

ВЛИЯНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА К S БЕЛКУ SARS-CoV-2 НА УРОВЕНЬ АНГИОТЕНЗИНА II У КРЫС

Храмова Т.В.^{1,2}, Сидоров А.Ю.^{1,2}, Бедулева Л.В.^{1,2},
Меньшиков И.В.^{1,2}, Шкляева Н.П.¹

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

² ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Резюме. У некоторых больных, инфицированных SARS-CoV-2, обнаруживаются аутоантитела против ключевых молекул ренин-ангиотензиновой системы (РАС). К таким антителам относятся, например, антитела против ангиотензина II и ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2). Наличие антител к компонентам РАС ассоциировано с эпизодами гипотонии или гипертензии. Целью работы было изучить влияние антител к S белку SARS-CoV-2 и аутоантител к АПФ2 на уровень ангиотензина II в модели индуцированного полиорганного поражения, вызванного у крыс иммунизацией S белком SARS-CoV-2, а также влияние предсуществующего аутоиммунного энцефаломиелиита на вызываемые иммунизацией S белком изменения уровня ангиотензина II. Крыс Wistar иммунизировали S белком SARS-CoV-2 в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). 6 из них были интактными на момент введения S белка (группа S), у 4 предварительно был вызван экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит иммунизацией основным белком миелина морской свинки (группа ЭАЭ + S). Контрольной группе крыс вводили НАФ. В плазме крови исследуемых крыс определяли антитела к S белку, антитела к АПФ2, уровень ангиотензина II методом иммуноферментного анализа. Было обнаружено, что иммунизация S белком приводит к транзиторному снижению уровня ангиотензина II в крови. На 6 неделе после иммунизации в группе S уровень ангиотензина II в крови ниже нормы у 3 из 6 крыс (50%), в группе ЭАЭ + S у 3 из 4 (75%). В группе ЭАЭ + S снижение уровня ангиотензина II достоверно относительно контрольной группы (ANOVA, $p = 0,0423$). Более глубокое снижение уровня ангиотензина II в крови у крыс группы ЭАЭ + S, чем у крыс группы S, ассоциировано с более высоким уровнем антител к S белку: уровень антител к S белку был достоверно выше в группе ЭАЭ + S в течение 1-6 недель после иммунизации S белком, чем у крыс группы S. Иммунизация крыс S белком не вызвала продукцию анти-АПФ2 аутоантител в группе ЭАЭ + S, а в группе S была слабой и не сопровождалась повышением уровня ангиотензина II. Таким образом, у крыс, иммунизированных

Адрес для переписки:

Храмова Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1.
Тел.: 8 (3412) 91-73-73.
Факс: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: khratat@mail.ru

Address for correspondence:

Tatyana V. Khratova
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk
426034 Russian Federation
Phone: +7 (3412) 91-73-73.
Fax: +7 (3412) 91-64-26.
E-mail: khratat@mail.ru

Образец цитирования:

Т.В. Храмова, А.Ю. Сидоров, Л.В. Бедулева,
И.В. Меньшиков, Н.П. Шкляева «Влияние иммунного
ответа к S белку SARS-CoV-2 на уровень ангиотензина
II у крыс» // Российский иммунологический журнал,
2024. Т. 27, № 3. С. 471-476.
doi: 10.46235/1028-7221-16584-TEO

© Храмова Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Khratova, A.Yu. Sidorov, L.V. Beduleva,
I.V. Menshikov, N.P. Shklyayeva "The effect of the immune
response to SARS-CoV-2 S protein on angiotensin II levels
in rats", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 471-476.
doi: 10.46235/1028-7221-16584-TEO

© Khratova T.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16584-TEO

ных S белком выявлено транзиторное снижение уровня ангиотензина II на пике продукции антител к S белку, что может указывать на то, что антитела к S белку могут вносить вклад в снижение уровня ангиотензина II при SARS-CoV-2 инфекции. Кроме того, предшествующее аутоиммунной заболевание приводит к более сильному ответу на S белок, сопровождающемуся более сильным снижением уровня ангиотензина II.

