

ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ

**Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С.,
Мамус М.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия*

Резюме. Результаты недавних исследований, демонстрирующих наличие провоспалительных медиаторов при остеоартрите (ОА), схожесть гистологических признаков воспаления при ревматоидном артрите (РА) и ОА, дают основание предположить важную роль нетоза (NETоза) в иммунном воспалении у больных ОА. Цель – оценить способность нейтрофилов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию NETs у больных ОА и влияние реактивного синовита на динамику показателей NETоза.

В исследование вошли 31 больной с верифицированным ОА и 30 условно здоровых лиц. Нейтрофилы выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола. Качественный состав нейтрофильной фракции оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, жизнеспособность клеток – методом исключения трипанового синего, степень активации – с помощью стандартного теста с нитросиним тетразолием. В качестве индуктора образования NETs применяли раствор форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА). Визуализировали спонтанное и индуцированное образование NETs с помощью флуоресцентной микроскопии.

На момент включения в исследование все больные ОА находились в стадии ремиссии. В процессе наблюдения у 23 больных отмечалось обострение ОА. Нейтрофильные фракции демонстрировали высокую чистоту и большое содержание жизнеспособных неактивированных клеток. Данные параметры были сопоставимыми в обеих группах. У больных ОА в ремиссии средняя доля нейтрофилов со спонтанным NETs существенно выше по сравнению со здоровыми лицами, применение ФМА-индуктора сопровождалось значительным повышением способности нейтрофилов к образованию NETs. Обострение ОА демонстрировало дальнейший рост числа нейтрофилов, генерирующих NETs, как в процессе спонтанного, так и в процессе ФМА-индуцированного NETоза. У больных ОА в обострении доля спонтанного и индуцированного NETs значительно выше, чем при ОА в ремиссии. Темп прироста спонтанного образования ловушек выше индуцированного в 3,74 раза.

Таким образом, в ходе нашего исследования у больных ОА мы выявили статистически значимое

Адрес для переписки:

*Бедина Светлана Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Svetlana A. Bedina
A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental
Rheumatology
400138, Russian Federation, Volgograd, Zemlyachka str., 76.
Phone: +7 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru*

Образец цитирования:

*С.А. Бедина, Е.Э. Мозговая, А.С. Трофименко,
С.С. Спицина, М.А. Мамус «Влияние реактивного
воспаления при остеоартрите на образование
внеклеточных ловушек циркулирующих нейтрофилов»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1249-1254. doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2537*

© Бедина С.А. и соавт., 2022

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*S.A. Bedina, E.E. Mozgovaya, A.S. Trofimenko, S.S. Spitsyna,
M.A. Mamus “Effect of reactive inflammation in osteoarthritis
on extracellular traps formation by circulating neutrophils”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1249-1254.
doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2537*

© Bedina S.A. et al., 2022

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOR-2537

повышение способности нейтрофилов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек, зависящее от стадии заболевания. Получение данные дают основание предполагать возможность участия циркулирующих нейтрофилов через NETоз в патогенезе иммунного воспаления при ОА.

Ключевые слова: остеоартрит, нейтрофилы, внеклеточные ловушки нейтрофилов, спонтанный NETоз, индуцированный NETоз, реактивное воспаление

EFFECT OF REACTIVE INFLAMMATION IN OSTEOARTHRITIS ON EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION BY CIRCULATING NEUTROPHILS

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.

