

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *COMP*, *TLR2*, *TLR4* ТА *NFKB1* У КЛІТИНАХ СИНОВІАЛЬНОЇ РІДИНИ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

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

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

E-mail: alevtina.huet@knu.ua *, kateryna.dvorshchenko@knu.ua, dmytrogrebinyk@knu.ua,
borodindoc@gmail.com, oleksandrkorotkiy@knu.ua, olexiy.savchuk@knu.ua, ostapchenko@knu.ua

Автор для кореспонденції – А.С. Юет, e-mail: alevtina.huet@knu.ua

Коронавірусна хвороба 2019, яка викликана вірусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), призвела до ураження багатьох людей в усьому світі, включно з Україною. Дотепер лишається нез'ясованим потенційний вплив цього захворювання на перебіг остеоартриту – одного з поширених хронічних дегенеративних захворювань суглобів. На меті нашої роботи було оцінити експресію генів *COMP*, *TLR2*, *TLR4* і *NFKB1* у клітинах синовіальної рідини та встановити концентрацію цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-8); *TLR-2* і *COMP* у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли на COVID-19. У роботі брали участь 75 чоловіків, віком від 45 до 55 років. Волонтерів було поділено на групи: перша група ($n = 25$) – умовно здорові донори, друга група ($n = 25$) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню, третя група ($n = 25$) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню, які перехворіли COVID-19 легкої та середньої тяжкості 6–9 місяців тому. Рівень експресії генів *COMP*, *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* у клітинах синовіальної рідини колінних суглобів вимірювали за допомогою ЗТ-ПЛР у реальному часі. Концентрацію ІЛ-6, ІЛ-8, *TLR-2* і *COMP* визначали імуноферментним аналізом. Було виявлено більш значне зниження експресії гена *COMP* у хворих на остеоартрит після перенесеної хвороби COVID-19 відносно пацієнтів з остеоартритом на тлі більш вираженого збільшення концентрації *COMP* у хворих на остеоартрит після інфікування SARS-CoV2. Крім того, було показано посилення експресії генів *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* здебільшого у хворих на остеоартрит після перенесеної хвороби COVID-19 відносно пацієнтів з остеоартритом на фоні значнішого збільшення концентрації ІЛ-6, ІЛ-8, *TLR-2* у хворих з остеоартритом після перенесеної хвороби COVID-19. Загострення загальносистемного запалення через відповідь організму на вірусну інвазію може спричинювати такий патологічний зв'язок. От-

римані нами результати вказують на інтенсифікацію деструкційних процесів у клітинах синовіальної рідини пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції, що може свідчити про ризик більш важкого перебігу цієї хвороби.

Ключові слова: SARS-CoV-2, остеоартрит, запалення, експресія генів *COMP*, *TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, ІЛ-6, ІЛ-8, *TLR-2*, *COMP*.

Вступ. Коронавірусна хвороба 2019, викликана вірусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), призвела до ураження населення в багатьох країнах, у тому числі в Україні. У нових дослідженнях описано випадки реактивного артрит у пацієнтів, які перехворіли COVID-19. Більш того, показано зв'язок між цим вірусним захворюванням та артритом із широким діапазоном симптомів: від артралгії до артрити (Guan et al., 2020; Joob and Wiwanitkit, 2020; Ono et al., 2020; Gasparotto et al., 2021). Ймовірно, інфекція SARS-CoV-2 здатна атакувати опорно-рухову систему, залучаючи механізми імунного запалення, а це, у свою чергу, може призвести до запального артрити під час інфекційної або постінфекційної стадії (Conway et al., 2020; Mukarram et al., 2021; Farisogullari et al., 2022; Lauwers et al., 2022). Зокрема, особливо вразливою групою є пацієнти з хронічними патологічними станами, у тому числі хворі на остеоартрит (ОА) – дегенеративне захворювання суглобів (Chow et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). Отже, між COVID-19 та розвитком ОА існує певний патологічний зв'язок, і з'ясування його молекулярно-генетичних механізмів є надзвичайно важливим для виявлення ризиків більш важкого перебігу цього захворювання.

COMP (хрящовий олігомерний матриксний білок (також відомий як тромбоспондин-5; кодується геном *COMP*)) є неколагеновим глікопротеїном і відіграє важливу роль у розвитку та гомеостазі хряща як основний компонент позаклітинного матриксу (Jaabar et al., 2022). Мутації гена *COMP* у людини можуть призвести до дисплазії та інших захворювань суглобів, у той час як нестача олігомерного матриксного білка може зумовити артрити різної етіології (Jaabar et al., 2022; Huet et al., 2023). Аберації в патернах експресії генів хондроцитів, включно з підвищенням експресії каталітичних цитокінів і деградаційних ферментів, можуть спричиняти руйнування позаклітинного матриксу. IL-1 β (IL-1 β), прозапальний цитокін, визнано основним стимулятором деградації хряща при ОА (Chow et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). Він, а також трансформуючий фактор росту- β 1 (TGF- β 1), IL-6, IL-8 та інші цитокіни й хемокини сприяють синтезу деградаційних ферментів, у тому числі матриксних металопротеїназ (MPP), які активно розщеплюють позаклітинний матрикс і знижують синтез колагену II типу (Wang C. et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022).

Toll-подібні рецептори (TLR) — це еволюційно-консервативні молекули, які активують імунні відповіді за допомогою розпізнавання мікробно-асоційованих молекулярних патернів. Сигналізація TLR потрібна для правильної активації імунних відповідей під час інфекцій (Ding et al., 2019; Panaro et al., 2020). Так, було показано зростання експресії TLR-2 та TLR-4 при ОА на фоні збільшення рівня прозапальних цитокінів (Panaro et al., 2020; Ding et al., 2019; Wang Y. et al., 2020).

Субодиниця 1 ядерного фактора- κ B — NF- κ B1 — це білок (кодується однойменним геном *NFKB1*), який контролює велику групу генів, залучених до розвитку запалення, проліферації клітин тощо; та відіграє визначальну роль у патогенезі остеоартриту (Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Cheleschi et al., 2022).