Ключевые слова: COVID-19, S белок SARS-CoV-2, ангиотензин 2, ангиотензинпревращающий фермент 2, аутоантитела, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

THE EFFECT OF THE IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 S PROTEIN ON ANGIOTENSIN II LEVELS IN RATS

Khramova T.V.^{a,b}, Sidorov A.Yu.^{a,b}, Beduleva L.V.^{a,b}, Menshikov I.V.^{a,b}, Shklyaeva N.P.^a

^a Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

^b Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Abstract. Autoantibodies against key molecules of the renin-angiotensin system (RAS) are found in some patients infected with SARS-CoV-2. These autoantibodies include antibodies against angiotensin II and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). The presence of antibodies to the RAS-related molecules is associated with episodes of hypotension or hypertension. The aim of this work was to study the effect of antibodies to SARS-CoV-2 S protein and autoantibodies to ACE2 on angiotensin II levels in a model of induced multiple organ damage caused in rats by immunization with SARS-CoV-2 S protein. The effect of pre-existing autoimmune encephalomyelitis on change in angiotensin II level caused by immunization with S protein is also was studied. Wistar rats were immunized with S protein of SARS-CoV-2 emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). At the time of injection of S protein 6 of the rats were intact (S group), in 4 of the rat experimental autoimmune encephalomyelitis was previously induced by immunization with guinea pig myelin basic protein (EAE + S group). The control group of rats was injected with IFA. Antibodies to S protein, autoantibodies to ACE2, and angiotensin II level were determined in blood plasma by enzyme linked immunosorbent assay. It was found that immunization with S protein leads to a transient decrease in the blood level of angiotensin II. The blood angiotensin II level was lower than normal in 3 out of 6 rats (50%) in group S, and in 3 out of 4 (75%) in the EAE + S group at week 6 after immunization. The decrease in angiotensin II level was significant in the EAE + S group relative to the control group (ANOVA, $p = 0.0423$). A deeper decrease in the angiotensin II level in the blood of EAE + S group than in S group was associated with a higher level of antibodies to S protein: the level of antibodies to S protein was significantly higher in the EAE + S group for 1-6 weeks after immunization with S protein compared to the S group of rats. Immunization of rats with S protein did not cause the production of anti-ACE2 autoantibodies in the EAE + S group, and in the S group it was weak and was not accompanied by an increase in angiotensin II levels. Thus, in rats immunized with S protein, a transient decrease in the level of angiotensin II was detected at the peak of production of antibodies to S protein, which may indicate that antibodies to S protein may contribute to a decrease in angiotensin II level in SARS-CoV-2 infection. In addition, pre-existing autoimmune disease leads to a stronger response to S protein, accompanied by a stronger decrease in angiotensin II level.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 S protein, angiotensin II, angiotensin-converting enzyme 2, autoantibodies, experimental autoimmune encephalomyelitis

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

Введение

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) является одной из систем, атакуемых при COVID-19. У некоторых COVID-19 пациентов обнаружи-

ваются аутоантитела против ключевых молекул РАС – ангиотензина II и ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) [1, 2, 5]. Ангиотензин II – пептид, состоящий из 8 аминокислот, биологические эффекты которого включают вазоконстрикцию, воспаление, фиброз и пролиферацию клеток [8]. АПФ2 – фермент, играющий важную роль в регуляции артериального давления пу-

тем преобразования суживающего провоспалительного октапептида ангиотензина II в сосудорасширяющий противовоспалительный пептид ангиотензин-(1-7) [6]. Экспрессия АПФ2 обнаружена на мембране многих клеток, в том числе на поверхности альвеолярных эпителиальных клеток и сосудистых эндотелиальных клеток.

Аутоантитела против молекул ренин-ангиотензиновой системы вмешиваются в регуляцию кровяного давления и усиливают тяжесть COVID-19 [1, 5]. У больных, имеющих аутоантитела к ангиотензину II, наблюдались эпизоды гипотонии, потребовавшие назначения вазопрессоров, большие суточные колебания артериального давления, снижение оксигенации крови [2]. Показано, что антитела против ангиотензина II образуются как перекрестно реагирующие антитела к Spike (S) белку или RBD домену S белка SARS-CoV-2 [2]. Аутоантитела против АПФ2 также обнаружены у больных COVID-19 [1]. Они образуются в ходе инфекции как антиидиотипические к антителам против S белка SARS-CoV-2 [1]. Аутоантитела против АПФ2 снижают активность АПФ2 [1, 7], что может привести к увеличению содержания ангиотензина II и развитию гипертензии.

Целью работы было изучить влияния антител к S белку SARS-CoV-2 и аутоантител к АПФ2 на уровень ангиотензина II в модели индуцированного полиорганного поражения, вызванного у крыс иммунизацией S белком SARS-CoV-2, а также влияние предсуществующего аутоиммунного энцефаломиелимита на вызываемые иммунизацией S белком изменения уровня ангиотензина II.

