

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ДЖУРА ТАІСІЯ АНАТОЛІЇВНА

Допускається до захисту:
завідувача кафедри біофізики і фізіології
кандидат хім. наук, доцент

_____ О. І. Доценко

« _____ » _____ 20 ____ р.

**ПОШУК БІОХІМІЧНИХ ТА ГЕМАТОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ
ОЦІНКИ СТАНУ ХВОРИХ НА COVID-19**

Спеціальність 091 Біологія

Кваліфікаційна (магістерська) робота

Науковий керівник:

Г.В. Тарадіна

Оцінка: _____ / _____ /

Голова ЕК: _____

Вінниця 2022

АНОТАЦІЯ

Джура Т.А. Пошук біохімічних та гематологічних маркерів оцінки стану хворих на COVID-19. Спеціальність 091 «Біологія», Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2022.

В кваліфікаційній (магістерській) роботі досліджено зміни гематологічних та біохімічних показників крові хворих на COVID-19 з метою виявлення прогностичних ознак. Показано збільшення кількості дейкоцитів, нейтрофілів, АЛТ та ГГТ на фоні зниження рівня лімфоцитів, еозинофілів, загального білка та протромбінового часу.

Ключові слова: COVID-19, гематологічні показники, біохімічні показники, кров

41 с., 8 табл., 2 рис., 41 джерело.

Dzhura T.A. Search for biochemical and hematological markers for the assessment of patients with COVID-19. Specialty 091 "Biology", Educational program "Biology ". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2022.

In the qualification (master's) thesis, changes in hematological and biochemical blood parameters of patients with COVID-19 were investigated in order to identify prognostic signs. An increase in the number of deicytes, neutrophils, ALT and GGT was shown against the background of a decrease in the level of lymphocytes, eosinophils, total protein and prothrombin time.

Keywords: COVID-19, hematological parameters, biochemical parameters, blood

41 p., 8 tabl., 2 Fig., 41 Bibliography items.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Особливості інфекції COVID-19.....	8
1.2 Лабораторна діагностика COVID-19.....	11
1.2.1 Показники та діагностичне значення загального та біохімічного аналізів крові при COVID.....	12
1.2.2 Гематологічні зміни.....	14
1.2.3 Біохімічні параметри.....	16
1.3 Маркери запалення. «Цитокіновий шторм».....	18
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	22
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРЕМЕНТУ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

НК — натуральні кілери;

АСЛО — антистрептолізин-О;

АлАТ — аланінамінотрансфераза;

АсАТ — аспаратамінотрансфераза;

ГГТ — гамма-глутаматтрансфераза;

КК — креатинкіназа;

ЛДГ — лактатдегідрогеназа;

ПКТ — прокальцитонін;

ІНЛ — індекс нейтрофіли/лімфоцити;

СРБ — с-реактивний білок

РНК — рибонуклеїнова кислота;

ГДН — гостра дихальна недостатність;

АЧТЧ — активований частковий тромбопластиновий час;

ПЧ — протромбіновий час.

ВСТУП

Ведення пацієнтів із COVID-19 залишається проблематичним і суперечливим, хоча цього і слід очікувати при захворюнні, що з'явилося недавно. Перші симптоми COVID-19 нагадують симптоми багатьох інших інфекцій та запальних станів, які вражають дихальну систему; вони включають лихоманку, чхання та риніт, постійний кашель та втому з болем у тілі [18]. Однак у інфікованого пацієнта можуть швидко розвинутися додаткові та більш важкі симптоми, які можуть бути небезпечними для життя та потребують втручання інтенсивної терапії; до них належать пневмонія, сильна задишка, діарея, дисперсний тромбоз та судинне запалення. Додатковим питанням у догляді за пацієнтами з COVID-19 є наявність супутніх захворювань, які взаємодіють із COVID-19, зокрема легеневих та судинних захворювань, які можуть значно погіршити прогноз пацієнта. Це важливі міркування з огляду на відсутність ефективної терапії COVID-19.

Всесвітня організація охорони здоров'я рекомендувала, щоб усі пацієнти з підозрою на COVID-19 проходили тестування за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), яка безпосередньо визначає вірусну РНК [30]. Тестування з використанням інших підходів не має прийнятної точності. Однак для отримання остаточних результатів тесту RT-PCR може знадобитися багато годин або днів, до цього часу стан здоров'я та інфекційний статус пацієнтів можуть погіршитися.

На сьогодні можна лише полегшити симптоми перебігу захворювання, тому актуальною є проблема пошуку засобів для специфічної профілактики і лікування хвороби, викликані COVID-19. Отже, лікування залежить від клінічного стану пацієнта і значну роль у цьому процесі відіграє лабораторна діагностика показників, так як їхній моніторинг допомагає лікарю своєчасно поставити правильний діагноз і почати адекватне лікування, щоб уникнути важких і небажаних ускладнень.

Швидке дослідження крові та серологічні дослідження клінічних зразків за допомогою сучасного обладнання дає змогу контролювати багато цікавих параметрів периферичної крові, деякі з яких вказують на зміни функцій органів і використовуються для діагностики ряду станів і захворювань [18]. Це підвищує ймовірність того, що дослідження зразків крові може надати інформацію про траєкторію захворювання та ризик супутніх захворювань для пацієнтів із COVID-19. На даному етапі боротьби з COVID-19 дуже важливим є визначення лабораторних предикторів, які дозволять стратифікувати ризик розвитку легких та важких форм захворювання, диференціювати низький та високий ризик смертності, що дозволить оптимізувати лікування [8].

У зв'язку з цим, **мета роботи** полягала в аналізі показників загального та біохімічного аналізу крові, які могли б бути маркерами клінічної детеріорації пацієнтів, госпіталізованих з приводу COVID.

Задачі дослідження:

1. За допомогою методів варіаційної статистики дослідити зміни гематологічних показників, а саме - рівень гемоглобіну, гематокриту, лейкоцитів, нейтрофілів і лімфоцитів, у пацієнтів, госпіталізованих з приводу COVID-19.

2. Дослідити зміни біохімічних показників плазми крові пацієнтів, хворих на COVID-19.

Об'єкт дослідження – пацієнти, госпіталізовані з приводу COVID-19.

Предмет дослідження – особливості гематологічних та біохімічних показників крові.

Методи дослідження: аналіз наукової літератури, систематизація та узагальнення даних, статистичні методи аналізу даних.

Апробація результатів дослідження: Результати кваліфікаційної (магістерської) роботи було оприлюднено на VII Міжнародній науковій конференції здобувачів вищої освіти, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології», м. Вінниця, 16-17

листопада 2022 р. Вінниця, 2022. Тези: Джура Т.А., Тарадіна Г.В. Пошук біохімічних та гематологічних маркерів оцінки стану хворих на COVID-19.

Структура та обсяг роботи. Загальний обсяг роботи становить 42 сторінки. Робота складається з вступу, 3 розділів, висновків та списку використаних джерел.



РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості інфекції COVID-19

Коронавірус (CoV) — велике сімейство одноланцюгових РНК-вірусів позитивного сенсу, які належать до ряду Nidovirales. Порядок включає родини Roniviridae, Arteriviridae та Coronaviridae [29]. Родина Coronaviridae підрозділяється на підродини Torovirinae і Coronavirinae [29, 20]. Coronavirinae далі підкласифікується на альфа-, бета-, гамма- та дельта-COV. Філогенетична кластеризація пояснює класифікацію цих підтипів вірусів. Довжина генома їх вірусної РНК коливається від 26 до 32 kb [29]. Їх можна виділити від різних видів тварин. До них відносяться птахи, худоба та ссавці, такі як верблюди, кажани, масковані пальмові циветти, миші, собаки та коти [20]. Широке поширення та інфекційність COV роблять його важливим патогеном. Гамма- та дельта-коронавіруси спричиняють хвороби птахів, але деякі з них також можуть інфікувати ссавців [40]. Коронавіруси людини належать до родів Alphacoronavirus (HCoV-229E та HCoV-NL63) та Betacoronavirus, філогенетично поділені на 3 лінії: А (HCoV-OC43 (представник BetaCoV1), HCoV-NKU1), В (SARS-CoV, SARSCoV-2) та С (MERS-CoV) [25, 30, 41]. Патогенні для людини підтипи CoV пов'язані з легкими клінічними симптомами. Однак коронавірус, пов'язаний з важким гострим респіраторним синдромом (SARS-CoV), і коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV) є двома помітними винятками.

CoV — це велике сімейство РНК-вірусів, які викликають захворювання дихальної, печінкової, нервової та шлунково-кишкової систем. Під електронним мікроскопом вони надають короноподібного вигляду завдяки наявності глікопротеїнів оболонки. CoV належать до родин Roniviridae, Arteriviridae та Coronaviridae [29].

Родину Coronaviridae можна класифікувати на чотири роди альфа-COV, бета-COV, дельта-COV і гамма-COV [4]. Крім того, бета-COV можна

розділити на 5 ліній. Характеристика генів допомогла визначити, що кажани та гризуни є джерелом генів альфа-COV і бета-COV. З іншого боку, види птахів вважаються генетичними джерелами дельта-COV і гамма-COV [20].

