

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *OLR1*, *ACAN* ТА *LRP1* У КЛІТИНАХ СИНОВІАЛЬНОЇ ОБОЛОНКИ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

А.С. ЮЕТ *, С.В. БОРОДІН, К.О. ДВОРЩЕНКО, Д.М. ГРЕБІНИК, О.М. САВЧУК, Л.І. ОСТАПЧЕНКО

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська 64/13, Київ, 01601, Україна

*E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

Коронавірусна хвороба 2019 року (COVID-19) являє собою вагому загрозу здоров'ю людей. На сьогодні, актуальним питанням є прогнозування перебігу хронічних захворювань у людей, які перехворіли коронавірусною інфекцією. Остеоартрит є хронічним дегенеративним захворюванням суглобів. Показано, що це захворювання може бути викликано різними чинниками, а саме: впливом оксидативного стресу; гіперхолестеринемією, підвищеною агреган-деградуючою активністю специфічних протеїназ на фоні порушення певного ендодигітарного шляху; тощо. Тому метою роботи було проаналізувати експресію генів *OLR1*, *ACAN* та *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. У дослідженні брали участь 60 чоловіків у віці від 50 до 55 років. Добровольці були поділені на наступні групи: перша група (n = 20) – умовно здорові люди, друга група (n = 20) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню, третю групу – склали 20 пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню, які перехворіли COVID-19. Концентрацію холестеролу у плазмі крові людей визначали ферментативним методом за допомогою діагностичного набору реагентів. Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикалу в синовіальній рідині вимірювали за накопиченням ХТТ-формагану. Рівень експресії генів *OLR1*, *ACAN* та *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки колінних суглобів встановлювали за допомогою кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі. Було виявлено зростання рівня експресії гена *OLR1* більшою мірою у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, порівняно з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів на тлі інтенсивнішого збільшення як концентрації холестеролу у плазмі крові, так і активування вільнорадикальних процесів (зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу) у синовіальній рідині пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції. Це може бути пов'язано зі збільшенням загальносистемного запалення внаслідок реагування організму на вірус. У той же час було показано більш суттєве зниження рівня експресії гена *ACAN* у клітинах синовіальної оболонки

хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів. Це вказує на більш потужну активацію деструктивних процесів у клітинах після перенесеної інфекції, і також може бути опосередковано зменшенням рівня експресії гена *LRP1*, що, у свою чергу, здатне спричинювати подальше прогресування захворювання. Розуміння чітких механізмів формування більш важкого перебігу остеоартриту та можливого розвитку ускладнень у пацієнтів із пост-COVID-19 синдромом на прикладі функціонування як системи *LOX1/ox-LDL*, так і *LRP1*-ендодигітарного шляху потребує подальших досліджень.

Ключові слова: SARS-CoV-2, експресія генів *ACAN*, *LRP1*, *OLR1*, остеоартрит, холестерол, супероксидний аніон-радикал.

Вступ. Коронавірусна хвороба 2019 року (COVID-19) являє собою вагому загрозу здоров'ю людей всіх країн світу. На сьогодні, важливим питанням є прогнозування перебігу хронічних захворювань у людей, які перехворіли коронавірусною інфекцією. Остеоартрит (ОА) є хронічним дегенеративним захворюванням суглобів, поширеність якого постійно зростає через глобальне старіння (Yamamoto et al, 2014; Baudart et al, 2017; Hashimoto et al, 2020; Yamamoto et al, 2021). Наразі з'ясування причин ОА та розробка фундаментальних стратегій лікування є критично важливими. Відомо, що для SARS-CoV2-інфекції характерний розвиток тяжких ускладнень: одним із таких наслідків може стати загострення стану хворих на ОА, що, у свою чергу, може як посилити перебіг цього захворювання, так і ускладнити проведення його лікування (Lai et al, 2020; Gasmi et al, 2021; Lauwers et al, 2022).

Спочатку припускали, що ОА викликається механічним стресом через ожиріння. Тому вважалося, що причиною ОА, здебільшого, є зношування хондроцитів внаслідок механічної напруги (Yucesoy et al, 2015; Baudart et al, 2017).

Деякі дослідження також підтверджують участь оксидативного стресу та перекисного окислення ліпідів у патогенезі дегенерації суглобового хряща (Nishimura et al, 2004; Dranitsina 2019 et al, 2019; Walters et al, 2021). Повідомлялося, що гіперхолестеринемія, яка спричиняє атеросклероз (АС), пов'язана з ризиком ОА колінного суглоба незалежно від ожиріння (Bierma-Zeinstra et al, 2017).