Материалы и методы

10 крыс Wistar (питомник «Рапполово», Россия) иммунизировали S белком SARS-CoV-2 (ACROBiosystems, США) в неполном адьюванте Фрейнда (НАФ, InvivoGen, США) внутривенно в дозе 20 мкг на крысу. У 4 из них предварительно был вызван экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) иммунизацией основным белком миелина (ОБМ) морской свинки в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ, InvivoGen, США) в дозе 100 мкг на крысу. ЭАЭ проявлялся параличами одной или нескольких конечностей. На момент введения S белка симптомы энцефаломиелимита уже не обнаруживались. Остальные 6 крыс были интактными в день введения S белка. Контрольной группе крыс (n = 4) вводили НАФ. Ежедневно отбирали кровь из хвостовой вены. В плазме крови определяли антитела к S белку (при разведении в 400 раз) и антитела к АПФ2 ферменту (при разведении в 100 раз) не-

прямым твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА). Уровень ангиотензина II в плазме определяли методом конкурентного ИФА с помощью готового коммерческого набора (Cloud-Clone Corp., США). За норму принимали уровень ангиотензина II у интактных крыс (n = 16), вычисленный как среднее \pm 2SD, он составил 350-625 пк/мл. Статистический анализ результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3, различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В группе интактных крыс, иммунизированных S белком (группа S), и в группе крыс, иммунизированных S белком после перенесенного аутоиммунного энцефаломиелимита (группа ЭАЭ + S), выявлено транзиторное снижение уровня ангиотензина II в крови. Наиболее существенные изменения уровня ангиотензина II наблюдались на 6 неделе после иммунизации S белком (рис. 1). На 6 неделе после иммунизации S белком в группе S уровень ангиотензина II в крови ниже нормы у 3 из 6 крыс (50%), в группе ЭАЭ + S у 3 из 4 (75%) (рис. 1). В группе ЭАЭ + S на 6 неделе после иммунизации S белком уровень ангиотензина II достоверно ниже, чем у контрольных крыс (рис. 1, ANOVA, $p = 0,0423$). Полученные данные о снижении уровня ангиотензина II в крови крыс, иммунизированных S белком, согласуются с данными литературы, где показано, что у больных COVID-19 наблюдается снижение уровня ангиотензина II в плазме крови по сравнению со здоровыми донорами, которое ассоциировано с необходимостью госпитализации и развитием острого респираторного дистресс-синдрома, и в целом со степенью тяжести заболевания [3, 4].

Анализ продукции антител к S белку показал, что у крыс группы ЭАЭ + S, уровень антител к S белку достоверно выше в течение 1-6 недель после иммунизации S белком, чем у крыс группы S (рис. 2А). Briquez et al. показали, что у больных COVID-19 антитела, вырабатываемые к S белку, могут перекрестно реагировать с ангиотензином II. У больных COVID-19 наличие таких антител ассоциировано с тяжелым течением заболевания, в частности с нарушением регуляции артериального давления, и снижением оксигенации крови [2]. Поэтому можно предполагать, что более глубокое снижение уровня ангиотензина II в крови у крыс группы ЭАЭ + S, чем у крыс группы S, связано с более высоким уровнем антител к S белку, часть которых могут перекрестно связываться с ангиотензином II.