При запаленні суглоба сигнальний шлях NF- κ B може бути активований бактеріями, прозапальними цитокінами, активними формами кисню, продуктами деградації позаклі-

тинного матриксу тощо (Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Cheleschi et al., 2022). В останні роки було виявлено, що усі сигнали від TLR надходять до NF- κ B, а активація NF- κ B, у свою чергу, має вирішальне значення для функціонування TLR-сигналіну (Chow et al., 2020; Cheleschi et al., 2022). Хоча сигнальний шлях TLR-2/NF- κ B може бути залученим до розвитку дегенеративного ОА, точний механізм такого впливу наразі залишається невідомим. У той же час інгібування цього сигнального може протидіяти пошкодженню хондроцитів, викликаного надмірним синтезом прозапальних цитокінів (Liu et al., 2017; Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Cheleschi et al., 2022).

Зважаючи на вищесказане, метою роботи було проаналізувати експресію генів *COMP*, *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* у клітинах синовіальної рідини та встановити концентрацію цитокінів (IL-6, IL-8); TLR-2 і COMP у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Матеріали і методи. У досліді брали участь 75 людей (чоловіки), віком від 45 до 55 років (середній вік у кожній групі був однаковий), котрі знаходились на стаціонарному або амбулаторному лікуванні в ортопедичному спеціалізованому медичному центрі «Ортоклініка» (м. Тернопіль, Україна) через ОА. Хворі мали визначений діагноз «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеню» на основі клінічних та рентгенологічних критеріїв. Під час відбору усім пацієнтам проводилася рентгенографія колінних суглобів у прямій (передньозадній) та боковій проекціях. Оцінювання функціонального стану колінних суглобів та інтенсивності болю хворих проводили шляхом розрахунку індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index). Його підраховують на основі відповідей пацієнта на тест, який містить 24 запитання: 5 питань — про прояв больових відчуттів; 2 питання — про скутість; 17 питань — стосовно функціональної активності (McConnell et al., 2001). Волонтерів було поділено на такі групи: перша група (n = 25) — умовно здорові добровольці; друга група (n = 25) — хворі з ОА колінних суглобів II–III ступеню; третя група

($n = 25$) – пацієнти з ОА колінних суглобів II–III ступеню, які перехворіли COVID-19 легкої та середньої тяжкості 6–9 місяців тому. Діагноз COVID-19 було підтверджено за допомогою ЗТ-ПЛР на мазку з носоглотки. Збирання біоматеріалів (синовіальна рідина, цільна кров) проводили в медичному центрі «Ортоклініка» (Тернопіль, Україна). Синовіальну рідину відбирали в стерильні гепаринізовані пробірки за допомогою артроцентезу колінного суглобу за стандартними протоколами цієї процедури.

Кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі. У відповідних клітинах синовіальній рідини (лімфоцити, нейтрофіли, моноцити й макрофаги) досліджували експресію вищевказаних генів. Тотальну РНК виділяли за допомогою методу Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Усі зразки отриманої РНК обробляли ДНКазою згідно протоколу від фірми-виробника (DNase I, RNase-free (1 U/ μ L), «Thermo Fisher Scientific», США). Синтез кДНК і кількісну полімеразну ланцюгову реакцію (qRT-PCR) проводили, використовуючи, комерційний набір «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва), та по 0,2 мкмоль/л кожного праймера. qRT-PCR проходила згідно температурних умов від фірми-виробника: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °C – 15 хв; потім 40 циклів: плавлення ДНК 95 °C – 15 с; відпал праймерів 50 °C – 35 с; елонгація 72 °C – 30 с; фінальна добудова ампліфікація 72 °C – 5 хв.

Використано наступні послідовності праймерів: для *COMP*: прямий – AAGTGGGCT-ACATCAGGGTG та зворотний – GTGTCA-TTGCAGCGGTAACG; для *TLR2*: прямий AG-GTGACTGCTCGGAGTTCT та зворотний – C-CTGTCTTCCCTGCCTTCACT; *TLR4*: прямий – CCCTGCGTGGAGACTTGG та зворотний – ATGGAATCGGGGTGAAG; *NFKB1*: прямий – TGGGAAGGCCTGAACAAATG та зворотний – TGAAGGTATGGGCCATCTGT; для *ACTB* (ген β -актину було використано як ендogenous контроль реакції через його конститутивну експресію): прямий – CTTCCAGCTCCTCCCT-GGAG та зворотний – CCACAGGACTCCA-TGCCAG. Нами було відібрано саме ген *ACTB* в якості гена порівняння після проведення по-

передніх досліджень, в яких було виявлено однаковий рівень його експресії в клітинах синовіальної рідини тощо волонтерів усіх груп, які брали участь у роботі. Відтворюваність результатів qRT-PCR було перевірено в паралельних експериментах, дублюючи ПЛР у реальному часі на зразках РНК хворих, використовуючи кожен праймер три рази. Після циклів ампліфікації зчитували флуоресценцію інтеркалюючого барвника SYBR Green I, після проходження qRT-PCR будували криві плавлення для перевірки генерування димерів праймерів і специфічності проходження реакції. Рівень експресії генів обчислювали за допомогою порівняльного C_T методу « $\Delta\Delta C_T$ Method» (Livak and Schmittgen, 2001). Ефективність ампліфікації обраховували за формулою: $Ex = (10^{-1/slope}) - 1$. Вона була однаковою – 83 % ($slope = -3,8$). Відносний рівень експресії вищевказаних генів унормовувати до рівня експресії *ACTB*.

ІФА. Концентрацію IL-6, IL-8, TLR2, COMP вимірювали в плазмі крові (у триплікатах на кожен зразок) за допомогою імуноферментних наборів реагентів: «Human IL-6 ELISA Kit», «Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit», «Human TLR2 ELISA Kit», «Human COMP DuoSet ELISA» (Catalog # NBP1-89869; D8000C; NBP2-76636; DY3134 «Novus Biologicals», США) за рекомендаціями виробника (довжина хвилі 450 нм); використовуючи прилад «STAT FAX 2100» («Awareness Technology Inc.», США).