A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The results of recent studies demonstrating the presence of pro-inflammatory mediators in osteoarthritis (OA), as well as known similarity of histological signs of inflammation in rheumatoid arthritis (RA) and OA, suggest an important role of NETosis in immune inflammation in OA patients. Our objective was to assess ability of blood neutrophils from OA patients to generate NETosis spontaneously and after *in vitro* induction, and impact of reactive synovitis on the dynamics of NETosis indexes. Thirty-one patients with verified OA and 30 healthy volunteers were included into the study. Circulating neutrophils were isolated with one-step density gradient centrifugation using double layers of Iohexol gradient. Subpopulational profile of isolated neutrophil fractions, their viability, and nonspecific activation were evaluated microscopically using Trypan Blue exclusion test, as well as nitro-blue tetrazolium test. NETs were induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Spontaneous and induced formation of NETs was assessed using fluorescence microscopy. The OA patients were in clinical remission at the time of inclusion in the study. In 23 OA patients, an exacerbation was diagnosed during the study. The neutrophil fractions showed high purity and a high content of viable non-activated cells. These parameters were comparable in the study groups. Mean percentage of spontaneous NETs in OA patients in remission was significantly increased comparing to healthy controls. Usage of PMA, as inducing agent was accompanied by a significant increase in ability of neutrophils to form NETs. Transition of OA to exacerbation was characterized by further significant increase in spontaneous and PMA-induced NETs. Spontaneous and induced NETs in OA patients at acute stage of the disease are significantly higher than in OA patients in remission state. The growth rate of spontaneous NET formation is 3.74 times higher than the induced NET formation in OA patients upon exacerbation. Statistically significant increase in the ability of peripheral neutrophils to spontaneous and induced formation of extracellular traps was found, depending on the stage of osteoarthritis. The data obtained suggest an opportunity for participation of circulating neutrophils via NETosis in pathogenesis of immune inflammation in OA.

Keywords: osteoarthritis, neutrophils, NETs, spontaneous NETosis, induced NETosis, reactive inflammation

Введение

Остеоартрит (ОА) – наиболее часто диагностируемое заболевание опорно-двигательного аппарата, являющееся причиной большого количества прямых и косвенных социально-экономических издержек во всем мире [5, 6, 9]. Прогнозируется, что заболеваемость и распространенность ОА, которые на данный момент уже достигли масштабов эпидемии, резко возрастут в ближайшие десятилетия вследствие роста доли пожилых лиц, дальнейшего распространения избыточного веса в популяции из-за старения населения, роста показателей ожирения и высокого уровня травматического повреждения суставов [9]. Согласно этим прогнозам, к 2040 г. распространенность ОА

увеличится на 49%, затронет как минимум 78,4 млн взрослых в США и встанет в один ряд с основными причинами инвалидности и заболеваемости среди взрослых людей старше 40 лет [7]. Ожидается, что к 2030 году остеоартрит приведет к инвалидности почти 27 млн человек [4]. Несмотря на то, что заболевание является ведущей причиной нарушения подвижности у пожилых людей, а возраст считается важным предиктором ОА, развитие болезни не является неизбежным следствием старения [4, 5].

В настоящее время общепризнано, что в патогенезе заболевания и его прогрессировании существенную роль играют врожденные, а также адаптивные иммунологические механизмы, за-

пускающие воспалительные и метаболические процессы, приводящие к развитию хронического воспаления и разрушению тканей суставов. ОА поражает весь сустав и сопровождается деградацией суставного хряща, гиперплазией синовиальной оболочки, субхондральным склерозом и образованием остеофитов. Точные молекулярные механизмы, участвующие в деградации хрящевого матрикса и развитии ОА, изучены недостаточно [6].