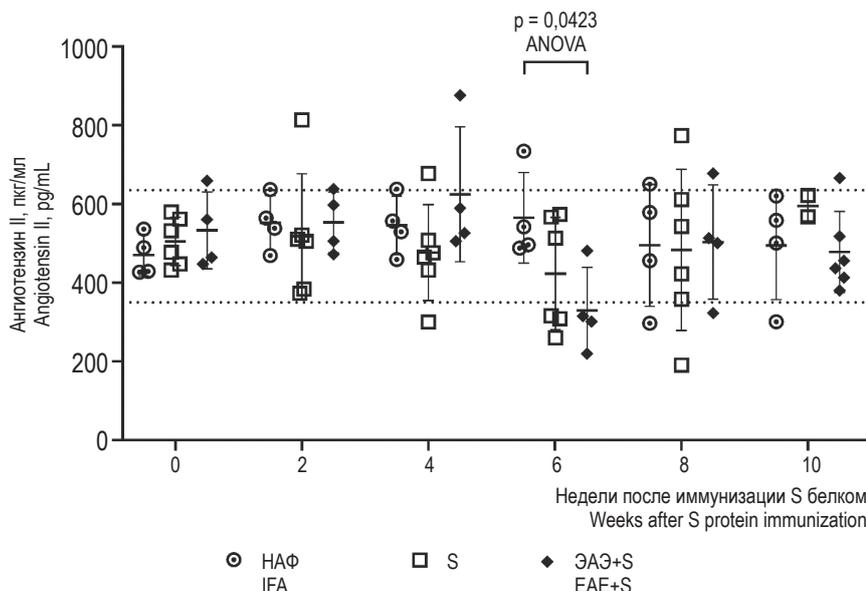


Рисунок 1. Уровень ангиотензина II в плазме крыс, иммунизированных S белком (группа S), крыс, перенесших аутоиммунный энцефаломиелит и иммунизированных S белком (группа ЭАЭ + S), и контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ

Примечание. Пунктирными линиями обозначен диапазон нормы, вычисленный по уровню ангиотензина II у интактных крыс как среднее \pm 2SD.

Figure 1. The angiotensin II level in the plasma of rats immunized with S protein (S group), and rats that previously had an autoimmune encephalomyelitis and immunized with S protein (EAE + S group), and control rats that received an injection of IFA

Note. The dotted lines indicate the normal range calculated from the level of angiotensin II in intact rats as mean \pm 2SD.

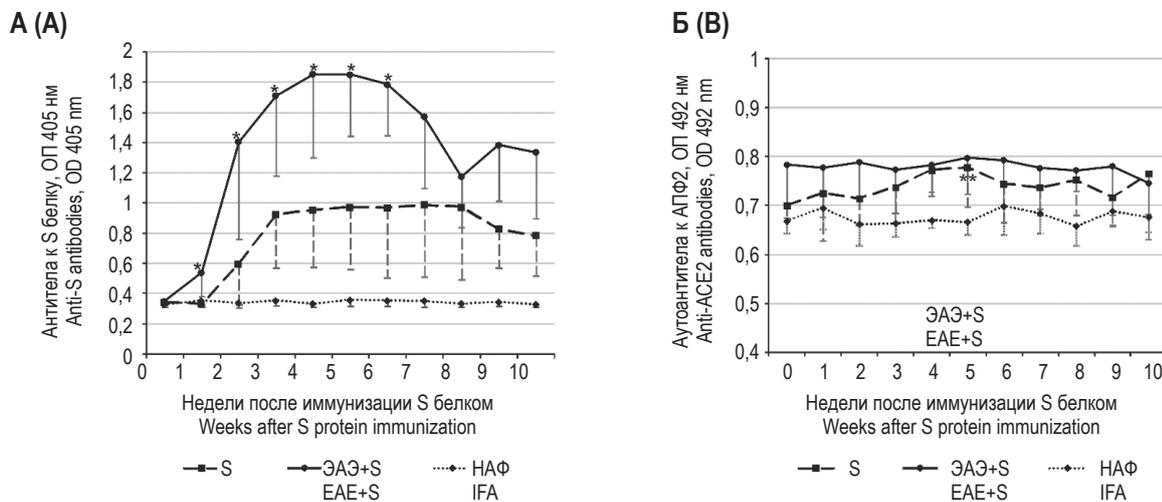


Рисунок 2. А – антитела к S белку в плазме крыс, иммунизированных S белком (группа S), крыс, перенесших аутоиммунный энцефаломиелит и иммунизированных S белком (группа ЭАЭ + S), и контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ. Среднее \pm SD. * – достоверные отличия по отношению к группе S, $p \leq 0,05$, критерий Манна–Уитни. **Б** – аутоантитела к АПФ2 в плазме крыс, иммунизированных S белком (группа S), крыс, перенесших аутоиммунный энцефаломиелит и иммунизированных S белком (группа ЭАЭ + S), и контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ. Среднее \pm SD. ** - достоверные отличия по отношению 0 дню, $p = 0,0308$, ANOVA, критерий Фридмана

Figure 2. A, antibodies to S protein in the plasma of rats immunized with S protein (S group), rats that previously had an autoimmune encephalomyelitis and immunized with S protein (EAE + S group), and control rats that received an injection of IFA. Mean \pm SD. *, statistically significant differences in relation to rats of S group, $p \leq 0.05$, Mann–Whitney test. B, autoantibodies to ACE2 in the plasma of rats immunized with S protein (S group), rats that previously had an autoimmune encephalomyelitis and immunized with S protein (group EAE + S), and control rats that received an injection of IFA. Mean \pm SD. **, statistically significant differences in relation to day 0, $p = 0.0308$, ANOVA, Friedman test