Статистичний аналіз отриманих даних. Одержані результати були протестовані на нормальний розподіл за допомогою тесту Шапіро-Вілка, використовуючи програмний пакет «GraphPad Prism 8.4.3» («GraphPad Software Inc.», США). Після цього дані обраховували із застосуванням one-way ANOVA (односпрямований дисперсійний аналіз) із пост-тестом Тукея. Отримані дані представлено як середнє арифметичне $\pm$ стандартне відхилення (SD). Кореляційний аналіз проводили за допомогою коефіцієнту лінійної кореляції Пірсона (r). Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати. Рівень експресії гена *COMP*. У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що експресія гена *COMP* у клітинах синовіальної рідини пацієнтів з ОА

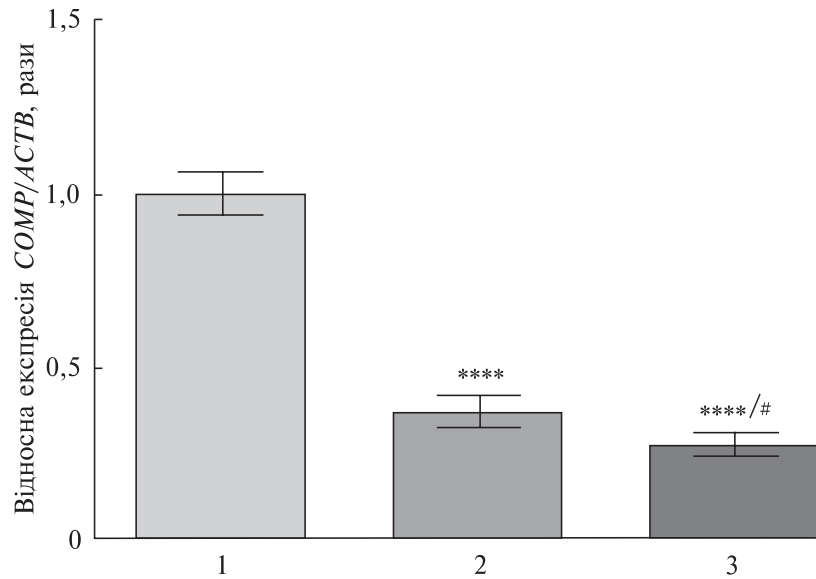


Рис. 1. Рівень експресії гена *COMP* у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи пацієнтів з остеоартритом

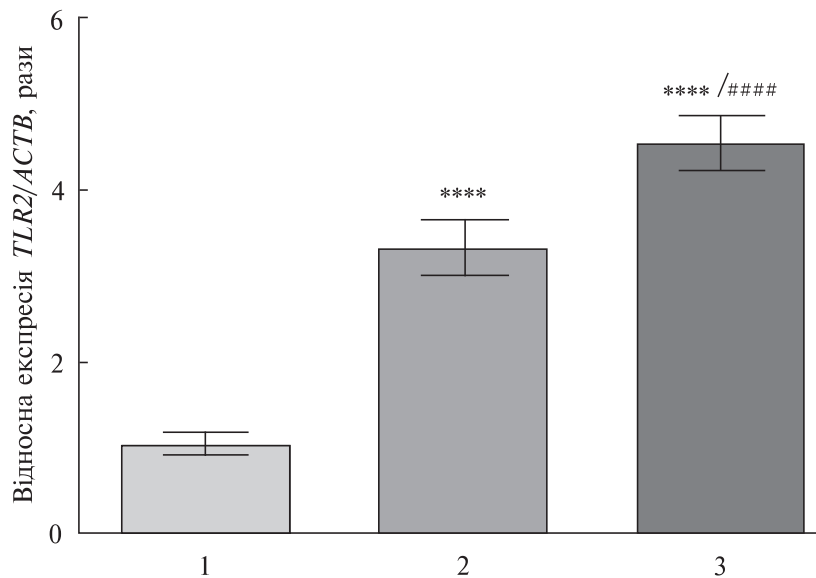


Рис. 2. Рівень експресії гена *TLR2* у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; #### – $p \leq 0,0001$ відносно групи пацієнтів з остеоартритом

був нижчим у 2,7 рази ($p \leq 0,0001$) у порівнянні з умовно здоровими донорами. У хворих з ОА колінних суглобів, які перехворіли COVID-19, даний показник знижувався в 3,6 рази ($p \leq 0,0001$) відносно першої групи та в 1,3 рази ($p \leq 0,05$), порівнюючи з другою групою добровольців (рис. 1).

Рівень експресії генів TLR2, TLR4, NFKB1. Нами було виявлено, що рівень експресії генів *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* у клітинах синовіальної рідини хворих на ОА зростав в 3,3; 2,5; 3,7 рази ($p \leq 0,0001$) відносно групи умовно здорових людей (рис. 1–4). У той же час, у хворих з ОА колінних суглобів після SARS-CoV-2, експресія

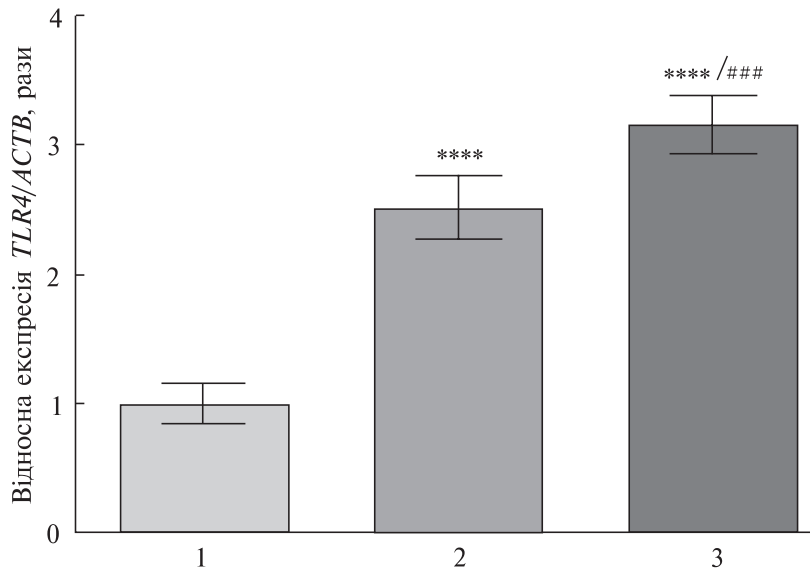


Рис. 3. Рівень експресії гена *TLR4* у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; ### – $p \leq 0,001$ відносно групи пацієнтів з остеоартритом