CoV є причиною 5-10% гострих респіраторних інфекцій. За оцінками, 2% населення вважаються здоровими носіями цих вірусів. Деякі поширені CoV людини включають HCoV-OC43, HCoV-NKU1, HCoV-229E та HCoV-NL63. У імунокомпетентних людей ці CoV клінічно проявляються самообмежувальними респіраторними інфекціями та застудою. У людей похилого віку та з ослабленим імунітетом вони можуть вражати нижні дихальні шляхи. Інші людські CoV, такі як MERS-CoV, SARS-CoV і SARS-CoV-2, мають легеневі та позалегеневі особливості [29].

SARS-CoV-2, відповідальний за пандемію COVID-19, є різновидом бета-COV. Дослідження геномної характеристики нового штаму вказали на 89% нуклеотидного збігу з CoVZXC21, схожим на SARS кажанів. Існує також 82% збіг нуклеотидів з вірусом SARS людини. Таким чином, ці висновки є основою для того, щоб новий штам отримав назву SARS-CoV-2. Він має повну геномну довжину від 29 891 до 29 903 нуклеотидів. Вірус чутливий до ультрафіолету та тепла [20]. SARS-CoV-2 зв'язується зі своїми клітинами-мішенями за допомогою ангіотензинперетворюючого ферменту 2 (ACE2), який експресується в легенях. Крім того, ці віруси можуть бути функціонально інактивовані за допомогою етанолу (60%), ефіру (75%) і хлорвмісних дезінфікуючих засобів.

Геном коронавірусів кодує синтез х структурних протеїнів: S (spike), N (nucleocapsid), M (membrane), E (envelope) та HE (hemagglutinin-esterase glycoprotein). HCoV-229E, HCoV-NL63, SARS-CoV, SARS-CoV-2 та MERS-CoV мають чотири гени, які кодують білки S, M, N та E, тоді як HCoV-OC43 та HCoV-NKU1 також містять п'ятий ген, що кодує білок HE [5].

Іншою важливою функцією S-білка є зв'язування вірусу з рецепторами клітин-мішеней та його проникнення в клітину. HE-білок теж формує грушоподібні виступи, але менші за розмірами, та виконує ті ж функції, що і

S-протеїн. E-білок — це невеликий інтегральний протеїн, який може олігомеризувати та створювати іонні канали, а також бере участь у циклі реплікації вірусу (збирання вірусу, вивільнення віріону) та його патогенезі.

M-білок — найбільш поширений структурний протеїн, який можна назвати організатором збирання вірусу, оскільки він взаємодіє з усіма структурними білками CoV. Ще однією властивістю M-протеїну, яка заслуговує уваги, є здатність індукувати апоптоз клітин [5, 26].

Структура коронавірусів обумовлює їх здатність протистояти впливу різних фізико-хімічних чинників та навколишнього середовища. CoVs зберігають інфекційну активність упродовж кількох років у ліофілізованому стані за температури $+4^{\circ}\text{C}$, а у замороженому стані — за температури -70°C .

Коронавіруси зберігаються у складі аерозолі впродовж 8–10 год, у питній воді — до 9 діб, у приміщенні за температури $0\text{--}18^{\circ}\text{C}$ — від 4 до 11 діб. Віруси термолабільні: за температури $+37^{\circ}\text{C}$ інактивуються за 10 год., у разі $+33^{\circ}\text{C}$ — за 16 год, а при 56°C — за 10 хв.

Ультрафіолетове випромінювання інактивує віруси за 15 хв, органічні розчинники та детергенти — впродовж декількох хвилин. Так, 62–71 % етанол, 0,5 % перекис водню або 0,1 % гіпохлорит натрію інактивують CoV протягом однієї хвилини. 2 % бензалконію хлорид та 0,02 % хлоргексидин диглюконат є менш ефективними. Для коронавірусів людини оптимальна зона рН 7,0–7,5. Зміна рН середовища в будь-який бік згубна для них [5, 32].

Коронавіруси людини (HCoV) за патогенністю умовно можна розділити на 2 групи. До високопатогенних відносяться SARS-CoV, MERS-CoV та SARSCoV-2. Віруси HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoVNL63, HCoV-NKU1 характеризуються низьким рівнем патогенності. Деякі автори їх також називають звичайними, ендемічними або сезонними CoVs людини [21, 25, 26, 30, 38].

Вони постійно циркулюють в природі. Зазвичай, коронавірусна інфекція виникає в зимово-весняний період з піком захворюваності в січні-лютому [33].

Коронавірусна інфекція переважно поширюється повітряно-крапельним та контактним шляхами передачі. Проте не можна виключати й інші шляхи передачі, зокрема фекально-оральний і повітряно-пиловий. Поширенню вірусу в навколишньому середовищі сприяють катаральні прояви, які характерні для ГРВІ. Джерелом збудника інфекції є хворі з клінічно вираженою або стертою формою захворювання [5, 22].

Коронавірусна інфекція звичайно уражає всі вікові групи, але переважно хворіють діти (до 10 років) та люди похилого віку [28, 33, 38].

1.2 Лабораторна діагностика COVID-19

Сучасні діагностичні методи підрозділяють на специфічні та неспецифічні. До специфічних методів відносять вірусологічний, бактеріологічний, аналіз наявних в організмі збудників, аналіз на антитіла і антигени. Неспецифічні методики включають аналіз крові, білкових фракцій крові, загальний аналіз сечі, печінкові проби, аналіз калу.

Лабораторні результати, характерні для COVID-19, включають підвищення протромбінового часу, ЛДГ (лактатдегідрогенази), D-димеру, АЛТ, С-реактивного білка (СРБ) і креатинкінази. На ранніх стадіях захворювання також можна відзначити виражене зниження лімфоцитів [40]. Пацієнти у відділенні інтенсивної терапії показали вищі рівні інтерлейкіну (IL) 2, IL-7, IL-10, GCSF (гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор), IP10 (інтерферон-гамма-індукований білок 10), MCP1 (моноцитарний хемотаксичний білок 1), MIP1A (альфа-запальний білок макрофагів) і TNF- α (фактор некрозу пухлини- α) [24]. Вони також показали інші відхилення від норми, що вказують на активацію коагуляції, клітинну імунну недостатність, ураження міокарда, нирок і печінки [40]. У критичних пацієнтів рівні амілази та D-димеру значно підвищені. Однак кількість лімфоцитів крові поступово знижувалася [20, 24]. Спільним для тих, хто не вижив, є підвищення рівня феритину, кількості нейтрофілів, D-димеру, сечовини крові та креатиніну. Підвищення рівня прокальцитоніну не є ознакою COVID-19. Тому

підвищений рівень прокальцитоніну може свідчити про альтернативний діагноз, наприклад бактеріальну пневмонію. Рівні СРБ прямо корелюють із тяжкістю та прогресуванням захворювання [29, 23]. Відповідно до отриманих результатів, визначають лабораторні методи, необхідні для діагностування COVID-19.

1.2.1 Показники та діагностичне значення загального та біохімічного аналізів крові при COVID

Пацієнтам з COVID призначаються наступні лабораторні дослідження у разі госпіталізації з приводу середньоважкого, важкого та вкрай важкого перебігу хвороби:

- загальний (клінічний) аналіз крові з визначенням рівня еритроцитів, гематокриту, лейкоцитів, тромбоцитів, лейкоцитарної формули;
- біохімічний аналіз крові (альбумін, сечовина, креатинін, електроліти, глюкоза, печінкові ферменти (аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза), білірубін, лактат, лактатдегідрогеназа, тропонін, феритин, прокальцитонін, мозковий натрій-уретичний пептид NT-proBNP/BNP). Біохімічний аналіз крові не дає будь-якої специфічної інформації, але виявлені відхилення можуть вказувати на наявність органної дисфункції, декомпенсацію супутніх захворювань та розвиток ускладнень, мають певне прогностичне значення, впливають на вибір лікарських засобів та/або режим їх дозування;
- дослідження рівня С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові. Рівень СРБ корелює з важкістю перебігу, поширеністю запальної інфільтрації та прогнозом при пневмонії. Його підвищення корелює з об'ємом ураження легеневої тканини і є основою початку протизапальної терапії.
- прокальцитонін при коронавірусній інфекції з ураженням респіраторних відділів легень перебуває у межах референсних значень. Підвищення прокальцитоніну свідчить про приєднання бактеріальної інфекції

та корелює з важкістю перебігу, поширеністю запальної інфільтрації та прогнозом при бактеріальних ускладненнях.

– пульсоксиметрію з вимірюванням SpO_2 для виявлення дихальної недостатності та оцінки виразності гіпоксемії. Пульсоксиметрія є скринінговим методом, що дозволяє виявляти пацієнтів з гіпоксемією, які потребують респіраторної підтримки та оцінювати її ефективність;

– пацієнтам з ознаками гострої дихальної недостатності (ГДН) (SpO_2 менше 90% за даними пульсоксиметрії) рекомендується дослідження газів артеріальної крові з визначенням PaO_2 , $PaCO_2$, рН, бікарбонатів, лактату;

– пацієнтам з ознаками ГДН рекомендується виконання коагулограми з визначенням показники системи гемостазу: протромбінового часу, міжнародного нормалізованого відношення та активованого часткового тромбoplastинового часу, фібриноген.