Фактично ОА та АС мають спільні молекулярні медіатори, які індуються деякими запальними цитокінами. Більш того, було виявлено кореляцію між високим рівнем холестеролу в сироватці крові та ОА в пацієнтів (Oliviero et al, 2012; Hashimoto et al, 2020).

Було запропоновано, що рецептор окислених ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL), який належить до надродини лектинів С-типу – LOX1 (кодується геном *OLRI*) – може бути залучений у патогенез ОА (Hashimoto et al, 2020). Адже було показано, що зв'язування ox-LDL із LOX1 посилювало виробництво внутрішньоклітинних активних форм кисню (ROS), які зумовлювали подальшу дегенерацію хряща (Li et al, 2018; Dranitsina 2019 et al, 2019; Hashimoto et al, 2020; Walters et al, 2021).

Агрекан (кодується геном *ACAN*) є основним компонентом позаклітинного матриксу суглобового хряща, і його деградація є ранньою подією у розвитку ОА (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2021; Jaabar et al, 2022; Krawetz et al, 2022). Основними протеїназами, відповідальними за деградацію агрекану, є матриксні металопроїтази (ММР) та агреканази (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2021), які є членами родини дезінтегринів та металопроїтаз із тромбоспондиновими мотивами (ADAMTS). Було показано, що агрекан-деградуєча активність таких протеїназ пригнічувалась за допомогою білка 1, подібного до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (або рецептор для $\alpha 2$ -мікроглобуліну, або рецептор аполіпопротеїну Е (LRP-1), кодується геном *LRPI*), який зумовлював їх швидкий ендцитоз та подальшу деградацію. Однак при ОА регуляція цього ендцитарного шляху порушувалась внаслідок зниження рівня LRP1, що, у свою чергу, призводило до прогресування захворювання (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2022).

З огляду на вищезазначене метою роботи було проаналізувати експресію генів *OLRI*, *ACAN* та *LRPI* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Матеріали і методи. У дослідженні брали участь 60 людей (чоловіки) у віці від 50 до 55 років. Відбір добровольців та встановлення діагнозу у пацієнтів «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеню» проводився на базі спеціалізованого медичного центру «Ортоклініка», Тернопіль, Україна. На етапі відбору усім хворим проводилася рентгенографія колінних суглобів у прямій (передньозадній) та боковій проєкціях. Оцінка інтенсивності болю та функціонального стану колінних суглобів хворих проводилася за допомогою розрахунку індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index). Індекс WOMAC підраховується в результаті самостійного проходження пацієнтом тесту (McConnell et al, 2001), що включає 24 запитання, які відображають вираженість больових відчуттів (5 питань), скутості (2 питання) та функціональної активності (17 питань). Добровольці були поділені на наступні групи: перша група (n = 20) – умовно здорові люди; друга група (n = 20) – пацієнти з ОА колінних суглобів II–III ступеню; третя група (n = 20) – пацієнти з ОА колінних суглобів II–III ступеню, які перехворіли COVID-19 легкої та середньої тяжкості 6–9 міс тому. Діагноз COVID-19 було підтверджено молекулярним аналізом (ЗТ-ПЛР) мазка з носоглотки. Забір біологічного матеріалу (цільна кров, плазма крові, синовіальна рідина) проводився на базі спеціалізованого медичного центру «Ортоклініка», Тернопіль, Україна.

Визначення концентрації холестеролу в плазмі крові донорів усіх дослідних груп. Концентрацію холестеролу визначали ферментативним методом. Було використано ензиматичний діагностичний набір реагентів («Філісіт-Діагностика», Дніпро), що містив естеразу та оксидазу холестеролу.

Визначення інтенсивності продукування супероксидного аніон-радикалу в синовіальній рідині донорів дослідних груп. Синовіальну рідину збирали у стерильні пробірки з гепарином шляхом артроцентезу колінного суглобу відповідно до стандартних протоколів обробки. Враховуючи, що найбільші порожнини колінного

та кульшового суглобів мають максимальний об'єм синовіальної рідини до 3,5 мл, забір біологічного матеріалу в умовно здорових людей є небезпечним та може призвести до порушення структурно-функціонального стану суглобу. У зв'язку з цим при аналізі інтенсивності продукування супероксидного аніон-радикалу перша група (умовно здорові люди) відсутня.

Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикалу в гомогенатах визначали за накопиченням ХТТ-формазану (Sutherland et al, 1997). Принцип методу полягає в здатності супероксидних аніонів взаємодіяти з 2,3-біс(2-метокси-4-нітро-5-сульфобеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксіанілідом (ХТТ) з утворенням розчинного забарвленого комплексу ХТТ-формазану, який має пік поглинання при 470 нм. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі (Lowry et al, 1951).

Кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі. РНК тримували із цільної крові за методом Chomczynski (Chomczynski et al, 1987). Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва), використовуючи по 0,3 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50 °С – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С – 15 с; гібридизація праймерів 50 °С – 35 с; добування ланцюга 72 °С – 30 с; елонгація ампліфікатів 72 °С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *ACAN*: прямий ССТТСТ-ГСТТССГАГГСАТТ та зворотний – GCCA-CACCAGGAACCACTT, нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 2393 – 2412 та 2510 – 2492 кДНК *ACAN* людини (GenBank номер NM_001135.4); *LRP1*: прямий – TGGCACAGACCGGAAGATTG та зворотний – CGTTCCAAGCGGTAGACACT, нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 2669 – 2688 та 2791 – 2772 кДНК *LRP1* людини (GenBank номер NM_002332.3); *OLRI*: прямий – GTGA-СТГСТТАСТТСТСАТТ та зворотний – GG-CACCACCATGGAGAGTAA, нуклеотидні послі-

довності цих праймерів відповідають послідовностям 16–37 та 164–145 кДНК *OLRI* людини (GenBank номер NM_001172632.2); для *ACTB* (ген β-актину, що використовується в якості ендogenous контролю реакції завдяки конститутивній експресії): прямий – СТТССА-ГСТССТСССТГГАГ та зворотний – ССА-CAGGACTCCATGCCAG, нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 776–795 та 902–883 кДНК *ACTB* людини (GenBank номер NM_001101.5). Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх пацієнтів, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Відносну кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta C_T$ Method» (Livak et al, 2001), адже ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$, $\text{slope} < 0,1$). Відносний рівень експресії зазначених генів нормалізували до рівня експресії *ACTB*.

Статистична обробка результатів досліджень. Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка з використанням програмного пакету «Graph Pad Prism 8.4.3» («GraphPad Software Inc.», США). Подальший обрахунок відбувався за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тукея. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення – SD. Кореляційний аналіз проводили за допомогою коефіцієнту лінійної кореляції Пірсона (r). Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати. *Концентрація холестеролу.* У результаті проведених нами експериментальних досліджень було показано, що в плазмі крові пацієнтів, хворих на ОА колінних суглобів, концентрація холестеролу була вищою в 1,3 раза порівняно з групою умовно здорових людей (табл. 1). При дослідженні цього показника у плазмі крові пацієнтів з ОА колінних суглобів, які перехворіли COVID-19, концентрація холестеролу збільшувалась у 1,7 раза від-

Таблиця 1. Концентрація холестеролу в плазмі крові дослідних груп (M ± SD, n = 60)

Групи людей (чоловіки)	ммоль/л
Умовно здорові (n = 20)	4,7 ± 0,45
Остеоартрит (n = 20)	6,2 ± 0,56 ****
Остеоартрит + COVID-19 (n = 20)	8,1 ± 0,88 ****/####

Примітки. **** – p ≤ 0,0001 відносно умовно здорових людей; #### – p ≤ 0,0001 відносно групи людей з остеоартритом.

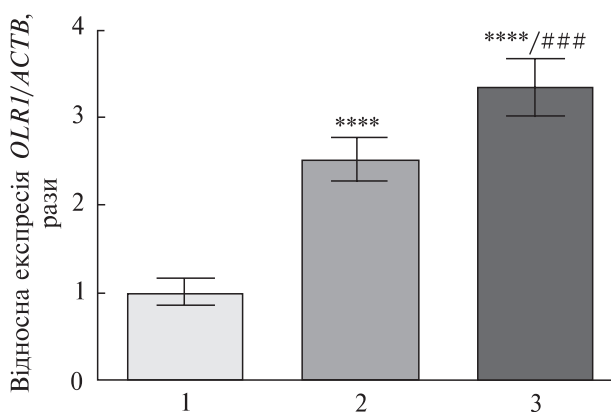


Рис. 1. Рівень експресії гена *OLR1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові люди; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; ****p ≤ 0,0001 відносно умовно здорових людей; ### – p ≤ 0,001 відносно групи людей з остеоартритом

Таблиця 2. Накопичення супероксидного радикалу в синовіальній рідині дослідних груп (M ± SD, n = 40)

Групи людей (чоловіки)	мкмоль ХГТ-формазау × мг білка ⁻¹
Остеоартрит (n = 20)	0,37 ± 0,04
Остеоартрит + COVID-19 (n = 20)	0,59 ± 0,05###

Примітки. ### – p ≤ 0,001 відносно групи людей з остеоартритом.