В то же время обнаруженные при ОА морфологические изменения, характерные для воспаления (гиперплазия и мононуклеарно-клеточная инфильтрация синовиальной оболочки сустава), гистологически могут быть неотличимы от ревматоидной синовиальной инфильтрации [6]. Воспаление в виде клеточной инфильтрации синовиальной ткани или субхондральной кости, сопровождающееся экспрессией воспалительных цитокинов, все чаще признается триггером ОА [8]. Среди провоспалительных медиаторов наиболее важная роль при ОА принадлежит интерлейкинам (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-F5–IL-F10), TNF α , которые продуцируются синовиальной оболочкой, суставным хрящом и субхондральной костью, изменяют баланс деградации и восстановления хрящевого матрикса, что приводит к избыточной выработке протеолитических ферментов, ответственных за разрушение хряща. Изменение хряща, в свою очередь, усиливает синовиальное воспаление, создавая порочный круг [1]. Многие из провоспалительных медиаторов стимулируют образование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) в процессе программируемой гибели нейтрофилов (NETоз) при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Неконтролируемая генерация NETs является признанным фактором развития и прогрессирования ревматоидного артрита (РА) [10]. Кроме того, NETоз принимает участие в патогенезе системной красной волчанки, подагры, васкулитов, сердечно-сосудистых, воспалительных заболеваний легких, глаз, желудочно-кишечного тракта и онкологических заболеваний [3]. В то же время, как в отечественной, так и в зарубежной литературе, отсутствует информация об исследованиях, направленных на изучение NETоз у больных ОА и о возможном участии NETs в патогенезе заболевания. Вместе с тем результаты недавних исследований, демонстрирующих наличие провоспалительных медиаторов при ОА, схожесть гистологических признаков воспаления при РА и ОА, дают нам основание предположить не менее важную роль NETоза и в патогенезе ОА.

Цель исследования – оценить способность нейтрофилов периферической крови к спонтан-

ному и индуцированному образованию NETs у больных ОА и влияние реактивного синовита на динамику показателей NETоза.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации и рекомендациями по этике биомедицинских исследований, одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (протокол № 1 от 14.11.2016 г.). В исследование был включен 61 человек, из них 31 (24 женщины и 7 мужчин, средний возраст – 50,4 \pm 1,7 лет) – больные с верифицированным ОА и 30 (9 мужчин и 21 женщина) условно здоровых лиц. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту. Все больные находились на амбулаторном лечении в клинко-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского». У 23 (74,2%) больных отмечалось обострение ОА с развитием синовита. Наличие синовита устанавливали при обнаружении характерных клинических признаков (усиление болевого синдрома в суставах, отек суставов и ограничение движений в них, появление экссудата в полости сустава) в сочетании с умеренным повышением лабораторных показателей (СОЭ и СРБ).

Циркулирующие нейтрофилы периферической крови выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола в оригинальной модификации с плотностью верхнего и нижнего слоев: 1080 кг/м³ и 1090 кг/м³, соответственно. Клеточную фракцию нейтрофилов, состоящую в основном из нейтрофилов низкой и средней плотности, отбирали из нижней интерфазы, на границе градиентов. После двукратного отмывания нейтрофилов от градиентов и примесей тромбоцитов в фосфатно-солевом буферном растворе определяли основные характеристики полученных фракций. Качественный состав фракций оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, окрашенных по методу Май-Грюнвальда, жизнеспособность клеток – методом исключения трипанового синего, степень активации – с помощью стандартного теста с нитросиним тетразолием [2]. В качестве индуктора образования NETs применяли раствор форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) (Merck/Sigma, США). Визуализировали спонтанное и индуцированное образование NETs с помощью флуоресцентной микроскопии (длина волны возбуждения 485 нм, эмиссии – 535 нм) после инкубации нейтрофилов в 100 мкл 1,25 мкМ SYBR Green в течение 10 минут. За NETs принимали четко определяемые, расположенные внеклеточно сетчатые структуры, превышающие

размер интактных гранулоцитов. Результат выражали в процентах, как относительное количество нейтрофилов с внеклеточными ловушками на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации в образце не менее 200 клеток.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA 10.0 для Windows. Тип распределения анализировали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты выражали как среднее арифметическое (95% доверительный интервал) (M (95 % ДИ). Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100%. Для сопоставления центральных тенденций использовали парный и непарный критерии Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Темп прироста показателей спонтанного и индуцированного образования NETs при обострении ОА по сравнению с предыдущим визитом вычисляли как частное от деления разницы конечного и исходного значений на исходное значение, умноженное на 100%.

