 1, панель г; рисунок 2, панель г). Также наблюдались все переходные формы между этими типами клеток. Однако следует отметить что при цитокиновом шторме чаще наблюдались лимфоциты, имеющие широкие выросты клеток (рисунок 2, панель г) по 1-2 выроста на клетку. Однако, следует отметить, что схожие выросты иногда встречались и у контрольных пациентов. В целом, подобные структуры были обнаружены у одного донора из шести в контроле и у четырёх из пяти при цитокиновом шторме. Однако небольшой размер выборки не позволяет сделать четкий статистически достоверный вывод о том, что количество клеток этого типа достоверно увеличивается при цитокиновом шторме. Следует отметить что схожие результаты по морфологии лимфоцитов были получены другими исследователями с помощью световой микроскопии [9]. Согласно их данным у больных с цитокиновым штормом чаще встречаются аномальные лимфоциты,

имеющие широкие выросты, но подобные аномальные клетки встречаются и в крови нормальных доноров. Вероятно, появление подобных аномальных форм связано с повышенной синтетической активностью лимфоцитов при цитокиновом шторме.

Морфология моноцитов также была весьма разнообразна. В препаратах были обнаружены сферические клетки с гладкой поверхностью (рисунок 3, панель а; рисунок 4, панель а), с поверхностью богатой рафлами (рисунок 3, панель б; рисунок 4, панель б). Помимо этого присутствовали моноциты, имеющие пузыри на своей поверхности (рисунок 3, панель в; рисунок 4, панель в). Кроме того, встречались клетки, имеющие неправильную, амебоидную форму (рисунок 3, панель г; рисунок 4, панель г), как правило с большим количеством пузырей на поверхности. В двух сравниваемых группах обнаруживались все типы и преимущественного присутствия каких-либо конкретных морфотипов моноцитов в группе контроля и группе цитокинового шторма мы не выявили.

Вообще, следует отметить, что морфология поверхности обоих типов клеток была весьма сложна для анализа. В связи с этим мы решили выбрать достаточно простой параметр для поиска отличий между этими двумя группами. В качестве такого параметра мы использовали размер клетки. Как видно на представленном рисунке 5, размер лимфоцитов не менялся, а размер моноцитов незначительно повышался при цитокиновом шторме. Следует отметить, что подобное увеличение размеров моноцитов при цитокиновом шторме, вызванном COVID-19, наблюдалось и другими исследователями [17]. Также известно, что увеличение размеров моноцитов происходит при септических процессах [18], что может быть свидетельством схожести процессов сепсиса и цитокинового шторма.

Работа выполнена с использованием оборудования МРЦ “Нанотехнологии” Санкт-Петербургского Государственного университета при финансовой поддержке гранта СПбГУ “Комплексное исследование молекулярно-генетических основ коронавирусной инфекции SARS-COV-2 путём анализа генома коронавируса COVID-19 и анализа генома (экзома) пациентов с различной степенью тяжести”.