носно групи умовно здорових людей та в 1,3 раза порівняно з групою хворих на ОА (табл. 1).

Рівень експресії гена *OLR1*. У результаті подальших експериментів було виявлено, що рівень експресії гена *OLR1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на ОА був вищим у 2,5 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей (рис. 1). У той же час, у пацієнтів з ОА колінних суглобів, які перехворіли COVID-19, цей показник зростає у 3,3 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей та в 1,3 раза (p ≤ 0,001) порівняно з групою хворих на ОА (рис. 1).

Інтенсивність накопичення супероксидного аніон-радикалу. Нами було показано, що у синовіальній рідині пацієнтів з ОА колінних суглобів, які перехворіли COVID-19, вміст супероксидного аніону збільшувався в 1,6 раза відносно групи пацієнтів, хворих на ОА колінних суглобів (табл. 2).

Нами було встановлено наявність сильної позитивної кореляції між концентрацією холестеролу та вмістом супероксидного аніону як в групі пацієнтів, хворих на ОА колінних суглобів (r = 0,68, p ≤ 0,05), так і в пацієнтів з ОА колінних суглобів після COVID-19 (r = 0,78, p ≤ 0,05).

Рівень експресії генів *ACAN* та *LRP1*. У результаті проведених нами експериментальних досліджень було встановлено, що рівень експресії гена *ACAN* у клітинах синовіальної оболонки хворих на ОА був нижчим майже в 2,5 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей. У пацієнтів з ОА колінних суглобів, які перехворіли COVID-19, цей показник знижувався у 3,3 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей та в 1,3 раза (p ≤ 0,05) порівняно з групою хворих на ОА (рис. 2).

У результаті подальших досліджень було виявлено, що рівень експресії гена *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки пацієнтів з ОА був нижчим у 2,4 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей. У пацієнтів з ОА колінних суглобів після COVID-19, цей показник знижувався у 3,4 раза (p ≤ 0,0001) порівняно з групою умовно здорових людей та в 1,4 раза (p ≤ 0,05) порівняно з групою хворих на ОА (рис. 3).

Обговорення. Епідеміологічні дослідження показали, що гіперхолестеринемія, яка є ре-

презентативним захворюванням дисліпідемії, є фактором ризику ОА суглобів колін і рук (Baudart et al, 2017; Afifi et al, 2018; Hashimoto et al, 2020). Зокрема було підтверджено, що рівень холестеролу в плазмі крові є незалежним системним фактором ризику ОА. Крім того, було продемонстровано, що пацієнти з ОА мали високі концентрації як аполіпопротеїну (АРО) А-І, так і загального холестеролу порівняно з контрольною групою (Oliviero et al, 2012; Hashimoto et al, 2020).

Подальші дослідження на мишах із нокаутом ApoE (ліганд для рецептора ліпопротеїнів низької щільності – LDL) показали вплив гіперхолестеринемії на прогресування ОА (Fagnaghi et al, 2017). У той же час, було виявлено зростання синовіальної продукції прозапальних цитокінів у мишей із високим рівнем LDL (De Munter et al, 2016). Раніше повідомлялося про зв'язок між прогресуванням ОА та АС. Так, хронічне запалення та старіння є одними із загальних ключових факторів між АС та ОА (Rezuş et al, 2019).

На додаток, у роботах було проаналізовано вплив статинів на прогресування ОА колінного або кульшового суглоба, проте результати виявилися суперечливими (Veronese et al, 2019; Cook et al, 2020). Таким чином, незважаючи на наявність зв'язку між холестеролом та ОА, ефективність лікування статинами при ОА потребує подальших досліджень.

За більш ніж 10 років досліджень *in vitro* та *in vivo* було продемонстровано можливу участь LOX-1/ox-LDL у патогенезі дегенерації хряща тварин та людини (Hashimoto et al, 2020). Перш за все, було встановлено підвищення рівня експресії генів *OLRI* при впливі прозапальних цитокінів та ox-LDL, який дозозалежно знижував життєздатність хондроцитів, індукуючи неапоптозну загибель клітин. Подібні результати було отримано і в клітинах синовію пацієнтів, хворих на ОА (Hashimoto et al, 2020).