Дані літератури [8, 19, 27, 36, 35] свідчать, що у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 відзначається схожий шаблон патологічних змін гематологічних, біохімічних, запальних та імунних біомаркерів порівняно з пацієнтами з помірним або легким перебігом захворювання (таблиця 1.1). Крім цього, результати деяких досліджень також свідчать, що у пацієнтів з ускладненим перебігом COVID-19 значно підвищений рівень гомоцистеїну.

Таблиця 1.1 - Патологічні зміни в біомаркерах у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 та нові потенційні біомаркери [14]

Біомаркери у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19							
Гематологічні		Біохімічні		Біомолекули коагуляції		Нові біомаркери	
↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
1	2	3	4	5	6	7	8
Лейкоцити	Лімфоцити	АлАТ	Альбумін	ПЧ	ШОЕ	Гомоцистеїн	Ангіотензин (1–7)
Нейтрофіли	Тромбоцити	АсАТ		Д-димер	СРБ	Ангіотензин II	Ангіотензин (1–9)

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5	6	7	8
	Еозинофіли	Загальний білірубін			Феритин у сироватці крові	ІНЛ	Аламандин
	Т-клітини	Азот сечовини у крові			ПКТ	ІМЛ	
	В-клітини	КК			ІЛ-2		
	НК	ЛДГ			ІЛ-6		
		Міоглобін			ІЛ-8		
		КК МВ			ІЛ-10		
		Кардіальний тропонін І					
		Креатинін					

1.2.2. Гематологічні зміни

Найбільш поширені гематологічні зміни включають лімфоцитопенію, нейтрофілію, легку тромбоцитопенію (35%) або рідше тромбоцитоз [8, 19, 27]. Про наявність атипичних, реактивних лімфоцитів є лише поодинокі повідомлення [27].

Лімфоцитопенія – це зниження кількості лімфоцитів в абсолютних значеннях у загальному аналізі крові нижче $1,0 \times 10^9/\text{л}$. Лімфоцити грають вирішальну роль у підтримці імунного гомеостазу організму та беруть участь у відповіді на дію зовнішніх патогенних факторів. В основі можливості забезпечити ефективну стратегію лікування COVID-19 лежить розуміння механізмів зниження рівня лімфоцитів у крові. Було запропоновано чотири потенційні механізми, що ведуть до дефіциту лімфоцитів:

1. Вірус може безпосередньо впливати на лімфоцити, що призводить до їхньої загибелі;
2. Лімфоцити експресують коронавірусний рецептор АПФ-2 (ангіотензин-перетворюючий фермент-2), який є мішенню вірусу;
3. Вірус може безпосередньо руйнувати лімфатичні органи;

4. Суттєве зниження лімфоцитів пов'язане з дисфункцією лімфоцитів при прямому пошкодженні вірусом таких органів як тимус і селезінка. Фундаментальні дослідження підтвердили, що фактор некрозу альфа-пухлини (TNF α), інтерлейкін-6 (IL-6) та інші прозапальні цитокіни можуть індукувати дефіцит лімфоцитів [8]. Інгібування лімфоцитів можливе під впливом метаболічних молекул при гіперлактичній ацидемії, пов'язаній із підвищеним рівнем лактату, що призводить до придушення проліферації лімфоцитів. Тому показник лімфоцитопенії є надійним і ефективним маркером тяжкості перебігу COVID-19.

У дітей лімфопенія зустрічається значно рідше. В одному з мета-аналізів [3] повідомляється про виявлення лімфоцитопенії тільки у 3% дітей на відміну від інших подібних вірусних інфекцій, таких як SARS, при яких лімфоцитопенія була значно більш поширеним явищем у дітей.

Лейкоцитоз, незалежно від того, чи він представляє нейтрофілію, лімфоцитоз або обидва разом відзначається у небагатьох пацієнтів, інфікованих SARS-CoV-2. Так, лейкоцитоз був виявлений у 11,4% пацієнтів із тяжкою формою захворювання порівняно з 4,8% пацієнтами з легкою або середньою формою [8, 19, 36].

Дані щодо нейтрофілії є неповними. Проте отримані результати свідчать про те, що нейтрофілія є виразом «цитокінового шторму» та гіперзапального стану, які відіграють важливу роль у патогенезі COVID-19 [8, 19]. Описано циркулюючі гранулоцити з цитоплазматичними та ядерними морфологічними аномаліями. Вони зазвичай передують збільшенню реактивних лімфоцитів. Нейтрофілія може вказувати на накладання бактеріальної інфекції.

Тромбоцитопенія є показником тяжкого захворювання у пацієнтів з COVID-19, про що свідчить недавній огляд доступних даних, що рецензуються. Метааналіз дев'яти досліджень показав, що тромбоцитопенія відзначалася у більшості пацієнтів. У пацієнтів з тяжкою формою тромбоцитопенія виявляється у 57,7% випадків, проти 31,6% з мені значними симптомами [35]. Крім того, розгорнутий загальний аналіз крові, при якому

визначається середній об'єм тромбоцитів та кількість ретикулярних тромбоцитів може бути корисним при стратифікації ризику та прийнятті клінічного рішення.

NLR – коефіцієнт співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів як індикатор прогнозу COVID-19. Дослідження в Китаї в період боротьби з коронавірусом показали, що граничне значення $NLR = 3,13$ (чутливість – 0,87, специфічність – 0,71). Рекомендації: якщо $NLR > 3,13$ (вік > 50 років), то пацієнти повинні бути переведені в палату інтенсивної терапії; - якщо $NLR < 3,13$ (вік < 50 років), то пацієнти повинні самоізолюватися вдома або в стаціонарі лікарні. NLR вважається важливим параметром для прогнозування та управління ризиками за COVID-19 [2].

1.2.3. Біохімічні параметри

Біохімічний моніторинг пацієнтів з COVID-19 за допомогою діагностичних досліджень *in vitro* має вирішальне значення для оцінки тяжкості та прогресування захворювання та служить для моніторингу при терапевтичному втручанні. До таких тестів відносяться лактатдегідрогеназа (ЛДГ), аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ), азот сечовини, креатинін, креатинкіназа, загальний білірубін, міоглобін, тропоніни, С-реактивний білок, ферітин [8, 1].

Лактатдегідрогеназа являє собою фермент, що експресується майже у всіх клітинах організму людини, включаючи клітини серця, печінки, м'язи, легені, нирки та каталізує перетворення пірувату на лактат. Підвищений рівень ЛДГ у сироватці може бути виявлений після пошкодження будь-якого з багатьох типів клітин, які зазвичай експресують ЛД.

Аланінамінотрансфераза є ферментом, який продукується гепатоцитами і підвищується при захворюванні печінки. АЛТ, як і багато інших біохімічних маркерів збільшена у пацієнтів з тяжкою формою COVID-19. Вимірювання активності ферменту може бути корисним при спостереженні за пацієнтами, що надійшли у відділення інтенсивної терапії.

Підвищення рівня білірубину сироватки відзначається при ряді захворювань, пов'язаних з печінкою та жовчовивідною системою. Відзначено збільшені рівні білірубину у пацієнтів, які надійшли у відділення інтенсивної терапії порівняно з пацієнтами, які мають менш тяжкі форми.

Креатинін сироватки є важливим показником функції нирок. Це продукт постійного метаболізму білка в печінці, який виводиться нирками. Підвищення рівня креатиніну в сироватці свідчить про зниження швидкості клубочкової фільтрації. Підвищений креатинін частіше виявляється у пацієнтів із хронічною нирковою недостатністю у поєднанні із збільшенням азоту сечовини у сироватці.

Альбумін відноситься до водорозчинних білків. Зниження альбуміну в сироватці пов'язане з різними захворюваннями, такими як недоїдання, опіки, сепсис, пошкодження нирок. У пацієнтів з COVID-19 рівень сироваткового альбуміну свідчить про поганий прогноз.

Підвищені рівні у сироватці специфічних для серця тропонінів (тропонін І та тропонін Т) є основними індикаторами для діагностики інфаркту міокарда та гострого коронарного синдрому. Зараз відомо, що тропоніни є значним показником при тяжкій формі у пацієнтів із COVID-19. У пацієнтів з гіпертонією та іншими супутніми серцево-судинними захворюваннями необхідно проводити дослідження рівнів тропоніну для оцінки пошкодження міокарда [34].