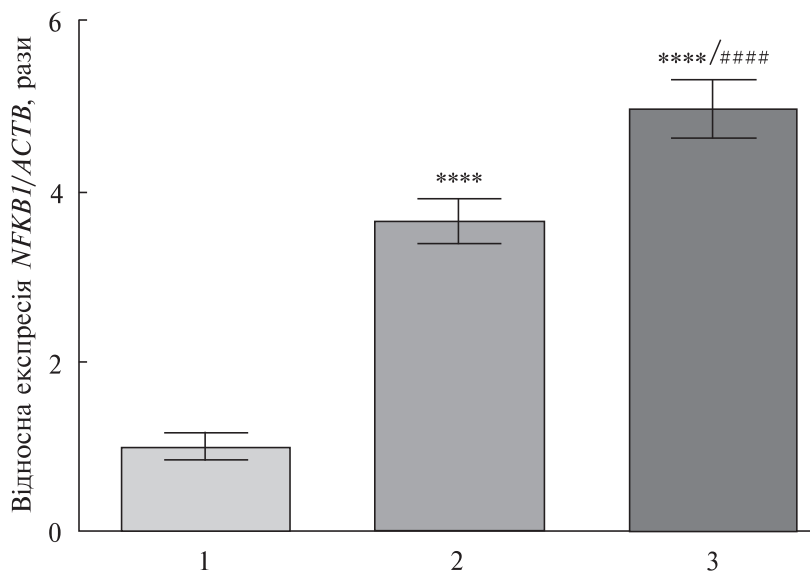


Рис. 4. Рівень експресії гена *NFKB1* у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит. 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19; **** $p \leq 0,0001$ відносно умовно здорових людей; #### – $p \leq 0,0001$ відносно групи пацієнтів з остеоартритом

збільшувалась у 4,5; 3,2; 5 рази ($p \leq 0,0001$) у порівнянні з умовно здоровими донорами та в 1,4 ($p \leq 0,0001$), 1,3 ($p \leq 0,001$) і 1,4 рази ($p \leq 0,0001$) відповідно, порівнюючи з пацієнтами з ОА (рис. 2–4).

Концентрація ІЛ-6, ІЛ-8, TLR-2, COMP. При проведенні подальших досліджень було пока-

зано, що в плазмі крові пацієнтів, хворих на ОА колінних суглобів, концентрація цитокінів ІЛ-6, ІЛ-8, TLR-2 та COMP була вищою у 2,3; 2,5; 3,8 та 3,4 рази ($p \leq 0,0001$) відносно умовно здорових донорів (таблиця). При аналізі цього показника у плазмі крові пацієнтів з ОА колінних суглобів після SARS-CoV2-

Концентрація ІЛ-6, ІЛ-8, TLR-2, COMP у плазмі крові дослідних груп (М ± SD, n = 75)

Групи людей (чоловіки)	Показник, М ± SD, n = 75			
	ІЛ-6, пг/мл	ІЛ-8, пг/мл	TLR-2, пг/мл	COMP, нг/мл
Умовно здорові (n = 25)	2,15 ± 0,21	5,72 ± 0,54	1,2 ± 0,11	1031,53 ± 105,14
Остеоартрит (n = 25)	4,88 ± 0,49 ****	14,31 ± 1,39 ****	4,6 ± 0,43 ****	3510,43 ± 350,21 ****
Остеоартрит + + COVID-19 (n = 25)	9,78 ± 0,95 ****/####	31,46 ± 3,16 ****/####	6,5 ± 0,64 ****/####	5265,52 ± 527,31 ****/####

Примітка. **** – $p \leq 0,0001$ у порівнянні з умовно здоровими людьми; #### – $p \leq 0,0001$ відносно групи людей з остеоартритом.

інфекції концентрація ІЛ-6, ІЛ-8, TLR-2 та COMP збільшувалась у 4,6, 5,5, 5,4 та 5,1 раза ($p \leq 0,0001$) у порівнянні з умовно здоровими людьми та у 2; 2,2; 1,4 і 1,5 раза ($p \leq 0,0001$) відносно пацієнтів з ОА (таблиця). До того ж, нами було встановлено наявність сильної позитивної кореляції між рівнем експресії гена *TLR-2* та концентрацією TLR-2 у групах пацієнтів, хворих на ОА колінних суглобів та в хворих на ОА колінних суглобів після COVID-19 ($r = 1$, $p = 0,009$).

Обговорення. ОА є найпоширенішим захворюванням суглобів. Хоча патологія ОА не повністю вивчена, це багатофакторний розлад, який характеризується декількома клітинними та молекулярними змінами, такими як дисбаланс між анаболізмом і катаболізмом хряща, гіпертрофією та загибеллю хондроцитів, інфільтрацією макрофагів та активацією імунної відповіді, запаленням і гіпертрофією синовіальної тканини (Chow et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022).