## Литература

1. Merad M., Martin J.C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20(6):355-362.
2. Idiz U.O., Yurttas T.T., Degirmencioglu S., Orhan B., Erdogan E., Sevik H., Sevinc M.M. Immunophenotyping of lymphocytes and monocytes and the status of cytokines in the clinical course of Covid-19 patients. *J. Med. Virol.* 2022;94(10):4744-4753.
3. Gabr H., Bastawy S., Abdel Aal A.A., Khalil N.M., Fateen M. Changes in peripheral blood cellular morphology as diagnostic markers for COVID-19 infection. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022;44(3):454-460.
4. Pezeshki A., Vaezi A., Nematollahi P. Blood cell morphology and COVID-19 clinical course, severity, and outcome. *J. Hematop.* 2021;14(3):221-228.
5. Zini G., Bellesi S., Ramundo F., d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *Am. J. Hematol.* 2020;95(7):870-872.
6. Schapkaitz E., De Jager T., Levy B. The characteristic peripheral blood morphological features of hospitalized patients infected with COVID-19. *Int. J. Lab. Hematol.* 2021;43(3):e130-e134.
7. Kaur G., Sandeep F., Olayinka O., Gupta G. Morphologic Changes in Circulating Blood Cells of COVID-19 Patients. *Cureus.* 2021;13(2):e13416.
8. Pozdnyakova O., Connell N.T., Battinelli E.M., Connors J.M., Fell G., Kim A.S. Clinical Significance of CBC and WBC Morphology in the Diagnosis and Clinical Course of COVID-19 Infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 2021;155(3):364-375.
9. Sadigh S., Massoth L.R., Christensen B.B., Stefely J.A., Keefe J., Sohani A.R. Peripheral blood morphologic findings in patients with COVID-19. *Int. J. Lab. Hematol.* 2020;42(6):e248-e251.
10. Bahadur S., Kalonia T., Kamini K., Gupta B., Kalhan S., Jain M. Changes in peripheral blood in SARS CoV-2 patients and its clinico-pathological correlation: A prospective cross-sectional study. *Int. J. Lab. Hematol.* 2021;43(6):1334-1340.
11. Lüke F., Orsó E., Kirsten J., Poeck H., Grube M., Wolff D., Burkhardt R., Lunz D., Lubnow M., Schmidt B., Hitzenbichler F., Hanses F., Salzberger B., Evert M., Herr W., Brochhausen C., Pukrop T., Reichle A., Heudobler D. Coronavirus disease 2019 induces multi-lineage, morphologic changes in peripheral blood cells. *E. J. Haem.* 2020;1(1):376-383.
12. Kubánková M., Hohberger B., Hoffmanns J., Fürst J., Herrmann M., Guck J., Kräter M. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys. J.* 2021;120(14):2838-2847.
13. Pawley J., Schatten H. *Biological Low-voltage Scanning Electron Microscopy*, Eds., New York: Springer-Verlag, 2008.

14. Shcherbak S.G., Anisenkova A.Y., Mosenko S.V., Glotov O.S., Chernov A.N., Apalko S.V., Urazov S.P., Garbuzov E.Y., Khobotnikov D.N., Klitsenko O.A., Minina E.M., Asaulenko Z.P. Basic Predictive Risk Factors for Cytokine Storms in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* 2021;12:745515.
15. Fedorov A., Kondratov K., Kishenko V., Mikhailovskii V., Kudryavtsev I., Belyakova M., Sidorkevich S., Vavilova T., Kostareva A., Sirotkina O., Golovkin A. Application of high-sensitivity flow cytometry in combination with low-voltage scanning electron microscopy for characterization of nanosized objects during platelet concentrate storage. *Platelets.* 2020;31(2):226-235.
16. Волкова О.В., Шахламов В.А., Миронов А.А. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. М. Медицина, 1987.
17. Zhang D., Guo R., Lei L., Liu H., Wang Y., Wang Y., Qian H., Dai T., Zhang T., Lai Y., Wang J., Liu Z., Chen T., He A., O'Dwyer M., Hu J. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2021;109(1):13-22.
18. Crouser ED, Parrillo JE, Martin GS, Huang DT, Hausfater P, Grigorov I, Careaga D, Osborn T, Hasan M, Tejedor L. Monocyte distribution width enhances early sepsis detection in the emergency department beyond SIRS and qSOFA. *J. Intensive. Care.* 2020;8:33.