Прокальцитонін (ПКТ) – це поліпептид, який є неактивним попередником кальцитоніну. При важких бактеріальних інфекціях і сепсисі масивне утворення ендотоксинів, збільшення рівнів прозапальних цитокінів ІЛ-6 і TNF- α призводить до збільшення синтезу ПКТ не тільки в щитоподібній залозі, а й екстратіреоїдно: в першу чергу, в лейкоцитах, моноцитах, а також в нейроендокринних клітинах легень, кишечника і печінки. Все це призводить до швидкого і різкого наростання рівня ПКТ (вже через 6-12 годин після генералізації процесу) на тлі збереження рівня кальцитоніну. ПКТ може бути специфічним і надзвичайно чутливим маркером, який дозволяє провести

диференційну діагностику між бактеріальною інфекцією та вірусними, грибковими, паразитарними захворюваннями. З лабораторних показників рівень ПКТ в крові є найбільш інформативним [6]. Якщо він нормальний, показання до антибіотикотерапії, як правило, відсутні. Менш інформативними є такі показники як лейкоцитоз та зсув лейкоцитарної формули вліво. Оцінюючи роль ПКТ у вирішенні питання про призначення антибактеріальної терапії хворим на COVID-19, необхідно враховувати, що рівень ПКТ підвищується тільки при генералізації бактеріальної інфекції (сепсисі) і відображає її ступінь, локальні вогнища не призводять до підвищення рівня маркера. Тому діагностичне значення має не тільки наявність підвищення, але і ступінь підвищення, і динаміка рівня ПКТ. Період напіврозпаду ПКТ складає 25-30 годин, що дозволяє використовувати його в ще й в якості маркера ефективності антибіотикотерапії, так як після успішного проведення антибіотикотерапії рівень ПКТ в крові швидко знижується (на 30-50% за добу). З іншого боку, при зберігається підвищенні рівня ПКТ більше 4 діб необхідна корекція терапії.

Підвищення активності ЛДГ, сироваткової концентрації СРБ, D-димеру та лімфопенії при COVID-19 асоційовані з високим ризиком смерті [12]. Підвищення маркерів клітинної смерті – печінкових ферментів, ЛДГ, D-димеру, тропоніну I – свідчить про пошкодження печінки, нирок, кардіоваскулярної системи, про розвиток тромбозу судин легень та легеневої гіпертензії.

1.3. Маркери запалення. «Цитокиновий шторм»

Запалення, пригнічення імунної системи та активація цитокінів відіграють ключову роль у перебігу COVID-19. На ранніх стадіях коронавірусної інфекції відбувається активація епітеліальних та дендритних клітин, які експресують прозапальні цитокіни та хемокіни, включаючи IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- α/β , фактор некрозу пухлини (TNF), хемокіни (CCL2, CCL3, CCL5), IP-10 тощо, які перебувають під контролем імунної системи. У

більшості випадків цей процес запобігає подальшому розвитку інфекції. Однак іноді виникає дисфункціональна імунна відповідь, яка може спричинити тяжку системну патологію. Це відбувається при посиленні запальної відповіді, що призводить до апоптозу клітин або некрозу з подальшим збільшенням проникності кровоносних судин та накопиченням макрофагів, моноцитів та нейтрофілів в альвеолах легень.

Синдром вивільнення цитокінів (CSR), також відомий під назвою «цитокіновий шторм», є одним із явищ, що відіграє істотну роль при COVID-19 [8]. CRS був описаний як гострий системний запальний синдром або надмірна імунна відповідь, що характеризується лихоманкою та поліорганною дисфункцією. CRS-подібний синдром, який розвивається після тяжкої вірусної інфекції, часто називають «цитокіновим штормом», а не CRS. Патологія «цитокінового шторму» до кінця не вивчена, проте відомо, що віруси зазвичай атакують клітини респіраторного епітелію, які запускають цитокінову відповідь. При цьому рецептори імунних клітин розпізнають вірус і вивільняють прозапальні цитокіни, такі як гамаінтерферон (INF- γ), фактор некрозу пухлини (TNF), інтерлейкіни (IL) та хемокіни. INF- γ активує макрофаги, які продукують IL-6, TNF- α та IL-10 [16]. Макрофаги є основними клітинами, що рекрутуються спочатку в альвеолярний простір у відповідь на вірусну інфекцію. Вони збільшують вироблення цитокінів і залучають додаткові імунні клітини у уражену область (CD4 та CD8). Порівняно з неінфікованими пацієнтами, помірні форми COVID19 демонструють збільшення IL-6 та зниження загальної кількості Т-лімфоцитів, особливо CD4+ та CD8+ Т-клітин. Тяжкі форми COVID-19 додатково збільшують продукування IL-6, IL-2R, IL-10 і TNF- α , тоді як кількість Т-лімфоцитів, особливо CD4+ та CD8+, а також INF- γ істотно знижуються. Рівень «цитокінового шторму» та Т-клітинна лімфопенія пов'язані з пошкодженням легень, дихальною недостатністю та несприятливим результатом [8, 16].

Як тільки відбувається очищення організму від вірусу, імунна система припиняє свою діяльність. Однак при «цитокіновому штормі» цей процес не

завершується як завжди. Запальні цитокіни проникають у кровообіг, викликаючи системні цитокінові бурі та, зрештою, поліорганну дисфункцію. У цьому випадку IL-6 впливає на процес згортання крові, викликаючи ДВС-синдром та кардіоміопатію, INF- γ може викликати лихоманку, озноб, головний біль, запаморочення та втому, тоді як TNF- α призводить до лихоманки, нездужання, кардіоміопатії та пошкодження клітин. Генетичні особливості організму можуть бути одним із факторів, які пояснюють чому у деяких людей розвиваються лише легкі форми, тоді як у інших тяжкі.

Нерегульована та надмірна імунна відповідь потенційно може призвести до пошкодження легень та зниження виживання. При інфікуванні SARS-CoV-2 характерні наступні зміни показників імунної системи: - IL-6, IL-10 та TNF- α зростають під час хвороби та знижуються під час одужання; - пацієнти, які потребують госпіталізації, мають значно вищі рівні IL-6, IL-10 та TNF- α та знижену кількість CD4 та CD8 T-клітин; - рівень IL-6, IL-10 та фактору некрозу пухлини- α назад корелює з кількістю CD4 та CD8 асоційованих з лімфопенією.

Існує думка, що застосування індукторів інтерферону та інтерферон-вмісних препаратів, досить часто призначаються в терапії ГРВІ та грипу, пов'язані з небезпекою розвитку «цитокінового шторму», проте серйозних клінічних досліджень з даного питання на даний момент проведено не було [16]. Доведеною дією щодо індукції «цитокінового шторму» мають деякі протипухлинні препарати моноклональних антитіл (наприклад, Ритуксимаб, Ніволумаб та ін.) та імунні препарати, також використовувані у терапії злоякісних новоутворень.

Аби знизити летальності від цитокінового шторму, використовують імуносупресію, тобто препарати, які пригнічують імунітет. Це приблизно та ж терапія, яку отримують люди з пересадженими «чужими» органами. Тобто, це можуть бути ліки, що блокують інтерлейкіни – білки-медіатори клітинних взаємодій, які регулюють розвиток та рух клітин під час імунної відповіді. Наприклад, Tocilizumab. Або ж кортикостероїди – препарати, що борються із

запаленням і призупиняють імунну відповідь, наприклад, дексаметазон, а також нестероїдні протизапальні препарати, приміром, німесулід.

Блокування взаємодії між імунними клітинами, а також циркуляції антигенів до власних клітин є ключовою ланкою в розірванні «порочного кола» запалення при тяжкому перебігу коронавірусної хвороби. Застосування внутрішнього імуноглобуліну також зменшує загальну смертність пацієнтів із сепсисом. Діапазон терапевтичної дози препарату включає сумарно 1,5-2,0 г/кг протягом 4-5 днів [3].

В Україні внутрішньовенний імуноглобулін представлений препаратом Біовен (виробництво ТОВ «Біофарма Плазма»), який активно застосовується в комплексній терапії у пацієнтів із пневмонією, що викликана коронавірусною інфекцією COVID-19 (протокол «Надання медичної допомоги для лікування коронавірусної хвороби (COVID-19)», затверджений наказом МОЗ України від 02.04.2020 р. № 762), а також у якості замісної імунотерапії при лікуванні первинних та вторинних імунодефіцитних станів. Біовен є нативним імуноглобуліном G, який зберігає всі біологічні властивості: активацію комплементу, ефекторну та опсонофагоцитарну функції. Препарат також володіє неспецифічною активністю, що проявляється підвищенням резистентності організму.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено біохімічні і гематологічні показники крові 100 пацієнтів, які були поділені на 2 категорії по 50 осіб: перша група - з пневмонією, із підтвердженим діагнозом COVID-19; друга група – пацієнти, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні.

Лабораторні дослідження проводились за методиками які закріплені в клінічно діагностичній лабораторії в КНП «ВОСКДРЗН ВОР». Дослідження проводили на момент госпіталізації, під час та після лікування.

Серед гематологічних показників досліджували рівень гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, нейтрофілів (паличкоядерних, сегментоядерних), еозинофілів, моноцитів, лімфоцитів, швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), нейтрофілів (паличкоядерних, сегментоядерних), еозинофілів, лімфоцитів, моноцитів.

У якості біохімічних показників досліджували активність печінкових ферментів (аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), Лужна фосфатаза (ЛФ) гамма-глутаматтрансфераза (ГГТ), Лактатдегідрогеназа (ЛДГ)), вміст альбуміну, креатиніну, С-реактивного білку (СРБ), Антистрептолізину-О (АСЛ-О); загального білірубіну, загального білку, сечовини.

Для спостереження за системою згортання крові і тромбоемболічними ускладненнями, що є проявою ускладнень у багатьох хворих на COVID-19, пацієнтам призначалась коагулограма. Вимірювались наступні показники: АЧТВ – час, за який кров здатна згортатись (продовжуваність формування згустку). Будь яке відхилення від норми може вказувати на диссіміновану внутрішньосудинну коагуляцію; фібріноген – специфічний білок, що виробляється в печінці. З нього утворюються нитки фібрину, які приймають участь у процесі згортання крові і утворенні тромбу;

тромбіновий час (ТЧ) – період, впродовж якого фібриноген перетворюється в нитки фібрину;

розчинні комплекси мономерів фібрину (РКМФ).