Окрім цього, було показано, що зв'язування ox-LDL із LOX-1 збільшувало виробництво ROS, призводячи до розвитку окисного стресу, деградації хряща, запалення синовіальної оболонки та загибелі клітин (Li et al, 2018; Dranitsina et al, 2019; Hashimoto et al, 2020; Walters et al, 2021).

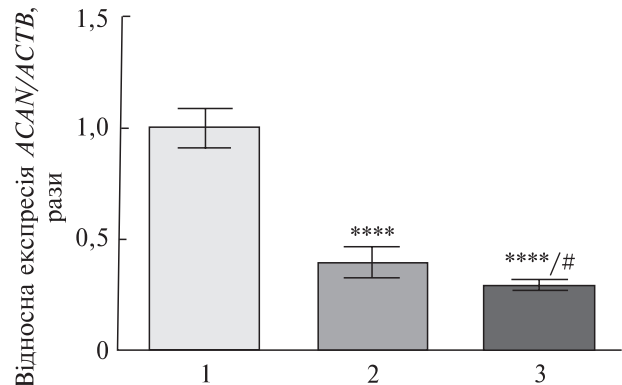


Рис. 2. Рівень експресії генів *ACAN* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові люди; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

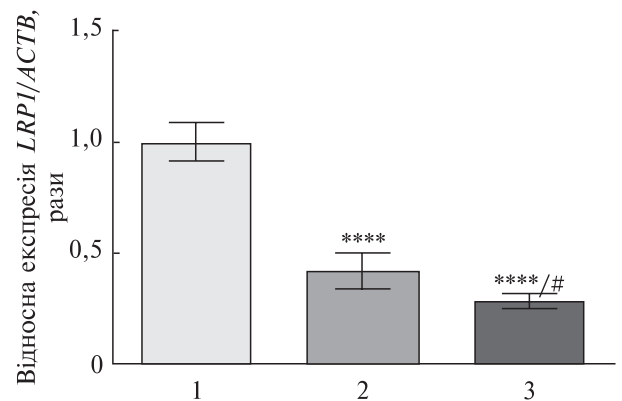


Рис. 3. Рівень експресії генів *LRPI* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові люди; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Крім того, було запропоновано, що зв'язування ox-LDL з LOX-1 може посилювати експресію як фактору росту судинного ендотелію (VEGF) через індукцію гамма-рецептора, що активується проліфератором пероксисом, PPAR- γ (Kanata et al, 2006); так і моноцитарного хемотаксичного протеїну 1 (MCP-1), зумовлюючи прогресування дегенерації суглобового хряща (Hashimoto et al, 2020). Також було висловлено припущення, що система LOX-1/ox-LDL бере участь у передчасному

старінні хондроцитів шляхом пригнічення активності теломерази (Zushi et al, 2009).

На сьогодні, розглядається можливість використання LOX-1 в якості інформативного маркера ОА та його потенційної терапевтичної мішені (Farnaghi et al, 2017; Afifi et al, 2018; Hashimoto et al, 2020). Однак зв'язок між прогнозом ОА та індексом LOX-1 потребує додаткових досліджень у майбутньому, адже прямі механізми, що зв'язують механічний стрес та експресію системи LOX-1/ox-LDL, ще достеменно не визначені (Hashimoto et al, 2020).

Нами було встановлено збільшення рівня експресії гена *OLRI* більшою мірою у клітинах синовіальної оболонки хворих на ОА, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на ОА колінних суглобів на фоні потужнішого зростання як концентрації холестеролу в плазмі крові, так і продукування супероксидного аніон-радикалу в синовіальній рідині у пацієнтів з ОА після SARS-CoV2-інфекції. Це може бути пов'язано зі збільшенням загальносистемного запалення внаслідок реагування організму на вірус (Lauwers et al, 2022). Загалом, отримані нами дані збігаються з вищезазначеними численними даними літератури, де продемонстровано залучення системи LOX-1/ox-LDL у патогенез ОА (Farnaghi et al, 2017; Afifi et al, 2018; Hashimoto et al, 2020).

На наступному етапі дослідження нами було показано, більш суттєве зниження рівня експресії гена *ACAN* у клітинах синовіальної оболонки хворих на ОА, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на ОА колінних суглобів. Це вказує на більш потужну активацію деструктивних процесів у клітинах синовію, незважаючи на здатність популяцій мезенхімальних клітин-попередників (MPC) синовіальної оболонки здорових суглобів секретувати агрекан та накопичувати його в синовіальних MPC суглобів з ОА (Krawetz et al, 2022).