Результаты и обсуждение

На момент включения в исследование все больные находились в стадии ремиссии. Первый контрольный визит (через 3 месяца) прошли все больные ОА, включенные в исследование, второй (через 8 месяцев) – 25 больных, третий (через 12 месяцев после включение в исследование) – 13 больных. 1 больной выбыл на втором визите и 2 – на третьем из-за отказа от дальнейшего участия в исследовании. В процессе исследования у больных ОА диагностировалось обострение заболевания: у 5 – на первом, у 10 – на втором и у 8 – на третьем визите. Такие пациенты составили груп-

пу больных ОА с синовитом. В целом у 23 (74,2%) больных отмечалось обострение ОА с развитием синовита, которое сопровождалось усилением боли в суставах, отеком и ограничением движений в суставах, появлением экссудата в полости суставов, а также умеренным повышением лабораторных показателей (M (95% ДИ)): СОЭ – 27,6 (25,3-29,9) мм/ч и СРБ – 6,5 (6,1-6,9) мг/л. Согласно классификации I. Kellgren и I. Lawrence II рентгенологическая стадия определялась у 11 (35,5%), III – у 18 (58,0%), IV – у 2 (6,5%) больных. В 67,7% случаев диагностировалось поражение коленных суставов, в 58,1% – суставов кистей, в 41,9% – тазобедренных, в 25,8% – голеностопных, в 16,1% – плечевых суставов. У большинства пациентов ОА (77,4%) определялось одновременное поражение нескольких суставов.

В ходе исследования образования NETs нами была использована усовершенствованная оригинальная методика выделения клеток с использованием в качестве градиента раствора йогексола. Это дало возможность получить нейтрофильные фракции с высокими показателями чистоты и жизнеспособности и низким процентом активированных клеток. Данные параметры в группе больных ОА были сопоставимыми с показателями здоровых лиц (рис. 1). Средняя доля нейтрофилов со спонтанным ловушкообразованием при ОА в состоянии ремиссии была существенно выше по сравнению со здоровыми лицами ($p = 0,012$) (рис. 2). Применение ФМА-индуктора сопровождалось значительным повышением способности нейтрофильных фракций к образованию внеклеточных ловушек у больных ОА в ремиссии ($p < 0,001$) (рис. 2). Ухудшение состояние больных ОА в результате обострения заболевания

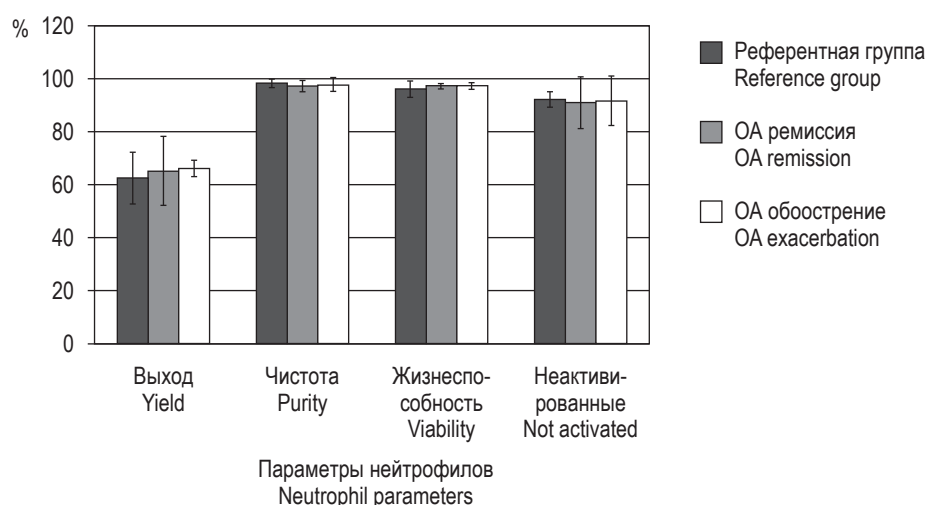


Рисунок 1. Основные показатели нейтрофилов в референтной группе и группе больных ОА на этапе включения в исследование и при обострении заболевания (M (95% ДИ))

Figure 1. Principal neutrophilic indicators both in reference group and OA at the inclusion point as well as during disease exacerbation (M (95% CI))