Обробку та аналіз отриманих даних виконували стандартними методами варіаційної статистики у програмному середовищі R, багатовимірний аналіз проводили за допомогою програми Statistica 10 (Trial версія). Показники представляли у $x \pm m$, де x - середнє значення показника, m – стандартне відхилення.

Для перевірки відповідності отриманих вибірок нормальному закону розподілу проводився їх аналіз за допомогою методу Шапіро-Уїлки, також були оцінені асиметрія і ексцес. За допомогою цього критерію Шапіро-Уїлки перевіряється нульова гіпотеза, яка полягає в тому, що дані розподілені нормально. Якщо за критерієм Шапіро-Уїлки $P\text{-value} > 0,05$, то ймовірність того, що гіпотеза вірна, нульова. Якщо рівень значимості менше 5 % (0,05), є підстава відкинути нульову гіпотезу про те, що дані розподілені нормально.

Результати перевірки на нормальний розподіл показників, що досліджувались у пацієнтів з діагнозом COVID (nrm-covid,) та пацієнтів, які знаходились на профілактичному лікуванні (nrm-hls), наведено в таблиці.

Таблиця 2.1 - Результати перевірки параметрів, що досліджувались, на відповідність нормальному розподілу за критерієм Шапіро-Уїлки

Показники	Кількість пацієнтів		Рівень значимості	
	n_covid	n_hls	nrm_covid	nrm_hls
1	2	3	4	5
Еритроцити	43	50	0,81	3,09E-04
Лейкоцити	50	50	7,24E-07	2,37E-04
ШОЕ	48	50	0,14	7,78E-05
Паличкоядерні нейтрофіли	46	48	5,45E-05	8,44E-08
Сегментоядерні нейтрофіли	46	48	0,78	9,79E-03
Еозинофіли	46	48	6,68E-08	8,46E-09
Лімфоцити	46	48	0,78	0,02

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5
Моноцити	46	48	0,41	0,41
Білірубін	43	42	1,03E-06	2,18E-07
АЛТ	50	50	2,87E-13	2,45E-02
АСТ	50	50	1,40E-11	9,08E-08
ГГТ	43	28	4,03E-08	2,89E-07
Лужна фосфотаза	36	19	0,12	3,13E-05
Сечовина	33	43	8,05E-03	0,03

Оскільки серед пар параметрів немає випадків, коли обидві вибірки - хворі на COVID 19 (nrm_covid) та пацієнти, які знаходились на профілактичному стаціонарному лікуванні (nrm_hls) розподілені за нормальним законом, при подальшій статистичній обробці експериментальних даних використовувались непараметричні методи.

Для виявлення відмінностей між середніми значеннями досліджуваних нами параметрів був використаний критерій Манна-Уїтні для незалежних вибірок, що є непараметричним критерієм для даних, розподіл яких відрізняється від нормального. [17, 7].

Для угруповання параметрів, які виявили достовірну відмінність для різних груп пацієнтів – хворих на COVID 19 та пацієнтів, які знаходились на профілактичному лікуванні, використовували кластерний аналіз методом k-середніх.

Кластерний аналіз застосовується для класифікації різних об'єктів у групи таким, що подібність між двома об'єктами є максимальною, якщо вони належать до однієї групи – кластеру.

Головний принцип групування в кластерному аналізі – це відстань між об'єктами на діаграмі розсіювання, яку можна розраховувати різними методами. Один із найбільш поширених методів – це евклідова відстань, яка на площині розраховується для двох точок i та j з відомими координатами (x, y) за формулою:

$$d = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2} . \quad (2.1)$$

Тут i та j – об'єкти, кожному з яких властиві два досліджуваних параметри – x та y . В загальному випадку, коли досліджуваних параметрів об'єктів більше двох, евклідова відстань – це квадратний корінь із суми квадратів різниць між усіма координатами векторів, що визначають кожен об'єкт.

Коли для обчислення відстані використовуються дві або більше змінних, домінуватиме змінна з більшою величиною. Щоб уникнути домінування параметрів з більшими величинами, було проведено стандартизацію всіх досліджуваних параметрів. Стандартизацію можна проводити за допомогою різних перетворень; в роботі використовували одну з методик стандартизації. Для цього від значень кожного параметру віднімали його середнє і ділили на стандартне відхилення. Стандартизовані параметри піддавали кластеризації методом k -середніх.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці 3.1 наведена описова статистика для гематологічних показників крові досліджених пацієнтів. На рис. 3.1 показані зміни досліджених показників у двох групах хворих. Достовірність відмінностей показників у двох групах пацієнтів визначали за допомогою t-тесту для незалежних вибірок (критерій Манна-Уїтні). Результати розрахунків показані у таблиці 3.2.

Таблиця 3.1 - Описова статистика для гематологічних показників крові (covid - госпіталізовані з приводу COVID, hls – пацієнти, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні)

Показники	Hls					covid				
	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум
Гемоглобін	50	128,04	19,71	45	161	50	124,5	16,8	87	160
Еритроцити	50	4,35	0,567	2,01	5,31	43	4,34	0,56	3,23	5,6
Тромбоцити	7	228,00	65,72	141	357	29	241,7	57,2	152	367
Лейкоцити	50	6,35	2,221	3	15,5	50	8,41	4,26	3	29,2
ШОЕ	50	16,86	13,49	1	60	48	26,02	14,7	2	56
Паличкоядерні нейтрофіли	48	2,56	2,072	1	11	46	2,80	2,03	0	8
Сегментоядерні нейтрофіли	48	55,90	11,22	25	80	46	64,65	11,8	30	92
Еозинофіли	48	2,60	2,304	0	15	46	2,04	2,85	0	12
Лімфоцити	48	32,58	11,44	10	66	46	23,76	9,87	4	48
Моноцити	48	6,27	2,901	1	14	46	6,39	2,74	1	12

Таблиця 3.2. Результати тесту Манна-Уїтні для двох незалежних вибірок для гематологічних показників.

Показники	P
Гемоглобін	0,226
Еритроцити	0,574
Лейкоцити	0,003
ШОЕ	0,001
Паличкоядерні нейтрофіли	0,468
Сегментоядерні нейтрофіли	0,000
Еозинофіли	0,007
Лімфоцити	0,000
Моноцити	0,817

З отриманих результатів аналізу видно, що у досліджуваних пацієнтів достовірно змінюються рівні лейкоцитів, нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитів та ШОЕ.

На рис. 3.1 показані зміни досліджених показників у двох групах хворих для параметрів, достовірність відмінностей яких підтверджено статистичними тестами.

Чисельними дослідженнями показано, що важливими лабораторними показниками, які змінюються у пацієнтів з COVID-19 є лімфоцитопенія, нейтрофілія, тромбоцитопенія або рідше тромбоцитоз.

Виявлено, що кількість нейтрофілів була значно вищою в групі з підтвердженим діагнозом COVID-19, ніж у тих пацієнтів, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні ($p < 0,05$). Середнє значення рівня нейтрофілів в першій групі (covid) – $64,65 \pm 11,68$, у другій (hls) – $55 \pm 11,22$.