Як уже було зазначено, зростання рівня ROS може індукувати катаболічну сигналізацію, викликати окисний стрес, збільшити експресію генів, залучених у розвиток запалення, та таких, що кодують MMP, які, у свою чергу, впливають на матричні компоненти, включаючи агрекан (Yamamoto et al, 2014; Dranitsina et al, 2019; Yamamoto et al, 2022).

Серед ADAMTS, які мають агреканолітичну активність, ADAMTS-4 і ADAMTS-5 вважаються основними агреканазами, що беруть участь в обміні хрящового матриксу. ADAMTS-5 приблизно в 30 разів активніший, ніж ADAMTS-4 щодо агрекану, але було показано, що він швидко ендочитується хондроцитами за допомогою білка 1, подібного до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (LRP-1). Це свідчить про те, що посттрансляційна регуляція є основним механізмом регулювання позаклітинних рівнів ADAMTS-5 (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2021).

Але при ОА регуляція такого ендочитарного шляху порушується через зниження рівня LRP1, в основному, спричиненого протеолітичним шедінгом його ектодомену від клітинної мембрани за рахунок дії двох мембраноз'язаних металопротеїназ (шедаз): MMP-14 і ADAM17 (Yamamoto et al, 2017; Yamamoto et al, 2021).

Нещодавно було показано, що руйнування внутрішньоджгутикового транспортного білку 88, одного з головних білків в'їчастого транспорту, збільшує інтенсивність шедінгу LRP1 та зменшує активність позбавлення від ADAMTS-5 та MMP-13 шляхом ендочитозу. Оскільки розщеплення мембранного білку в районі ектодомену відбувається, головним чином, на поверхні клітини, в'їчаста машинерія може бути залученою до регуляції локалізації LRP1 та ферментів шедаз на клітинній поверхні (Coveney et al, 2018; Yamamoto et al, 2021).

Нами було виявлено більш значне зменшення рівня експресії гена *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на ОА, які перехворіли COVID-19. Це узгоджується з даними літератури стосовно потенційного впливу COVID-19 на старіння суглобів та ОА (Lauwers et al, 2022) і свідчить про подальшу деградацію агрекану агреканазами, що призводить до повільно прогресуючого ОА (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2022).

Було запропоновано, що зв'язування вільного розчинного LRP1 (sLRP1) із металопротеїназами може змінити їх активність щодо субстратів позаклітинного матриксу, так само як і вплинути на тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMPs) (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2021; Yamamoto et al, 2022).

Зокрема, було виявлено, що вільний LRP1 конкурував із LRP1 клітинної поверхні за зв'язування з TIMP-3 (Scilabra et al, 2016). Такі зміни можуть змістити гомеостатичний баланс обміну матриксу в бік катаболізму (Yamamoto et al, 2014; Yamamoto et al, 2021; Yamamoto et al, 2022). Отже, навіть невеликий зсув протеклітичної рівноваги може бути достатнім для початку повільного прогресування цієї хронічної хвороби.

Таким чином, інгібування опосередкованого LRP1 ендцитозу призводить до загибелі клітин, зміни всього секретому та транскрипційних модуляцій у хондроцитах людини при ОА. На сьогодні, вивчаються різноманітні ліганди цього ендцитозного шляху задля виявлення потенційних нових терапевтичних мішеней для ОА (Yamamoto et al, 2022).

Висновки. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було виявлено зростання рівня експресії гена *OLRI* більшою мірою у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, порівняно з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів на тлі інтенсивнішого збільшення як концентрації холестеролу у плазмі крові, так і активування вільнорадикальних процесів (зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу) у синовіальній рідині пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції. Це може бути пов'язано зі збільшенням загальносистемного запалення внаслідок реагування організму на вірус. У той же час було показано більш суттєве зниження рівня експресії гена *ACAN* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів. Це вказує на більш потужну активацію деструктивних процесів у клітинах після перенесеної інфекції, і також може бути опосередковано зменшенням рівня експресії гена *LRP1*, що, у свою чергу, здатне спричинювати подальше прогресування захворювання. Розуміння чітких механізмів формування більш важкого перебігу остеоартриту та можливого розвитку ускладнень у пацієнтів із пост-COVID-19 синдромом на прикладі функціонування як системи LOX1/ox-LDL, так і LRP1-ендцитозного шляху потребує подальших досліджень.