Наразі лише кілька досліджень оцінили біологічний вплив синовіальної рідини на метаболізм хряща. Так, було показано, що синовіальна рідина пацієнтів з ОА стимулювала прозапальні та катаболічні процеси в первинних хондроцитах людини (Ingale et al., 2021; Kulkarni et al., 2021; Cheleschi et al., 2022), тоді як синовіальна рідина із здорових суглобів людини виявляла хондропротекторну роль (Mechan et al., 2021; Nieminen et al., 2022). Отже, запальні та дегенеративні процеси в синові-

альній оболонці та синовіальній рідині є основними причинами подальших молекулярно-генетичних та клітинних змін у суглобі. Однак отримані результати все ще потребують подальшого уточнення.

Прозапальні цитокіни, такі як ІЛ-1 β , TGF- β 1, фактор некрозу пухлини- α (ФНП, TNF- α) належать до медіаторів, які виділяються на ранніх стадіях ОА. Це призводить до того, що активовані хондроцити, синовіоцити та мононуклеарні клітини починають вивільняти хемокіни та цитокіни: ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 тощо (Chow et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). При ОА ІЛ-6, який вивільняється тканиною суглоба, зв'язується з розчинним рецептором ІЛ-6 (ІЛ-6R), що спричинює транс-сигналізацію. Як наслідок, активована імунна система залучає мононуклеарні клітини, такі як моноцити, до запаленої ділянки суглоба. Транс-сигналізація ІЛ-6 спотворює диференціацію моноцитів до макрофагів через активацію рецептора макрофагального колонієстимулюючого фактора (M-CSF) (Chow et al., 2020; Cheleschi et al., 2022).

На першому етапі нашого дослідження ми виявили збільшення концентрації цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8 у групі пацієнтів з ОА колінних суглобів. Ці результати узгоджуються з численними дослідженнями (Wang C. et al., 2020; Chow et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). У той же час, зазначені показники зростали більшою мірою в пацієнтів з ОА після перенесеної хвороби COVID-19 порівняно з хво-

рими на ОА. Загалом такі дані можуть бути пов'язаними із загальносистемним запалення внаслідок дії вірусу (Conway et al., 2020; Joob and Wiwanitkit, 2020; Lai et al., 2020; Lauwers et al., 2022).

Отже, підвищені рівні ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-15, ІЛ-17 тощо, виявлені в синовіальній рідині пацієнтів з ОА, підтверджують їх важливу роль у патогенезі цього захворювання суглобів (Ingale et al., 2021; Kulkarni et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). Так, надмірна кількість таких прозапальних медіаторів у синовіальній рідині може впливати на гомеостаз хондроцитів та індукувати продукцію інших цитокінів і ферментів, що руйнують матрицю, – матричних металопротеїназ, які, у свою чергу, пригнічують синтез протеогліканів і колагену типу II, тим самим викликаючи деградацію хряща при ОА (Kondo et al., 2021; Meehan et al., 2021; Nieminen et al., 2022).

На наступному етапі дослідження нами було виявлено зниження рівня експресії гена *COMP* у другій та третій групі хворих на тлі зростання концентрації *COMP*. З даних літератури відомо, що у процесі прогресування ОА людини експресія анаболічних генів *COL2A1*, *ACAN* та *COMP* у первинних хондроцитах знижується (Mishra et al., 2019; Chen et al., 2023; Jørgensen et al., 2023). Зростання рівня реактивних форм кисню може індукувати катаболічну сигналізацію, спричиняючи розвиток оксидативного стресу та зростання рівня експресії генів, які кодують матричні металопротеїнази, котрі, як було показано, відіграють центральну роль у розпаді позаклітинного матриксу (Huet et al., 2019; Mishra et al., 2019; Yamamoto et al., 2021). У такому випадку, фрагменти *COMP* вивільняються в суглобову рідину навіть на ранніх стадіях ОА (Mishra et al., 2019; Jaabar et al., 2022). Отже, профіль експресії вищезазначених генів можна використовувати як біомаркер для прогнозування розвитку та прогресування остеоартритів колінного суглоба. Отримані нами результати та дані інших дослідників вказують на кореляцію між дегенеративними змінами в суглобах хворих на ОА та варіаціями в рівнях експресії генів *COL2A1*, *ACAN*, *COMP* (Huet et al., 2019; Jaabar et al., 2022; Huet et al., 2023).

У той же час більш значне зниження рівня експресії гена *COMP* у клітинах синовіальної рідини пацієнтів з ОА, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на ОА колінних суглобів, на тлі істотного зростання концентрації *COMP* може вказувати на більш потужну активацію деструктивних процесів у клітинах синовію, незважаючи на здатність популяцій мезенхімальних клітин-попередників синовіальної оболонки здорових суглобів секретувати агрекан та *COMP*, накопичуючи його в синовіальних клітинах суглобів (Krawetz et al., 2022).

Запалення відіграє важливу роль у виникненні болю, оскільки воно вражає безпосередньо синовіальну оболонку, фібробласти та макрофаги, стимулюючи їх до експресії ще більшої кількості прозапальних цитокінів (Ingale et al., 2021; Kulkarni et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). І як було зазначено вище, цитокіни, що секретуються імунними клітинами, зумовлюють розвиток різноманітних запальних захворювань, включно з ОА. Молекули, що вивільняються внаслідок пошкодження хряща, називаються «алармінами» (або DAMP) через те, що як медіатори запалення вони можуть вивільнятися у відповідь на пошкодження тканин (Sard-Sadier and Ojcius, 2012). Ці ендогенні молекули стимулюють TLR2-, TLR-2/4 або TLR4-залежну передачу сигналів, впливаючи на фібриноген, фібрилярний β -амілоїд, гіалуронан, гепарансульфат тощо. Вивільнені некротичними клітинами, ці ліганди зв'язуються з рецепторами сигналу небезпеки (TLR), які розташовані на поверхні хондроцитів. Відсутність перфузії в хрящі і в найближчих кровоносних судинах верхнього надхрящового шару призводить до того, що «аларміни» тривалий час залишаються в лакунах хондроцитів і викликають позитивний зворотний зв'язок. Коли TLR зв'язуються зі своїми лігандами, хрящові клітини експресують прозапальні та алогенні речовини, які потім викликають вторинний синовіт і біль. Такими продуктами хондроцитів можуть бути гістамін, цитокіни, TGF- β 1 та інші медіатори запалення (Chow et al., 2020; Wang et al., 2020; Ingale et al., 2021; Cheleschi et al., 2022). Показано, що при зростанні експресії TLR2 при ОА синовіоцити продукували

металопротейнази та рецепторний активатор ліганду NF-κB (RANKL), що спричинювало подальшу дезінтеграцію хряща та суглоба (Liu et al., 2017; Berthelot et al., 2019; Chow et al., 2020; Panaro et al., 2020).