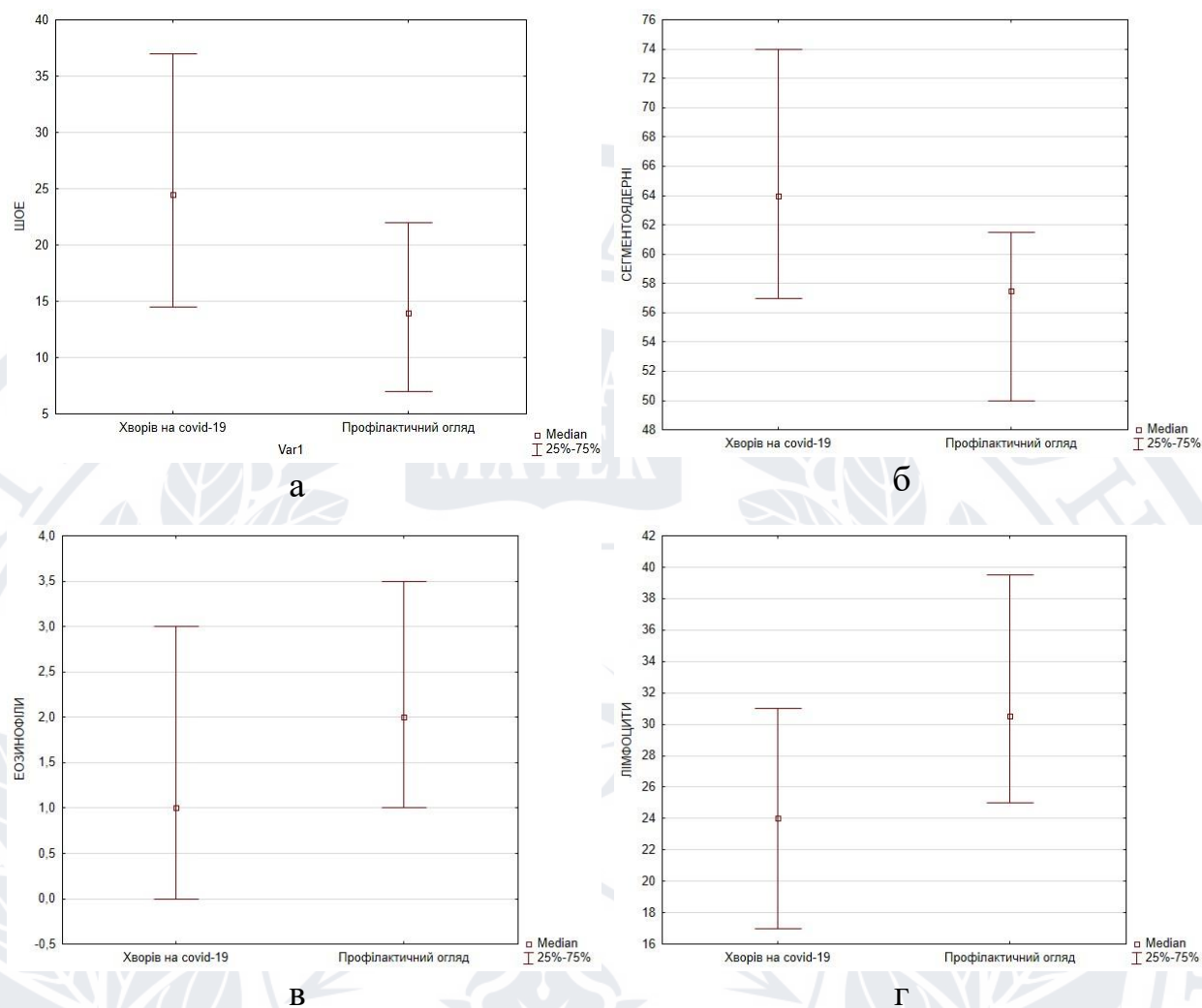


Рис. 3.1. Гематологічні показники крові у пацієнтів, хворих на COVID-19 і пацієнтів, які знаходились на профілактичному стаціонарному лікуванні. а- ШОЕ, б - нейтрофілів, в - еозинофілів, г - лімфоцитів

Лейкоцити крові забезпечують розпізнавання і усунення чужорідних компонентів в організмі. При дослідженні було визначено різницю між групами: лейкоцити були вищі у пацієнтів які хворіли на на COVID-19 та нижче у пацієнтів, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні ($p < 0,05$). Середнє значення рівня лейкоцитів в першій групі (covid) – $8,41 \pm 4,26$ у другій (hls) – $6,35 \pm 2,22$.

ШОЕ – (швидкість осідання еритроцитів) є одним із головних показників запального процесу в організмі людини. Дослідження показало, що у групі з діагнозом COVID-19 показник вищий, ніж у групі, які знаходилися

на профілактичному стаціонарному лікуванні ($p < 0,05$). Середнє значення рівня ШОЕ в першій групі (covid) – $26,02 \pm 14,70$, у другій (hls) – $16,86 \pm 13,49$.

Еозинофіли – мають 0,5 - 5 % від усіх лейкоцитів крові. Хемотаксис еозинофілів та розпізнавання паразитів здійснюється завдяки чинникам, продукованими клітинами запалення продуктів життєдіяльності паразитів. Також еозинофілам належить важлива роль у алергічних реакціях. Середнє значення рівня еозинофілів в першій групі (covid) – $26,02 \pm 14,70$, у другій (hls) – $16,86 \pm 13,49$.

Лімфоцити – становлять 20-40 % лімфоцитів належать до агранулоцитів (не містять гранул у цитоплазмі). Підвищений вміст лімфоцитів часто спостерігається на гострі вірусні інфекції.

В цілому зроблено висновок при дослідженні, що у більшості хворих на COVID-19 зі збільшенням важкості захворювання значно зростає кількість лейкоцитів, а кількість лімфоцитів зменшується. Середнє значення рівня лімфоцитів в першій групі (covid) – $6,39 \pm 2,74$, у другій (hls) – $6,27 \pm 2,90$.

Отримані дані свідчать про розвиток інфекційного процесу, який супроводжується запаленням.

За нашими даними, у групі яка знаходилася на профілактичному стаціонарному лікуванні рівень вище ніж у групі з підтвердженим діагнозом COVID-19. Середнє значення рівня тромбоцити в першій групі (covid) – $241,72 \pm 57,18$, у другій (hls) – $228, \pm 65,72$, однак статистичні тести показали відсутність значущої різниці в кількості тромбоцитів двох досліджуваних груп ($p > 0,05$).

В нашому дослідженні не було виявлено достовірної різниці у наступних показниках двох груп пацієнтів: еритроцити, гемоглобін, моноцити ($p > 0,05$ за усіма показниками).

Біохімічний моніторинг пацієнтів з COVID-19 за допомогою діагностичних досліджень *in vitro* має вирішальне значення для оцінки тяжкості і прогресування захворювання і служить для моніторингу при терапевтичному втручанні. До таких тестів відносяться дослідження вмісту

лактатдегідрогенази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, азоту сечовини, креатиніну, креатинкінази, загального білірубіну, міоглобіну, тропоніну, С-реактивного білку, феритину, альбуміну, калію, лактату.

У таблиці 3.3 наведена описова статистика для біохімічних показників крові досліджених пацієнтів. У роботі досліджували зміну активність печінкових ферментів (аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази), вміст альбуміну, креатиніну, білірубіну, глюкози, вищих жирних кислот у двох групах пацієнтів з різною важкістю захворювання на COVID-19. На рис. 3.2 і 3.3. показані зміни досліджених показників у двох групах хворих. Достовірність відмінностей показників у двох групах пацієнтів визначали за допомогою t-тесту для незалежних вибірок (критерій Манна-Уїтні), у зв'язку з ненормальним розподілом даних. Результати розрахунків показані у таблиці 3.4.

Таблиця 3.3 - Описова статистика для біохімічних показників крові (covid - госпіталізовані з приводу COVID, hls – пацієнти, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні)

Показники	Hls					Covid				
	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Білірубін	43	17,70	15,46	5	101	43	14,74	7,04	7	43,4
АЛТ	50	47,70	21,76	12	102	50	78,70	99,99	17	732
АСТ	50	46,76	24,75	13	154	50	56,80	62,17	12	334
ГГТ	28	34,50	31,90	12	169	43	43,14	34,54	13	188
Лужна фосфатаза	19	146,58	76,22	82	423	36	128,0	36,92	66	203
ЛДГ						26	457,9	212,0	179	1051
Сечовина	43	5,13	1,79	1,5	10,9	33	6,18	2,95	2,3	16

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Креатинін	44	72,98	19,01	43	148	34	76,21	16,53	46	115
Глюкоза	46	6,11	1,84	3,16	13,59	50	8,22	13,61	3,78	101
Загальний білок	28	67,10	8,25	46,8	79	44	62,77	7,06	43,7	78,9
Альбумін	22	37,54	7,70	23,4	46,8	45	35,82	5,14	25,1	49,4
СРБ	19	61,89	72,03		192	43	81,49	94,94		192
АСЛО	15	106,67	166,76		400	31	150,0	210,95		800
Холістірін	40	4,86	1,34	2,22	7,69	46	5,38	1,45	3,08	9,34
Тригліцериди	27	1,69	0,82	0,63	3,95	15	2,82	1,99	1,03	7,66
В-ліпопротеїди	22	520,18	195,7	285	930	8	656,5	213,48	384	971
Лактат						14	3,80	1,89	1,6	8,9

Таблиця 3.4 - Результати тесту Манна-Уїтні для двох незалежних вибірок біохімічних показників.

Показник	p
Білірубін	0,293
АЛТ	0,001
АСТ	0,539
ГГТ	0,015
Лужна фосфатаза	0,608
ЛДГ	0,115
Сечовина	0,331
Креатинін	0,569
Глюкоза	0,005
Загальний білок	0,153
Альбумін	0,668
СРБ	0,539
АСЛО	0,171
Холістірін	0,079
Тригліцериди	0,105

Відповідно до отриманих результатів у групі хворих встановили достовірну зміну вмісту:

Глюкози в першій групі (covid) – $8,22 \pm 13,61$ у другій (hls) – $6,11 \pm 1,84$
GGT- в крові досліджених груп пацієнтів підвищується в першій групі (covid) – $43,14 \pm 34,54$ у другій (hls) – $34,50 \pm 31,90$;
ALT- в крові досліджених груп пацієнтів підвищується в першій групі (covid) – $78,70 \pm 99,99$ у другій (hls) – $47,70 \pm 21,76$;
AST- в крові досліджених груп пацієнтів підвищується в першій групі (covid) – $56,80 \pm 62,17$ у другій (hls) – $46,76 \pm 24,75$.
Загальний білок в першій групі (covid) – $62,77 \pm 7,06$ у другій (hls) – $67,10 \pm 8,25$.

Креатинін – це продукт розпаду речовини креатину, який бере участь у утворенні енергії у м'язовій тканині. Він виводиться з організму через нирки шляхом клубочкової фільтрації і не реабсорбується, тобто не всмоктується, як інші речовини. Тому його використовують для оцінки фільтраційної здатності нирок.