Дотримання етичних стандартів. Усі учасники, які добровільно та на безоплатній основі погодилися взяти участь у цьому дослідженні, ознайомилися та підписали відповідну форму інформованої згоди. Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964–2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.; і були схвалені комісіями з біоетики «Медичного центру Ортоклініка» (протокол № 1 від 17 січня 2022; Тернопіль, Україна) та Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 3 жовтня 2022; Київ, Україна). Було вжито всіх необхідних заходів для забезпечення анонімності пацієнтів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

OLRI, ACAN AND LRP1 GENES EXPRESSION IN SYNOVIUM OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS AFTER SARS-COV2 INFECTION

*A. Huet, S. Borodin, K. Dvorshchenko,
D. Grebinyk, O. Savchuk, L. Ostapchenko*

Educational and Scientific Center
«Institute of Biology and Medicine»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv
st. Vladimirskaya 64/13, 01601, Kyiv, Ukraine

The coronavirus disease of the year 2019 (COVID-19) poses a serious threat to human health. Nowadays the relevant topic appears to be the prognosis of human chronic illnesses progress and development after the coronavirus infection beating. Osteoarthritis is a chronic degenerative joint disease. It was shown that this malady may be induced by various factors, such as oxidative stress impact, hypercholesterolemia, increased aggregandegradative activity of specific proteases during certain endocytosis pathway disruption, and so on. Hence the aim of this work was to analyze the expression of *OLRI*, *ACAN* and *LRP1* genes in synovial membrane cells of osteoarthritis patients having beaten SARS-CoV-2

infection. The research included 60 humans (males) aged 50–55 years. The volunteers were separated into following groups: the first group (n = 20) – conditionally healthy individuals, the second group (n = 20) – patients with II–III degree knee joint osteoarthritis, the third group consisted of 20 patients with II–III degree knee joint osteoarthritis having successfully beaten COVID-19. The human blood plasma cholesterol concentration was measured by the enzymatic method using a diagnostic set of reagents. The intensity of superoxide anion radical generation in synovial liquid was estimated by the HTT-formazan accumulation. The level of *OLRI*, *ACAN* and *LRPI* gene expression in knee joint synovial membrane cells was assessed by RT-qPCR. The *OLRI* gene expression increase was demonstrated mostly in osteoarthritis patient synovial membrane cells having beaten COVID-19, if compared to the group with knee joint osteoarthritis, against the background of more intensive increase of both blood plasma cholesterol concentration and free radical process activation (the superoxide anion radical amount increase) in synovial liquid of osteoarthritis patients after SARS-CoV2-infection. This may be due to the increase in system-wide inflammation while a body responds to the virus. At the same time the more prominent decrease of the *ACAN* gene expression was shown in synovial membrane cells of patients with osteoarthritis having beaten COVID-19, in comparison with the group of patients with knee joint osteoarthritis. Such findings indicate more pronounced activation of destructive processes within cells after carried out infection, and can be mediated by the decrease of the *LRPI* gene expression, which, in its own turn, is capable of propagating the illness further progress. The understanding of a more severe osteoarthritis progress and possible complication development in patients with the post-COVID-19 syndrome, taking both LOX1/ox-LDL and LRP1-endocytosis pathway into consideration requires additional research attempts.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Affi AEA, Shaat RM, Gharbia OM et al (2018) Osteoarthritis of knee joint in metabolic syndrome. *Clin Rheumatol* 37:2855–2861. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4201-4>.
- Baudart P, Louati K, Marcelli C et al (2017) Association between osteoarthritis and dyslipidaemia: a systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open* 3(2):1–12. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2017-000442>.
- Bierma-Zeinstra SMA, Waarsing JH (2017) The role of atherosclerosis in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31:613–633. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.08.006>.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- Cook MJ, Sorial AK, Lunt M et al (2020) Effect of timing and duration of statin exposure on risk of hip or knee revision arthroplasty: a population-based cohort study. *J Rheumatol* 47:441–448. <https://doi.org/10.3899/jrheum.180574>.
- Coveney CR, Collins I, Mc Fie M et al (2018) Cilia protein IFT88 regulates extracellular protease activity by optimizing LRP-1-mediated endocytosis. *FASEB J* 32:6771–6782. <https://doi.org/10.1096/fj.201800334>.
- Farnaghi S, Prasadam I, Cai G et al (2017) Protective effects of mitochondria-targeted antioxidants and statins on cholesterol-induced osteoarthritis. *FASEB J* 31:356–367. <https://doi.org/10.1096/fj.201600600R>.
- Gasmi A, Tippairote T, Mujawdiya PK et al (2021) Neurological Involvements of SARS-CoV2 Infection. *Mol Neurobiol* 58(3):944–949. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02070-6>.
- Hashimoto K, Akagi JM (2020) The role of oxidation of low-density lipids in pathogenesis of osteoarthritis: A narrative review. *Int Med Res* 48(6):0300060520931609. <https://doi.org/10.1177/0300060520931609>.
- Huet A, Dvorshchenko K, Korotkyi O et al (2019) Expression of Nos2 and Acan Genes in Rat Knee Articular Cartilage in Osteoarthritis. *Cytol Genet* 53(6):481–488. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060021>.
- Jaabar IL, Cornette P, Miche A et al (2022) Deciphering pathological remodelling of the human cartilage extracellular matrix in osteoarthritis at the supramolecular level. *Nanoscale* 24. <https://doi.org/10.1039/D2NR00474G>.
- Kanata S, Akagi M, Nishimura S et al (2006) Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 348:1003–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.133>.
- Krawetz RJ, Wu YE, Bertram KL et al (2022) Synovial mesenchymal progenitor derived aggrecan regulates cartilage homeostasis and endogenous repair capacity. *Cell Death & Disease* 13:470. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04919-1>.
- Lai Q, Spoletini G, Bianco G et al (2020) SARS-CoV2 and immunosuppression: A double-edged sword. *Transpl Infect Dis* 22(6):e13404. <https://doi.org/10.1111/tid.13404>.
- Lauwers M, Au M, Yuan S et al (2022) COVID-19 in Joint Ageing and Osteoarthritis: Current Status and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 23(3):720. <https://doi.org/10.3390/ijms23020720>.