У нашій роботі було встановлено зростання рівня експресії генів *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* більшою мірою у пацієнтів з ОА після інфікування SARS-CoV-2 відносно хворих з ОА колінних суглобів на тлі більш суттєвого збільшення концентрації TLR-2 у групі пацієнтів з ОА після інфікування COVID-19. Це також може бути зумовлено посиленням загальносистемного запального процесу через реагування організму на вірусну інвазію (Conway et al., 2020; Joob and Wiwanitkit, 2020; Lai et al., 2020; Lauwers et al., 2022).

Враховуючи провідну роль TLR4 у захисті організму від мікробних інфекцій, було виявлено його здатність специфічно розпізнавати та діяти в якості рецептору для ендотоксинів бактеріального ліпополісахариду, які є біологічно важливими молекулярними структурами, асоційованими з патогенами — PAMP (Berthelot et al., 2019; Chow et al., 2020; Panaro et al., 2020). Із даних літератури відомо, що TLR-4-сигналінг опосередковується MyD88-залежним та MyD88-незалежним сигнальними шляхами. У MyD88-залежному-сигналінгу TLR-4 впливає на NF-κB та активуючий протеїн-1 (AP-1) за допомогою загального адаптерного білка MyD88, індукуючи експресію різних запальних цитокінів через IL-1R-асоційовану кіназу (IRAK), мітоген-активовані протеїнкінази (MAP) тощо. Внутрішньоклітинна передача сигналів TLR-4 ініціюється принаймні двома основними шляхами: (i) шлях MYD88-TIRAP (також відомий як MyD88-залежний шлях), де TIRAP опосередковує активацію MyD88-залежного шляху після стимулювання TLR4; який, у свою чергу, регулює ранню активацію NF-κB і запускає транскрипцію відповідних запальних цитокінів, таких як IL-12, IL-8, IL-6 та IL-1 (Berthelot et al., 2019; Chow et al., 2020; Panaro et al., 2020).

Відомо, що NF-κB-сигналінг є одним із важливих механізмів, активованих у патогенезі захворювань, пов'язаних із запаленням, таких як ОА (Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Cheleschi et al.,

2022). Дійсно, у цих патологічних станах NF-κB гіперекспресований у суглобовому хрящі та синовіальній тканині. Він активується прозапальними цитокінами, такими як IL-1β, і продуктами деградації позаклітинного матриксу, а активований NF-κB, у свою чергу, модулює експресію кількох цитокінів, у тому числі IL-6, а також хемокінів і матриксних металопротейназ (MMP-13 тощо); усі ці функції прискорюють катаболічні процеси, відповідальні за сприяння деградації хряща та запалення (Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Wang et al., 2020; Cheleschi et al., 2022).

Крім того, повідомлялося про пряме залучення NF-κB сигнального шляху до мікроРНК-опосередкованої посттранскрипційної регуляції запалення, апоптозу та окисного стресу в хондроцитах та синовіальних фібробластах при ОА. Так, було виявлено, що мікроРНК — miR-93 — була націленою на *TLR4* та пригнічувала активацію шляху NF-κB *in vitro* та *in vivo*. Крім того, надмірна експресія мікроРНК-93 значно пригнічувала рівні прозапальних цитокінів (IL-1β та IL-6) і апоптоз клітин при ОА. Ці висновки надають інформацію для майбутнього напрямку лікування пацієнтів з ОА, вказуючи на те, що інгібування сигнального шляху TLR-2/NF-κB може антагонізувати пошкодження хондроцитів, викликане надмірним синтезом прозапальних цитокінів (Ding et al., 2019; Chow et al., 2020; Cheleschi et al., 2022).

Таким чином, отримані нами результати збігаються з вищезазначеними численними даними літератури, де продемонстровано залучення системи TLR2/4-NF-κB у патогенез ОА (Choi et al., 2019; Jimi et al., 2019; Chow et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Cheleschi et al., 2022). У той же час більш суттєві зміни рівня експресії генів *COMP*, *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* у хворих на ОА після COVID-19 порівняно з групою хворих на ОА колінних суглобів на фоні більш значного збільшення концентрації IL-6, IL-8, TLR-2 можуть свідчити про подальше прогресування захворювання. Це, у свою чергу, може бути пов'язано з посиленням загальносистемного запального процесу внаслідок реагування організму на вірус, з гіперекспресією прозапальних цитокінів, а також із потенційним впливом COVID-19 на старіння суглобів та ОА внаслідок запального

процесу (Conway et al., 2020; Joob et al., 2020; Lai et al., 2020; Gasparotto et al., 2021; Farisogullari et al., 2022; Lauwers et al., 2022). Таким чином, повільно прогресуюче пошкодження хряща при ОА, ймовірно, є наслідком сукупного впливу такого біологічного фактору як інфікування хворих на остеоартрит вірусом SARS-CoV-2 та багатьох генетичних чинників, які викликають зміни в експресії генів та модулюють функціонування різних сигнальних шляхів (у тому числі, TLR2/4-NF-κB).