Исследование уровня аутоантител к АПФ2 показало, что иммунизация крыс S белком не вызвала продукцию анти-АПФ2 аутоантител в группе ЭАЭ + S (рис. 2Б, ANOVA, Friedmann test, сравнение относительно 0 дня). В группе S продукция аутоантител к АПФ2 была слабой, достоверное увеличение уровня аутоантител к АПФ2 относительно 0 дня обнаружено только на 5 неделе после иммунизации S белком ($p = 0,0308$, ANOVA, Friedmann test). Значительного увеличения уровня ангиотензина II (рис. 1), которое у больных COVID-19 связывают с аутоантителами к АПФ2 [1, 5], у крыс, иммунизированных S белком, не выявлено.

Заключение

Таким образом, у крыс, иммунизированных S белком, выявлено транзитное снижение уровня ангиотензина II. Снижение уровня ангиотензина II наблюдалось на пике продукции антител к S белку. Данный факт вместе с данными о перекрестной реактивности антител к S белку с ангиотензином II свидетельствуют о том, что антитела к S белку могут вносить вклад в снижение ангиотензина II и связанных с этим физиологических эффектов. Предсуществующее аутоиммунное заболевание приводит к более сильному ответу на S белок, сопровождающемуся более сильным снижением уровня ангиотензина II.

Список литературы / References

1. Arthur J.M., Forrest J.C., Boehme K.W., Kennedy J.L., Owens S., Herzog C., Liu J., Harville T.O. Development of ACE2 autoantibodies after SARS-CoV-2 infection. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, e0257016. doi: 10.1371/journal.pone.0257016.
2. Briquez P.S., Rouhani S.J., Yu J., Pyzer A.R., Trujillo J., Dugan H.L., Stamper C.T., Changrob S., Sperling A.I., Wilson P.C., Gajewski T.F., Hubbell J.A., Swartz M.A. Severe COVID-19 induces autoantibodies against angiotensin II that correlate with blood pressure dysregulation and disease severity. *Sci. Adv.*, 2022, Vol. 8, eabn3777. doi: 10.1126/sciadv.abn3777.
3. Elrayess M.A., Zedan H.T., Alattar R.A., Abusriwil H., Al-Ruweidi M.K.A.A., Almuraikhy S., Parengal J., Alhariri B., Yassine H.M., Hssain A.A., Nair A., Samawi M.A., Abdelmajid A., Suwaidi J.A., Saad M.O., Al-Maslamani M., Omrani A.S., Yalcin H.C. Soluble ACE2 and angiotensin II levels are modulated in hypertensive COVID-19 patients treated with different antihypertension drugs. *Blood Press.*, 2022, Vol. 31, pp. 80-90.
4. Ozkan S., Cakmak F., Konukoglu D., Biberoglu S., Ipekci A., Akdeniz Y.S., Bolayirli I.M., Balkan I.I., Dumanli G.Y., Ikizceli I. Efficacy of serum angiotensin II levels in prognosis of patients with coronavirus disease 2019. *Crit. Care Med.*, 2021, Vol. 49, pp. e613-e623.
5. Rodriguez-Perez A.I., Labandeira C.M., Pedrosa M.A., Valenzuela R., Suarez-Quintanilla J.A., Cortes-Ayaso M., Mayan-Conesa P., Labandeira-Garcia J.L. Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *J. Autoimmun.*, 2021, Vol. 122, 102683. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102683.
6. Simoes e Silva A.C., Silveira K.D., Ferreira A.J., Teixeira M.M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br. J. Pharmacol.*, 2013, Vol. 169, pp. 477-492.
7. Takahashi Y., Haga S., Ishizaka Y., Mimori A. Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis. Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R85. doi: 10.1186/ar3012.
8. Vargas Vargas R.A., Varela Millan J.M., Fajardo Bonilla E. Renin-angiotensin system: Basic and clinical aspects-A general perspective. *Endocrinol. Diabetes Nutr. (Engl. Ed.)*, 2022, Vol. 69, pp. 52-62.

Авторы:

Храмова Т.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Сидоров А.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Authors:

Khramova T.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Sidorov A.Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Бедулева Л.В. — д.б.н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Меньшиков И.В. — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; главный научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Шкляева Н.П. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

Beduleva L.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Leading Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Menshikov I.V., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Chief Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Shklyayeva N.P., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Поступила 26.03.2024
Принята к печати 30.03.2024

Received 26.03.2024
Accepted 30.03.2024