Нирки є органами з високою вразливістю при COVID-19 з урахуванням експресії ангіотензинперетворюючого ферменту 2 та дипептидилпептидази-4 [15]. Гостре ниркове пошкодження було визначено як часте ускладнення у пацієнтів з COVID-19, асоційоване з респіраторною недостатністю та поганим прогнозом. Показано, що креатинін і креатинфосфокіназа були підвищені у 13% пацієнтів з COVID-19 [39].

Аланін- та аспартатамінотрансферази є ферментами, які продукується гепатоцитами і підвищується при захворюванні печінки. Гамма-глутамілтранспептидаза (GGT) - це фермент, який знаходиться в клітинах багатьох тканин, тому його рівень у крові підвищується при пошкодженні різних органів, але найбільшою мірою - печінки та жовчних проток.

ALT, GGT, AST як і багато інших біохімічних маркерів збільшена у пацієнтів, хворих на COVID-19. Вимірювання активності ферменту може бути корисне при спостереженні за пацієнтами [31, 22]. Аланінамінотрансфераза (АЛТ) - фермент печінки, нирок. АЛТ є маркером цитолізу (руйнування) клітин печінки.

Аналіз статистичних даних проведений в роботі показів, що в досліджених групах пацієнтів активності глюкози достовірно змінилась в крові досліджених груп пацієнтів підвищується в першій групі (covid) – $8,22 \pm 13,61$ у другій (hls) – $6,11 \pm 1,84$.

Дослідження біохімічних показників крові пацієнтів з COVID демонструє збільшення показника глюкози. Отримані дані свідчать про цитолітичні процеси та вплив на обмін вуглеводів, що збігається з даними літератури.

ЛДГ - Часто підвищений, маркер індукованих гіпоксією деструктивних змін в тканинах при COVID-19. В дослідженнях пацієнтів підвищується рівень ЛДГ – $457,88 \pm 212,01$.

C-реактивний білок (СРБ) - це білок гострої фази запалення. Він є дуже чутливим, але мало специфічним маркером запальних процесів в організмі. СРБ підвищений у пацієнтів з COVID-19.

В крові досліджених груп пацієнтів рівень СРБ підвищується в першій групі (covid) – $81,49 \pm 94,94$ (у другій (hls) – $61,89 \pm 72,03$), але статистичний аналіз не показав значущої різниці ($p > 0,05$). Це може бути пов'язано з тим, що рівень СРБ пов'язаний з тяжкістю перебігу захворювання, смертністю, потребою в O_2 і недостатністю саме такої вибірки хворих.

Антистрептолізин-О (АСЛ-О) є специфічним антитілом, яке виробляється організмом людини у відповідь на інфекційний агент стрептолізин-О (він продукується деякими групами гемолітичного стрептококу, є токсичним ферментом). В крові досліджених груп пацієнтів підвищується в першій групі (covid) – $150 \pm 210,95$ у другій (hls) – $106,67 \pm 166,76$.

З літературних даних відомо, що у багатьох хворих на COVID-19 спостерігалися порушення в результатах лабораторних досліджень системи згортання крові, які нагадують системні коагулопатії, що виникають при інших хворобах (наприклад, дисеміноване внутрішньосудинне згортання або тромботичні мікроангіопатії) . Однак досить скоро виявилось, що COVID-19-

асоційована коагулопатія у той же час має ознаки, що відрізняють її від інших хвороб. Зокрема було звернено увагу на тромботичні ускладнення в легеневому кровообігу, які отримали назву легеневої інтраваскулярної коагуляції або легеневої інтраваскулярної коагулопатії. Враховуючи вищесказане, при аналізі лабораторних досліджень увагу приділялось відхиленню від норми показників коагулограми.

У таблиці 3.5 наведена описова статистика результатів коагулограми досліджуваних пацієнтів. У роботі досліджували час згортання крові (АЧТВ), фібриноген, тромбіновий час (ТЧ), розчинні комплекси мономерів фібрину (РКМФ)

Таблиця 3.5 - Описова статистика для результатів коагулограми (covid - госпіталізовані з приводу COVID, hls – пацієнти, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні)

Показники	hls					covid				
	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум	n	Середнє	Стандартне відхилення	Мінімум	Максимум
Протромбіновий час	35	17,54	5,74	11	43	44	14,89	2,94	11	23
Протромбіновий індекс	35	85,60	12,83	44	105	44	90,52	11,63	63	110
Тромбіновий час 17"-23"	35	22,06	22,29	13	149	44	19,18	2,92	15	27
Фібриноген плазми	35	4034,37	1094,6	2664	6882	44	4420,8	1067,2	222	7548
АЧТЧ	35	43,63	8,26	32	67	44	40,89	7,42	30	66

Таблиця 3.6 - Результати тесту Манна-Уїтні для двох незалежних вибірок результатів коагулограми.

Показник	p
Протромбіновий час 15"-20"	0,012
Протромбіновий індекс	0,162
Тромбіновий час 17"-23"	0,570
АЧТЧ	0,119
Фібриноген плазми	0,076

Протромбіновий час значно вищий в групі з підтвердженим діагнозом COVID-19, ніж у тих пацієнтів, які знаходилися на профілактичному стаціонарному лікуванні ($p < 0,05$). Середнє значення рівня протромбінового часу в першій групі (covid) – $90,52 \pm 2,94$, у другій (hls) – $17,54 \pm 5,74$.

Аналіз статистичних даних проведений в роботі показав, що в досліджених групах пацієнтів Протромбіновий індекс, АЧТЧ, Фібриноген плазми достовірно не змінювалися ($p > 0,05$).

Для наочного представлення зміни гематологічних та біохімічних показників в двох груп пацієнтів, використовували кластерний аналіз за допомогою ітераційного алгоритму k-середніх показав

У кластерний аналіз було включено параметри, які мали статистично значущу різницю у двох досліджуваних груп пацієнтів (cluster1 – пацієнти, хворі на COVID-19; cluster2 – пацієнти, госпіталізовані для профілактичного огляду) (рис.3.2).

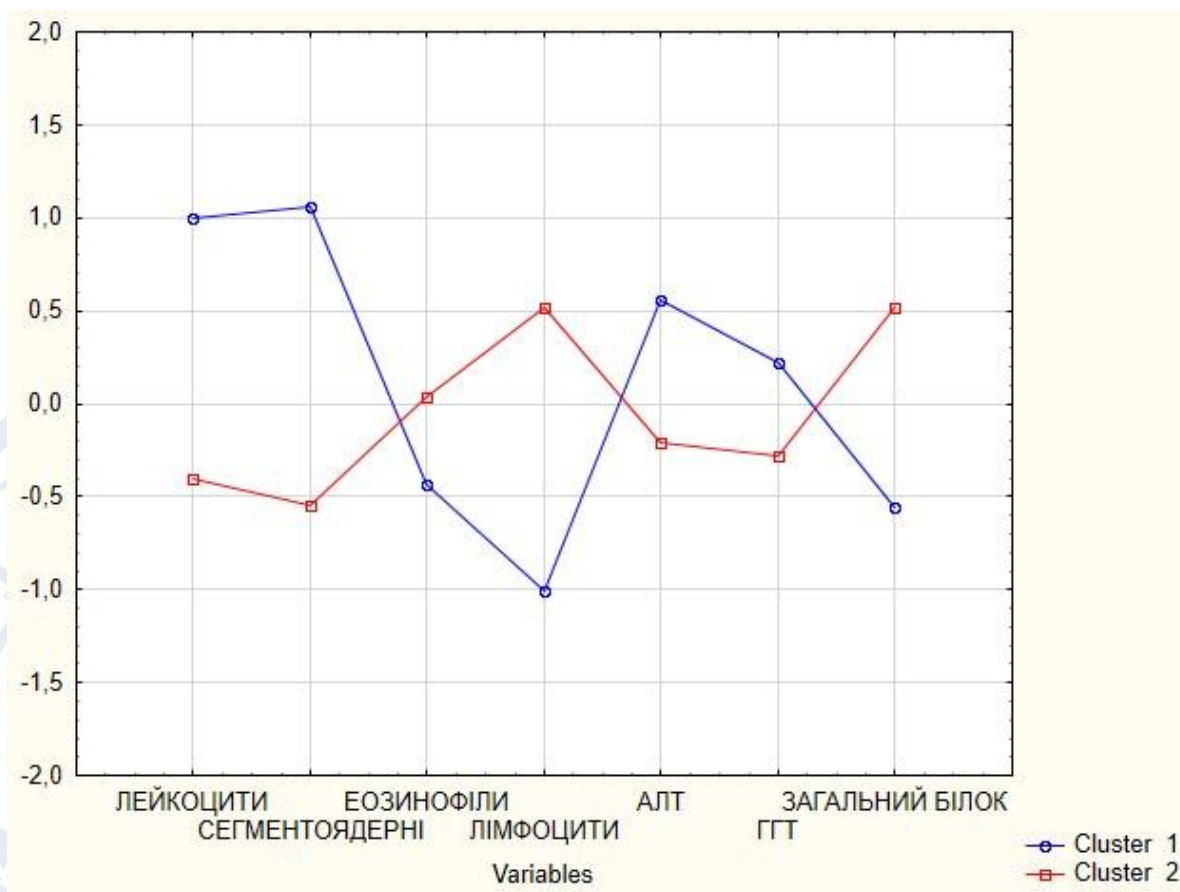


Рис. 3.2. Графічне зображення співвідношень стандартизованих параметрів у кластерах пацієнтів, хворих на COVID-19 (cluster1) і пацієнтів, госпіталізованих для профілактичного огляду (cluster2)

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено, що найбільш значущими лабораторними показниками для діагностики та моніторингу захворювання на COVID-19 є кількість лейкоцитів, нейтрофілів, еозинофілів, лімфоцитів, АЛТ, ГГТ, загальний білок та протромбіновий час.