Висновки. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було виявлено більш значне зниження експресії гена *COMP* у хворих на остеоартрит після перенесеної хвороби COVID-19 відносно пацієнтів з остеоартритом на тлі більш вираженого збільшення концентрації *COMP* у хворих на остеоартрит після інфікування SARS-CoV2. Крім того, було показано посилення експресії генів *TLR2*, *TLR4* та *NFKB1* здебільшого у хворих на остеоартрит після перенесеної хвороби COVID-19 відносно пацієнтів з остеоартритом на фоні значнішого збільшення концентрації ІЛ-6, ІЛ-8, TLR-2 у хворих з остеоартритом після перенесеної хвороби COVID-19. Загострення загальносистемного запалення через відповідь організму на вірусну інвазію може спричинювати такий патологічний зв'язок. Отримані нами результати вказують на інтенсифікацію деструкційних процесів у клітинах синовіальної рідини пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції, що може свідчити про ризик більш важкого перебігу цієї хвороби. Осмислення молекулярних механізмів ускладнення стану пацієнтів з остеоартритом після впливу вірусу SARS-CoV-2 в якості інфекційного тригера, зокрема на прикладі функціонування сигнального шляху TLR2/4-NF-κB, потребує додаткових досліджень.

Дотримання етичних стандартів. Усі волонтери за власним бажанням погодилися взяти участь у даному науковому дослідженні, а також ознайомилися та підписали інформовану згоду відповідної форми. Досліди виконано 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 ЄЕС № 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. Окрім цього, їх було схвалено Комісією з питань біоетики ТОВ «Ортоклініка» (протокол № 1 від 17 січня 2022 р.; Тернопіль, Україна) та Комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 3 жовтня 2022 р.; Київ, Україна). Усі необхідні заходи для забезпечення анонімності пацієнтів були дотримані.

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.

COMP, *TLR2*, *TLR4* AND *NFKB1* GENES EXPRESSION IN SYNOVIAL FLUID CELLS OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS AFTER SARS-COV2 INFECTION

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

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

E-mail: alevtina.huet@knu.ua,
kateryna.dvorshchenko@knu.ua, dmytrogrebinyk@knu.ua,
borodindoc@gmail.com, oleksandrkorotkyi@knu.ua,
olexiy.savchuk@knu.ua, ostapchenko@knu.ua

The coronavirus disease 2019, induced by SARS-CoV-2 virus (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), has led to a huge negative impact on people health all around the globe, including Ukraine. Potential effects of coronavirus infection on the course of osteoarthritis – one of the most widespread chronic degenerative joint illnesses. The aim of this work was to analyze the expression of *COMP*, *TLR2*, *TLR4* and *NFKB1* genes in synovial liquid cells, as well as to establish the concentration of cytokines (IL-6, IL-8); TLR-2 and *COMP* in blood plasma of osteoarthritic patients having beaten SARS-CoV2 infection. The research included 75 men, aged from 45 to 55 years. The volunteers were divided into the following groups: the first group (n = 25) – conditionally healthy people, the second group (n = 25) – II–III degree knee joint osteoarthritis patients, and the third group consisted of 25 patients

with II–III degree knee joint osteoarthritis after beating COVID-19. The expression levels of *COMP*, *TLR2*, *TLR4* and *NFKB1* genes in knee joint synovial liquid cells was measured by RT-qPCR. The concentration of IL-6, IL-8, TLR-2 and COMP was estimated with enzyme-linked immunosorbent assay. More significant decrease in the *COMP* gene expression in osteoarthritic patients, having beaten COVID-19, was shown compared to the group with knee joint osteoarthritis alone on the background of more intensive COMP concentration increase in patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. At the same time the increase in expression levels of *TLR2*, *TLR4* and *NFKB1* was also detected being more evident in osteoarthritic patients after beating COVID-19 disease if compared to the group of patients with knee joint osteoarthritis on the background of more substantial increase in IL-6, IL-8 and TLR-2 in osteoarthritic patients having survived SARS-CoV2 infection. Exacerbation of systemic inflammation due to the body's response to viral invasion can cause such a pathological connection. Our results indicate the intensification of destructive processes in the cells of the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection, which may indicate the risk of a more severe course of this disease.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Berthelot, J.M., Sellam, J., Maugars, Y., and Berenbaum, F., Cartilage-gut-microbiome axis: a new paradigm for novel therapeutic opportunities in osteoarthritis, *RMD Open*, 2019, vol. 5, no. 2, e001037. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-001037>
- Cheleschi, S., Tenti, S., Lorenzini, S. et al., Synovial fluid regulates the gene expression of a pattern of microRNA via the NF-κB pathway: an in vitro study on human osteoarthritic chondrocytes, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 23, no. 15, pp. 8334. <https://doi.org/10.3390/ijms23158334>
- Chen, Y.H., Zhang, X., Chou, C.H., et al., Association of dipeptidylpeptidase 4 (CD26) with chondrocyte senescence and radiographic progression in knee osteoarthritis, *Arthritis Rheumatol.*, 2023, vol. 75(7), pp. 1120–1131. <https://doi.org/10.1002/art.42455>
- Choi, M.C., Jo, J., Park, J., et al., NF-κB signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction, *Cells*, 2019, vol. 8, no. 7, pp. 734. <https://doi.org/10.3390/cells8070734>
- Chomczynski, P., and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Chow, Y.Y., and Chin, K.Y., The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis, *Mediators of Inflammation*, 2020, p. 8293921. <https://doi.org/10.1155/2020/8293921>
- Conway, R., Konig, M.F., Graef, E.R., et al., Inflammatory arthritis in patients with COVID-19, *Transl. Res.*, 2021, vol. 232, pp. 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.02.010>
- Ding, Y., Wang, L., Zhao, Q., et al., MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF-κB signaling pathway, *Int. J. Mol. Med.*, 2019, vol. 43, no. 2, pp. 779–790. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4033>
- Farisogullari, B., Farisogullari, B., and Pinto, A.S., COVID-19-associated arthritis: an emerging new entity, *RMD Open*, 2022, vol. 8, no. 2, e002026. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002026>
- Gasparotto, M., Framba, V., Piovela, C., et al., Post-COVID-19 arthritis: a case report and literature review, *Clin. Rheumatol.*, 2021, vol. 40, no. 8, pp. 3357–3362. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05550-1>
- Guan, W.J., Ni, Z.Y., Hu, Y., et al., Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China, *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, pp. 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Huet, A., Dvorshchenko, K., Korotkyi, O., et al., Expression of Nos2 and Acan genes in rat knee articular cartilage in osteoarthritis, *Cytol. Genet.*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 481–488. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060021>
- Huet, A., Tugarov, Y., Dvorshchenko, K., et al., TGFB1, FOXO1, and COMP genes expression in blood of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection, *Cytol. Genet.*, 2023, vol. 57, no. 2, pp. 128–133. <https://doi.org/10.3103/S009545272302010X>
- Ingale, D., Kulkarni, P., Electricwala, A., et al., Synovium-synovial fluid axis in osteoarthritis pathology: a key regulator of the cartilage degradation process, *Genes*, 2021, vol. 12, no. 7, p. 989. <https://doi.org/10.3390/genes12070989>
- Jaabar, I.L., Cornette, P., Miche, A., et al., Deciphering pathological remodelling of the human cartilage extracellular matrix in osteoarthritis at the supra-molecular level, *Nanoscale*, 2022, vol. 14, pp. 8691–8708. <https://doi.org/10.1039/D2NR00474G>
- Jimi, E., Huang, F., and Nakatomi, C., NF-κB signaling regulates physiological and pathological chondrogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 24, p. 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms20246275>
- Joob, B., and Wiwanitkit, V., Arthralgia as an initial presentation of COVID-19: observation, *Rheumatol. Int.*, 2020, vol. 40, p. 823. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04561-0>
- Jørgensen, A.E.M., Schjerling, P., DellaValle, B., et al., Acute loading has minor influence on human articular cartilage gene expression and glycosaminoglycan

- composition in late-stage knee osteoarthritis: a randomised controlled trial, *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, vol. 31, no. 7, pp. 884–893. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.01.317>
- Kondo, N., Kuroda, T., and Kobayashi, D., Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 10922. <https://doi.org/10.3390/ijms222010922>
- Krawetz, R.J., Wu, Y.E., Bertram, K.L., et al., Synovial mesenchymal progenitor derived aggrecan regulates cartilage homeostasis and endogenous repair capacity, *Cell Death and Disease*, 2022, vol. 13, p. 470. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04919-1>
- Kulkarni, P., Martson, A., Vidya, R., et al., Pathophysiological landscape of osteoarthritis, *Adv. Clin. Chem.*, 2021, vol. 100, pp. 37–90. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.04.002>
- Lai, Q., Spoletini, G., Bianco, G., et al., SARS-CoV2 and immunosuppression: A double-edged sword, *Transpl. Infect. Dis.*, 2020, vol. 22, no. 6, e13404. <https://doi.org/10.1111/tid.13404>
- Lauwers, M., Au, M., Yuan, S., et al., COVID-19 in joint ageing and osteoarthritis: current status and perspectives, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 3, p. 720. <https://doi.org/10.3390/ijms23020720>
- Liu, Y.X., Wang, G.D., Wang, X., et al., Effects of TLR-2/NF- κ B signaling pathway on the occurrence of degenerative knee osteoarthritis: an in vivo and in vitro study, *Oncotarget*, 2017, vol. 19, no. 1, pp. 722–728. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16199>
- Livak, K., and Schmittgen, T., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)), *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McConnell, S., Kolopack, P., and Davis, A.M., The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties, *Arthritis Care Res.*, 2001, vol. 45, no. 5, pp. 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)
- Meehan, R.T., Regan, E.A., Hoffman, E.D., et al., Synovial fluid cytokines, chemokines and MMP levels in osteoarthritis patients with knee pain display a profile similar to many rheumatoid arthritis patients, *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, p. 5027. <https://doi.org/10.3390/jcm10215027>
- Mishra, A., Awasthi, S., Raj, S., et al., Identifying the role of ASPN and COMP genes in knee osteoarthritis development, *J. Orthop. Surg. Res.*, 2019, vol. 14, no. 1, p. 337. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1391-7>
- Mukarram, M.S., Ishaq Ghauri, M., Sethar, S., et al., COVID-19: An emerging culprit of inflammatory arthritis, *Case Rep. Rheumatol.*, 2021, 6610340. <https://doi.org/10.1155/2021/6610340>
- Nieminen, P., Hämäläinen, W., Savinainen, J., et al., Metabolomics of synovial fluid and infrapatellar fat pad in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis, *Inflammation*, 2022, vol. 45, pp. 1101–1117. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01604-x>
- Ono, K., Kishimoto, M., Shimasaki, T., et al., Reactive arthritis after COVID-19 infection, *RMD Open*, 2020, vol. 6, no. 2, e001350. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001350>
- Panaro, M.A., Corrado, A., Benamer, T., et al., The emerging role of curcumin in the modulation of TLR-4 signaling pathway: focus on neuroprotective and anti-rheumatic properties, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 7, p. 2299. <https://doi.org/10.3390/ijms21072299>
- Sand-Sadier, N., and Ojcius, D.M., Alarmins, inflammasomes and immunity, *Biomed. J.*, 2012, vol. 35, no. 6, pp. 437–449. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.104408>
- Wang, C., Shen, J., Ying, J., et al., FoxO1 is a crucial mediator of TGF- β /TAK1 signaling and protects against osteoarthritis by maintaining articular cartilage homeostasis, *PNAS*, 2020, vol. 117, no. 48, pp. 30488–30497. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017056117>
- Wang, Y., Zhao, X., and Liu-Bryan, R., Role of TLR2 and TLR4 in regulation of articular chondrocyte homeostasis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2020, vol. 28, no. 5, pp. 669–674. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.01.011>
- Yamamoto, K., Wilkinson, D., and Bou-Gharios, G., Targeting dysregulation of metalloproteinase activity in osteoarthritis, *Calcif. Tissue Int.*, 2021, vol. 109, no. 3, pp. 277–290. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00739-7>

Надійшла в редакцію 09.01.2025
Після доопрацювання 19.01.2025
Прийнята до друку 18.05.2025