- Li X, Wang X, Hu Z et al (2017) Possible involvement of the oxLDL/LOX-1 system in the pathogenesis and progression of human intervertebral disc degeneration or herniation. *Sci Rep* 7:7403. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07780-x>.
- Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 25(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- McConnell S, Kolopack P, Davis AM (2001) The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res* 45(5):453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w).
- Nishimura S, Akagi M, Yoshida K et al (2004) Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) binding to lectin-like Ox-LDL receptor-1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-KappaB. *Osteoarthr. Cartil* 12:568–576. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.04.005>.
- Oliviero F, Lo Nigro A, Bernardi D et al (2012) A comparative study of serum and synovial fluid lipoprotein levels in patients with various arthritides. *Clin Chim Acta* 413:303–307. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.019>.
- Rezuş E, Cardoneanu A, Burlui A et al (2019) C The link between inflammaging and degenerative joint diseases. *Int J Mol Sci* 20:E614. <https://doi.org/10.3390/ijms20030614>.
- Scilabra SD, Yamamoto K, Pignoni M et al (2016) Dissecting the interaction between tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1): development of a “TRAP” to increase levels of TIMP-3 in the tissue. *Matrix Biol* 59:69–79. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.004>.
- Sutherland MW, Learmonth BA (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic Res* 27(3):283–289. <https://doi.org/10.3109/10715769709065766>.
- Veronese N, Koyanagi A, Stubbs B et al (2019) Statin use and knee osteoarthritis outcomes: a longitudinal cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 71:1052–1058. <https://doi.org/10.1002/acr.23735>.
- Walters M, Skovgaard K, Andersen PH et al (2021) Dynamics of local gene regulations in synovial fluid leukocytes from horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Veterin Immunol Immunopathol* 141:110325. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110325>.
- Yamamoto K, Owen K, Parker AE et al (2014) Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-mediated endocytic clearance of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 (ADAMTS-4): functional differences of non-catalytic domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in LRP1 binding. *J Biol Chem* 289(10):6462–6474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545376>.
- Yamamoto K, Santamaria S, Botkjaer KA et al (2017) Inhibition of shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 reverses cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 69:1246–1256. <https://doi.org/10.1002/art.40080>.
- Yamamoto K, Scavenius C, Meschis MM et al (2022) Uncovering the ligandome of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in cartilage: a top-down approach to identify therapeutic targets. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.02.482546>.
- Yamamoto K, Wilkinson D, Bou-Gharios G (2021) Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 109(3):277–290. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00739-7>.
- Yucesoy B, Charles LE, Baker B et al (2015) Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: a review. *Work* 50:261–273. <https://doi.org/10.3233/WOR-131739>.
- Zushi S, Akagi M, Kishimoto H et al (2009) Induction of bovine articular chondrocyte senescence with oxidized low-density lipoprotein through lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1. *Arthritis Rheum* 60:3007–3016. <https://doi.org/10.1002/art.24816>.

Надійшла в редакцію 30.08.22
Після доопрацювання 26.11.22
Прийнята до друку 18.05.23