### Подписи к рисункам

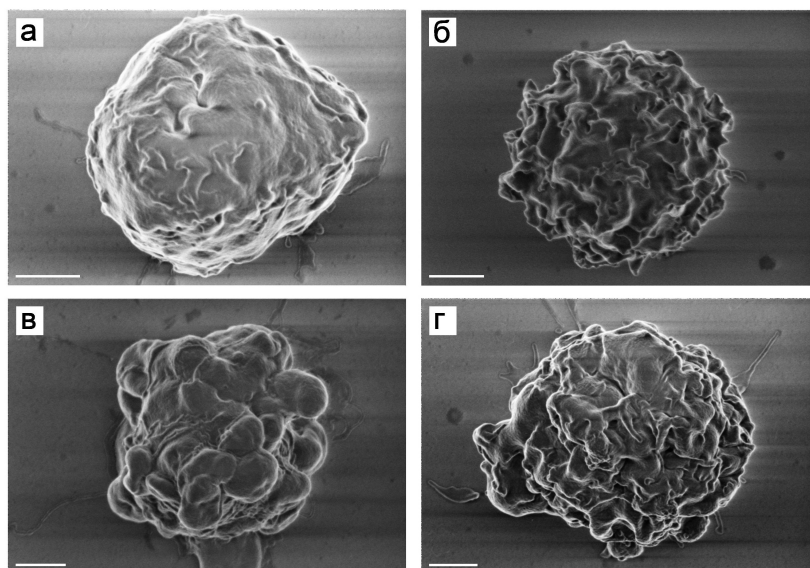


Рис 1. Фотографии лимфоцитов контрольных доноров, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Белый отрезок равен 1 мкм. Панели а, б, в и г демонстрируют разнообразие морфологии лимфоцитов у контрольных доноров. Панель а лимфоцит с относительно гладкой поверхностью. Панель б лимфоцит с поверхностью богатой рафлами. Панель в лимфоцит с поверхностью богатой пузырьками. Панель г лимфоцит несферической формы, имеющий отросток.

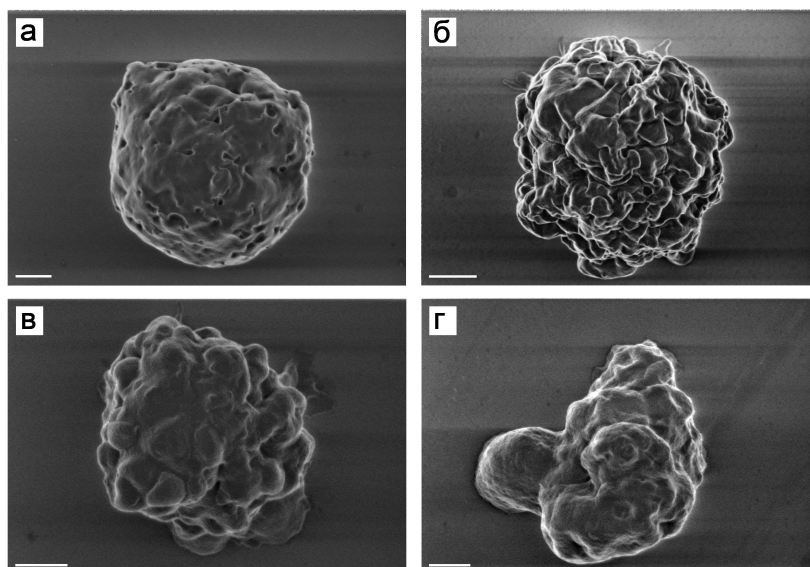


Рис 2. Фотографии лимфоцитов пациентов с цитокиновым штормом, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Белый отрезок равен 1 мкм. Панели а, б, в и г демонстрируют разнообразие морфологии лимфоцитов у контрольных доноров. Панель а лимфоцит с относительно гладкой поверхностью. Панель б лимфоцит с поверхностью богатой рафлами. Панель в лимфоцит с поверхностью богатой пузырьками. Панель г лимфоцит несферической формы, имеющий отростки.