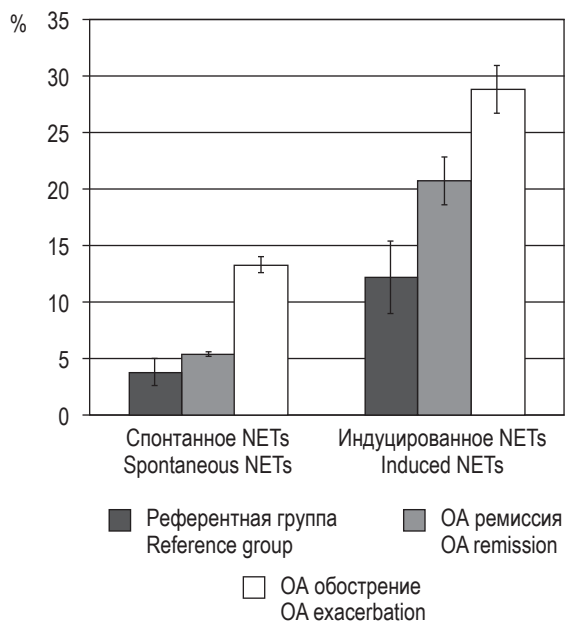


Рисунок 2. Динамика спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных ОА при обострении (M (95% ДИ))

Figure 2. Dynamics of spontaneous and induced neutrophil extracellular traps formation in OA patients during exacerbation (M (95% CI))

и развития синовита демонстрировало дальнейший рост числа нейтрофилов, генерирующих ловушки, как в процессе спонтанного, так и в процессе ФМА-индуцированного нетоза ($p < 0,0001$ для всех случаев) (рис. 2). В то же время у больных ОА в обострении доля спонтанного и индуцированного образования NETs значительно выше, чем при ОА в ремиссии ($p < 0,001$ для всех случаев). Темп прироста спонтанного образования ловушек выше индуцированного в 3,74 раза (рис. 3).

Таким образом, в ходе нашего исследования мы выявили статистически значимое повышение способности нейтрофилов периферической крови у больных ОА к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек, зависящее от стадии заболевания. У больных ОА в ремиссии по сравнению с группой здоровых лиц, спонтанное и индуцированное образование NETs выше на 42% и 70% соответственно. При переходе к обострению ОА эти показатели составили 250% и 136% соответственно для спонтанного и индуцированного образования NETs. Изменение показателей NETоза при ОА может свидетельствовать об участии NETs в патогенезе заболевания.

В то время как за последние десятилетия в отношении РА достигнут значительный прогресс, как в понимании его патогенеза [2, 10], так и в создании новых методов лечения, патофизиология ОА все еще изучена недостаточно. Возможно, полученные данные будут способствовать раскрытию некоторых механизмов патогенеза ОА в

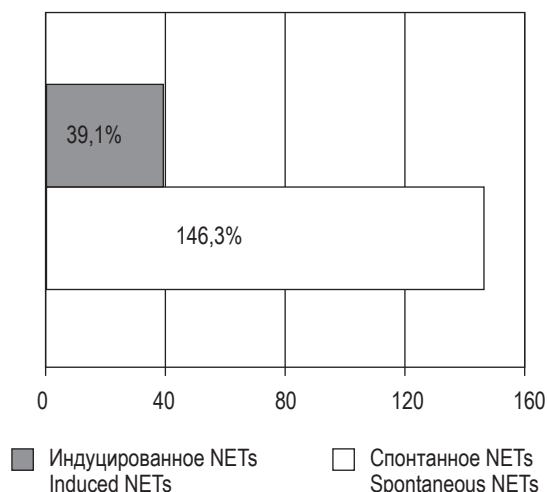


Рисунок 3. Темп прироста спонтанного и индуцированного образования NET у больных ОА

Figure 3. Growth rate of spontaneous and induced NET formation in OA patients

ближайшем будущем и обеспечат распознавание ранее неизвестных биологических маркеров болезни и разработку новых эффективных фармакологических методов лечения, направленных на контроль генерации NETs. В более ранних исследованиях мы показали рост способности нейтрофилов к спонтанной и индуцированной генерации NETs у больных РА в состоянии ремиссии [2]. Ряд зарубежных исследований демонстрирует увеличение образования NETs у больных с активным РА [10]. Однако в литературе отсутствуют данные о динамике образования NETs при переходе из состояния ремиссии к активному РА. В наших дальнейших исследованиях мы планируем изучить изменение основных параметров NETоза, ассоциированное с активацией аутоиммунного воспаления при РА, а также провести сравнительное исследование образования NETs при ОА с синовитом и активным РА.