ВИСНОВКИ

1. Пошук ранніх та надійних маркерів для лабораторної діагностики COVID-19 представляє важливий напрямок у стратифікації пацієнтів з високим ризиком ускладнень та смертності. Проте, попри важливість даної проблеми, накопичений досвід лабораторної медицини вимагає подальшої систематизації.

2. Проведений аналіз гематологічних показників показав, що рівень лейкоцитів, нейтрофілів достовірно вище у пацієнтів, хворих на COVID-19, рівень лімфоцитів та еозинофілів достовірно зменшується ($p < 0,05$).

3. Аналіз біохімічних показників показав, що рівень АЛТ і ГГТ достовірно збільшується, у той час, як зменшується рівня загального білку.

4. Аналіз статистичних даних проведений в роботі показав, що в досліджених групах пацієнтів гематологічні показники – гемоглобін, еритроцити, тромбоцити, моноцити, та біохімічні показники – білірубін, лужна фосфатаза, сечовина, креатинін достовірно не змінювалися.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алексеева Е.И., Тепаев Р.Ф., Шилькрот И.Ю., Дворяковская Т.М., Сурков А.Г., Криулин И.А.. COVID-19-индуцированный «цитокиновый шторм» — особая форма синдрома активации макрофагов. Вестник РАМН. 2021. Т. 76. № 1. С. 51–66.
2. Андрейчин М.А., Ничик Н.А., Завіднюк Н.Г., Йосик Я.І., Іщук І.С., Івахів О.Л. COVID-19: Епідеміологія, клініка, діагностика, лікування та профілактика. //Інфекційні хвороби. 2(100). 2020. С. 41 – 55.
3. Бондаренко А.В. Цитокиновий шторм при сепсисі та COVID-19. Здоров'я України. // <https://health-ua.com/article/68328-tcitoknovij-shtorm-pri-sepsis-taCOVID19>
4. Всесвітня організація охорони здоров'я:
5. Дзюблик І.В. Обертинська О.В. Коронавіруси людини та захворювання органів дихання// Здоров'я суспільства. 2015;1–2. С. 39–47.
6. Кіреєв І.В., Жаботинська Н.В. Роль оцінки рівня прокальцитоніну для вирішення питання про призначення антибактеріальної терапії під час лікування COVID-19. Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин». – Харків, НФаУ, 2021.- С.64.
7. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев "Морион".-2001.- 408 с
8. Мельник, А. А. Невирусологические лабораторные маркеры в контексте COVID-19. //Здоров'я України : мед. газета. - 2020. - N 18. - С. 52-53
9. Міністерство охорони здоров'я України, " Інформація про коронавірус": <https://moz.gov.ua/koronavirus-2019-ncov>
10. Офіційний інформаційний портал Кабінету Міністрів України:
11. Приступ Л. Н. Методи дослідження в гематології від 17.12.2007

- 12.Рябокоть О. В., Оніщенко, Ю. Ю., Рябокоть Е.Є. Інфекційні хвороби: навч. посіб. для студентів мед. ф-ту за спеціальністю 7.110.10 - "Стоматологія". Запоріжжя: ЗДМУ, 2011. 205 с.
- 13.Халєєва О.Л. Печенізька Л.О. Перспективи використання солей четвертинних амонієвих основ у м'яких лікарських препаратах для лікування дерматомікозів. // Український біофармацевтичний журнал. 3(20). 2012. С. 28–32.
- 14.Хиць А.Р. COVID-19: вчені визначали нові біомаркери прогресуючого перебігу захворювання. //Укр. мед. Часопис. 2021. URL: www.umj.com.ua.
- 15.Шамхалова М.Ш., Мокрышева Н.Г., Шестакова М.В. COVID-19 и почки // Сахарный диабет.- 2020.-23(3).- С. 235-241.
- 16.Шипилов М. В. Молекулярные механизмы “цитокинового шторма” при острых инфекционных заболеваниях //Лечебное дело. – 2013. – № 1.- С.81-85.
- 17.Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований/В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев. – СПб: ВМедА, 2011. – 318 с.
- 18.Aktar S, Ahamad MM, Rashed-Al-Mahfuz M, Azad A, Uddin S, Kamal A, Alyami SA, Lin P, Islam SMS, Quinn JM, Eapen V, Moni MA Machine Learning Approach to Predicting COVID-19 Disease Severity Based on Clinical Blood Test Data: Statistical Analysis and Model Development. // JMIR Med Inform. 2021. 9(4). P. 25884.
- 19.Bairwa M, Kumar R, Beniwal K, Kalita D, Bahurupi Y. Hematological profile and biochemical markers of COVID-19 non-survivors: A retrospective analysis. // Clin Epidemiol Glob Health.- 2021.-11.- P.100770.
- 20.Cascella M., Rajnik M., Cuomo A., Dulebohn SC, Napoli RD. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19) // Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. 2020.

21. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):529–539. DOI: 10.1007/s00281-017-0629-x.
22. Cimolai N. Environmental and decontamination issues for human coronaviruses and their potential surrogates. *Journal of medical virology.* 2020;92:2498–2510. DOI: 10.1002/jmv.26170.
23. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. [Mar;2020]; Wang D, Hu B, Hu C, et al. *JAMA.* 2020 323:1061–1069.
24. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Huang C, Wang Y, Li X, et al. *Lancet.* 2020;395:497–506.
25. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. URL: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov>
26. Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, et al. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus Res.* 2016; 96:245–286. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.003.
27. Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, Lim GH, Lim KGE, Tan GB, Mucheli SS, Kuperan P, Ong KH. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. // *Am J Hematol.* -2020.- 95(6).-E131-E134.
28. Friedman N, Alter H, Hindiyeh M, et al. Human Coronavirus Infections in Israel: Epidemiology, Clinical Symptoms and Summer Seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses.* 2018;10(10):515. DOI: 10.3390/v10100515.
29. Hassan S., Sheikh F., Jamal S., Ezeh J., Akhtar A. Coronavirus (COVID-19) // A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. *Cureus.* 2020 Mar 21;12(3). 3-7 p.
30. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *Nat Commun* 11;4704. DOI: 10.1101/2020.04.14.20065771.

31. Jordan Rachel E, Adab Peymane, Cheng K K. Covid-19: risk factors for severe disease and death // *BMJ*.-2020.- 368.-m1198.
32. Kampf G, Todt D, Pfaender S, et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect*. 2020;104(3):246 – 251. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.
33. Killerby ME, Biggs HM, Haynes A, et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014–2017. *J Clin Virol*. 2018;101:52–56. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.01.019.
34. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. // *Prog Cardiovasc Dis*.- 2020.-63(3).- P. 390-391.
35. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. // *Clin Chim Acta*. 2020.-506.-P. 145-148.
36. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. // *Clin Chem Lab Med*. -2020.- 58(7).-1063-1069.
37. Medical recommendation 2020. Covid-19. – Electronic resource. – Access mode:https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/122/original/280420_20_%D0%9CR_COVID-19_v6.pdf.
38. Nickbakhsh S, Ho A, Marques DFP, et al. Epidemiology of Seasonal Coronaviruses: Establishing the Context for the Emergence of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020;222(1):17–25. DOI: 10.1093/infdis/jiaa185.
39. Sarhan AR, Hussein TA, Flaih MH, Hussein KR. A Biochemical Analysis of Patients with COVID-19 Infection. // *Biochem Res Int*.- 202.-1383830.
40. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures

[Epub ahead of print] [Mar;2020];Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. *J Med Virol.* 2020

41.Virus Taxonomy: 2019 Release. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>



Джура Таїсія Анатоліївна

Факультет хімії, біології і біотехнологій

091 Біологія

Біологія

ДЕКЛАРАЦІЯ АКАДЕМІЧНОЇ ДОБРОЧЕСНОСТІ

Усвідомлюючи свою відповідальність за надання неправдивої інформації, стверджую, що подана кваліфікаційна (магістерська) робота на тему «Оцінка екологічного стану атмосферного повітря у м. Вінниця» є написано мною особисто.

- Одночасно заявляю, що ця робота:
- Не передавалась іншим особам і подається до захисту вперше;
- Не порушує авторських та суміжних прав, закріплених статтями 21-25 Закону України « Про авторське право та суміжні права»;
- не отримувалась іншими особами, а також дані та інформація не отримувались у недозволений спосіб.

Я усвідомлюю, що у разі порушення цього порядку моя кваліфікаційна робота буде відхилена без права її захисту, або під час захисту за неї буде поставлена оцінка «незадовільно».

« _____ » _____ 2022 р. _____