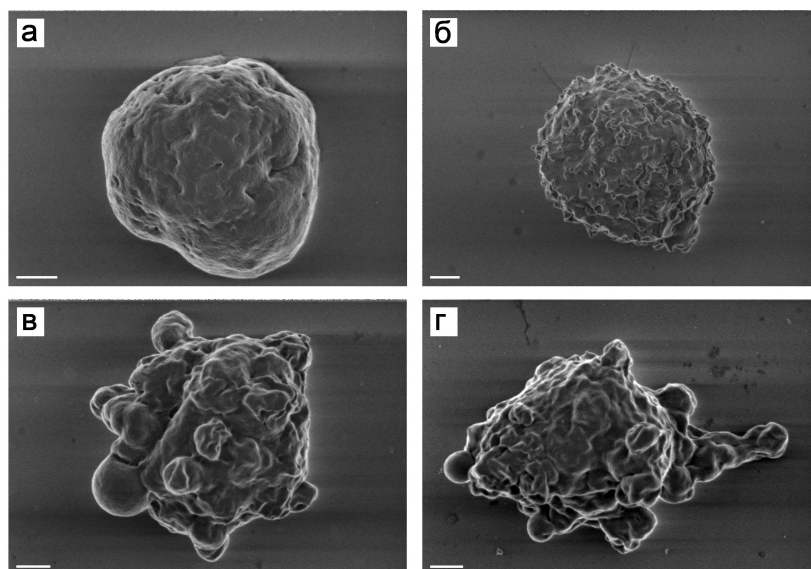


Рис 3. Фотографии моноцитов контрольных доноров, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Белый отрезок равен 1 мкм. Панели а, б, в и г демонстрируют разнообразие морфологии лимфоцитов у контрольных доноров. Панель а моноцит с относительно гладкой поверхностью. Панель б моноцит с поверхностью богатой рафлами. Панель в моноцит с поверхностью богатой пузырями. Панель г моноцит несферической формы, имеющий отростки.

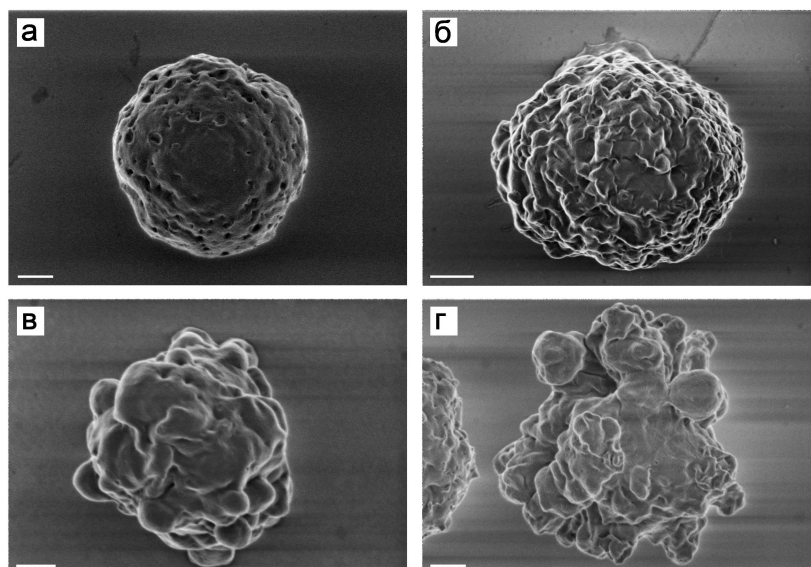


Рис 4. Фотографии моноцитов пациентов с цитокиновым штормом, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Белый отрезок равен 1 мкм. Панели а, б, в и г демонстрируют разнообразие морфологии лимфоцитов у контрольных доноров. Панель а моноцит с относительно гладкой поверхностью. Панель б моноцит с поверхностью богатой рафлами. Панель в моноцит с поверхностью богатой пузырями. Панель г моноцит несферической формы, имеющий отростки.

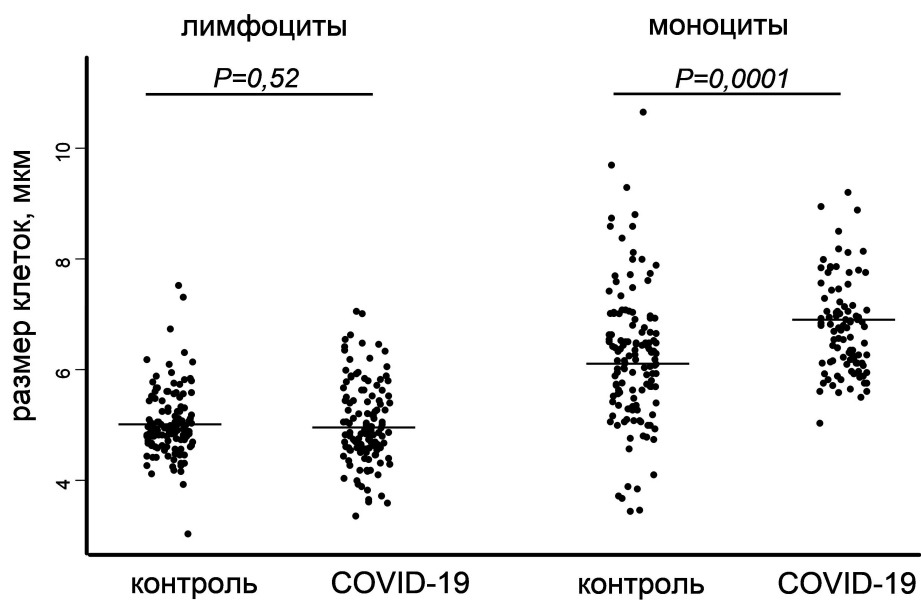


Рис 5. Сравнение размеров моноцитов и лимфоцитов у контрольных доноров и у пациентов с цитокиновым штормом, вызванным COVID-19. Чёрные точки указывают результат измерения диаметра Феррета конкретной клетки. Горизонтальной чертой — медиана выборки.

**THE INVESTIGATION OF HUMAN MONOCYTES AND LYMPHOCYTES  
MORPHOLOGY IN COVID-19 BY LOW-VOLTAGE SCANNING ELECTRON  
MICROSCOPY**

**A. A. Velmiskina<sup>1,2</sup>, Yu. V. Nikitin<sup>3</sup>, V. Y. Mikhailovskii<sup>2</sup>, S. V. Mosenko<sup>1,2</sup>, A. U.  
Anisenkova<sup>1,2</sup>, S. V. Apalko<sup>1</sup>, N. N. Sushentseva<sup>1</sup>, S. G. Scherbak<sup>1,2</sup>, A. M. Ivanov<sup>3</sup>, N. K.  
Galaktionov<sup>1</sup>, O. V. Shneider<sup>1</sup>, K. A. Kondratov<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>*City Hospital No. 40, St. Petersburg, 197706, Russia*

<sup>2</sup>*Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia*

<sup>3</sup>*Military Medical Academy N.a. S.M. Kirov, St. Petersburg, 194044,  
Russia*

*Keywords: monocytes, lymphocytes, cytokine storm, low-voltage scanning electron microscopy, COVID-19*

The severe course of COVID-19 is mainly due to the hyperactivation of the immune system that named a cytokine storm. The main participants in this process are cells of the immune system. (lymphocytes, monocytes, etc.). The morphology of these cells is not well understood. The aim of the work was to study the morphology of lymphocytes and monocytes during cytokine storm using low voltage scanning electron microscopy. Monocytes and lymphocytes were isolated from the blood of control donors (n=6) and patients (n=5) with cytokine storm caused by COVID-19 (interleukin-6 > 23ng/μl, positive smear for COVID-19) using fluorescent sorting. Their morphology was studied using low-voltage scanning electron microscopy. For each patient, 11-32 individual cells were examined at a magnification of 18-32 thousand times. Cell measurements showed an increase in monocyte size during cytokine storm (P=0.0001).