Заключение

Нами изучены параметры образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных ОА в состоянии ремиссии, а также их динамика при переходе к обострению заболевания. Результаты нашего исследования демонстрируют повышенную способность циркулирующих периферических нейтрофилов как к спонтанному, так и к индуцированному образованию внеклеточных ловушек у больных ОА вне обострения, и дальнейший существенный рост NETоза, сопровождающий переход ремиссии в фазу обострения заболевания. Полученные данные дают нам основание предполагать возможность участия циркулирующих нейтрофилов через NETоз в патогенезе иммунного воспаления при ОА.

Список литературы / References

1. Бадокин В.В. Остеоартрит: от патогенеза к рациональной терапии. М., 2020. 248 с. [Badokin V.V. Osteoarthritis: from pathogenesis to natural therapy]. Moscow: 2020. 248 p.
2. Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.А. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической крови больных ревматоидным артритом: изучение нового цитруллинсодержащего аутоантигена // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1165-1170. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A. Formation of extracellular traps by circulating neutrophils and monocytes in rheumatoid arthritis patients: a study of new citrullinated autoantigen. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1165-1170. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-FOE-2301.
3. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестник московского университета. Сер. 16. Биология, 2020. Т. 75. № 4. С. 210-225. [Vorobyeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik moskovskogo universiteta. Ser. 16. Biologiya = Bulletin of Moscow University. Ser. 16. Biology*, 2020, Vol. 75, no. 4, pp. 210-225. (In Russ.)]
4. Ashford S., Williard J. Osteoarthritis: A review. *Nurse Pract.*, 2014, Vol. 39, no. 5, pp. 1-8.
5. Chen D., Kim D.J., Shen J., Zou Z., O'Keefe R.J. Runx2 plays a central role in Osteoarthritis development. *J. Orthop. Translat.*, 2019, Vol. 23, pp. 132-139.
6. Geyer M., Schönfeld C. Novel insights into the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 98-107.
7. Hootman J.M., Helmick C.G., Barbour K.E., Theis K.A., Boring M.A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable Activity limitation among US adults, 2015-2040. *Arthritis Rheum.*, 2016, Vol. 68, no. 7, pp. 1582-1587.
8. Hügle T., Geurts J., Nüesch C., Müller-Gerbl M., Valderrabano V. Aging and osteoarthritis: an inevitable encounter? *J. Aging Res.*, 2012, Vol. 2012, 950192. doi: 10.1155/2012/950192.
9. Mandl L.A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, Vol. 27, no. 3, pp. 359-364.
10. Song W., Ye J., Pan N., Tan C., Herrmann M. Neutrophil extracellular traps tied to rheumatoid arthritis: points to ponder. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 578129. doi: 10.3389/fimmu.2020.578129.

Авторы:

Бедина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мозговая Е.Э. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Трофименко А.С. — к.м.н., заведующий клинико-
биохимической лабораторией ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Спицина С.С. — младший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мамус М.А. — младший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Bedina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy Research
Institute of Clinical and Experimental Rheumatology,
Volgograd, Russian Federation

Mozgovaya E.E., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, Clinical Biochemical Department, A. Zborovskiy
Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology,
Volgograd, Russian Federation

Trofimenko A.S., PhD (Medicine), Head, Clinical Biochemical
Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Spitsyna S.S., Junior Research Associate, Clinical Biochemical
Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Mamus M.A., Junior Research Associate, Clinical Biochemical
Department, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation