

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ГРИПП И COVID-19

Я.А. Сафронова, А.С. Паньков

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» (Оренбург, Россия)

Для цитирования: Сафронова Я.А., Паньков А.С. Характеристика показателей периферической крови и иммунного статуса у пациентов с коинфекцией грипп и COVID-19. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2024;24(1):4-8. <https://doi.org/10.35693/AVP602350>

■ Сведения об авторах

Сафронова Я.А. – аспирант кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней. <https://orcid.org/0000-0003-3949-6851>

E-mail: charkina.ya@yandex.ru

Паньков А.С. – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой эпидемиологии и инфекционных болезней, директор НИЦ.

<https://orcid.org/0000-0003-4994-6633> E-mail: aspan751@mail.ru

Получено: 03.10.2023

Одобрено: 13.10.2023

Опубликовано: 24.03.2024

■ Аннотация

Цель – изучить изменения параметров периферической крови и иммунного статуса у больных микст-инфекцией и оценить риски развития фиброза легких.

Материал и методы. Обследовано 25 пациентов в возрасте от 23 до 72 лет с коинфекцией в острой фазе заболевания, госпитализированных в ГАУЗ ООКИБ на базе научно-исследовательского центра ОрГМУ. У всех обследованных определены: маркеры клеточного иммунитета, фагоцитарный показатель и фагоцитарный индекс, уровень иммуноглобулинов классов А, М, G, цитокины.

Результаты. У пожилых пациентов с коинфекцией наравне с пациентами с изолированным течением COVID-19 выявлена супрессия параметров клеточного иммунитета, в первую очередь Т-системы иммунитета. У молодых и пациентов среднего возраста разнонаправленные изменения параметров клеточного иммунитета при коинфекции гриппа и COVID-19. У пациентов с изолированным течением коронавирусной инфекции выявлено повышение IL-6, TGF-β уже на ранних сроках заболевания.

Выводы. Изменений иммунитета, происходящих при коинфекции в острый период заболевания, недостаточно для развития фиброзных изменений в легких. Возможность обнаружения вирусов гриппа у пациентов с COVID-19 может поменять стратегию лечения и подавления реакций цитокинового шторма у пациентов в критическом состоянии.

■ **Ключевые слова:** коинфекция, грипп, COVID-19, иммунный статус, цитокины, фиброз легких.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

THE CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL BLOOD AND IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH INFLUENZA AND COVID-19 CO-INFECTION

Yana A. Safronova, Aleksandr S. Pankov

Orenburg State Medical University (Orenburg, Russia)

Citation: Safronova YaA, Pankov AS. The characteristics of peripheral blood and immune status in patients with influenza and COVID-19 co-infection. *Aspirantskiy vestnik Povolzhiya*. 2024;24(1):4-8. <https://doi.org/10.35693/AVP602350>

Information about authors

Yana A. Safronova – a postgraduate student of the Epidemiology and Infectious Diseases Department. <https://orcid.org/0000-0003-3949-6851>

E-mail: charkina.ya@yandex.ru

Aleksandr S. Pankov – PhD, Associate professor, Head of the Epidemiology and Infectious Diseases Department, Director of the Research Center.

<https://orcid.org/0000-0003-4994-6633> E-mail: aspan751@mail.ru

Received: 03.10.2023

Accepted: 13.10.2023

Published: 24.03.2024

■ Abstract

Aim – to study the changes in peripheral blood parameters and immune status in patients with mixed infection and to assess the risks of developing pulmonary fibrosis.

Material and methods. We examined 25 patients aged 23 to 72 years with co-infection in the acute phase of the disease, who were hospitalized at the infectious diseases hospital based in the OrSMU research center. The markers of cellular immunity, percentage of phagocytic cells and phagocytic index, the level of immunoglobulins of classes A, M, G, and cytokines were registered in all examined patients.

Results. The suppression of cellular immunity parameters, primarily the T-immune system, was revealed in elderly patients with co-infection, along with patients with an isolated course of COVID-19. In young and middle-aged patients, we found multidirectional changes in cellular immunity parameters during influenza and COVID-19 co-infection. An increase in IL-6 and TGF- β in the early stages of the disease was registered in patients with an isolated course of COVID-19 infection.

Conclusion. The changes in the immunity during co-infection are not pronounced enough for the development of lungs fibrous in the acute period of the disease. The possibility of detecting influenza viruses in patients with COVID-19 may change the strategy of treatment and suppression of cytokine storm reactions in critically ill patients.

- **Keywords:** coinfection, influenza, COVID-19, immune status, cytokines, pulmonary fibrosis.
- **Conflict of interest:** *nothing to disclose.*

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенными вирусными инфекциями являются острые респираторные вирусные инфекции [1, 2]. В последнее время серьезную медико-социальную проблему представляют новая коронавирусная инфекция и ее отдаленные последствия [3, 4]. С 2020 года в мировой Сети появились сведения о пациентах с COVID-19, коинфицированных гриппом [5, 6]. Большинство исследований направлено на изучение механизмов одновременного заражения SARS-CoV-2 и вирусом гриппа, а также оценку рисков летальных исходов [1, 4]. Результаты метаанализа оказались противоречивыми для разных регионов и подгрупп [1, 5, 7]. Тяжесть течения изолированных респираторных инфекций обусловлена преимущественно дисбалансом иммунной системы (гиперпродукция провоспалительных цитокинов с развитием воспаления органов и тканей) [1, 4].

ЦЕЛЬ

Изучить изменения параметров периферической крови и иммунного статуса у больных микст-инфекцией и оценить риски развития фиброза легких.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на базе инфекционного госпиталя ГАУЗ ООКИБ и научно-исследовательского центра ОрГМУ. Критерием включения больных в исследование был положительный результат взятого из носоглотки на 3-4 день от начала заболевания ПЦР-теста на наличие SARS-CoV-2, гриппа А и гриппа В. Исследование включало лабораторные и инструментальные методы исследования (компьютерная томография легких, физикальное обследование и оценка жизненных показателей, пульсоксиметрия).

Обследовано 25 пациентов в возрасте от 23 до 72 лет с коинфекцией в острой фазе заболевания, госпитализированных в инфекционный госпиталь. Все пациенты при госпитализации подписали информированное добровольное согласие на обработку персональных данных и медицинское вмешательство.

В ходе обследования были определены следующие группы. Группа 1 – контрольная (использованы нормативные значения иммунологических показателей, разработанные в проблемной лаборатории по изучению механизмов естественного иммунитета ОрГМУ). Группа 2 – пациенты молодого и среднего возраста с коинфекцией (N=12). Группа 3 – пациенты пожилого возраста с коинфекцией (N=13). Группа 4 – пациенты с изолированным течением COVID-19.

У всех обследованных определены маркеры клеточного иммунитета (CD-3, CD-4, CD-8, CD-19) методом иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Москва); фагоцитарный показатель и фагоцитарный индекс по отношению к *St.aureus*, метаболическая активность сегментоядерных нейтрофилов в спонтанной и индуцированной реакции с нитросиним тетразолием (НСТ-тест); уровень иммуноглобулинов классов А, М, G в реакции иммунодиффузии, а также содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в реакции преципитации с полиэтиленгликолем, цитокины IL-6, IL-8, TGF- β , FNO- α методом ИФА на тест-системах фирмы «Вектор Бест». Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием компьютерной программы Statistica 10.0. Оценка значимости изменений проводилась при помощи U-критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациентов составил 51,4 года. Отмечается, что в группе лиц молодого и среднего возраста преобладают мужчины 58% (7 пациентов), в группе же пожилого возраста преобладали женщины 69% (8 пациентов). Наблюдение по возрасту в группах наблюдения представлено на рисунке 1.

Таким образом, в возрасте от 17 до 20 лет было 2 пациента (8%), в группе 21–35 лет – 4 пациента (16%), 36–55 (60) лет – 7 пациентов (28%), от 56 лет женского пола и 61 года мужского пола до 75 лет включительно – 12 пациентов (48%).

Большее половины пациентов имели хронические заболевания (18 человек, из них 8 женщин, 10 мужчин). Среди заболеваний преобладали патология сердечно-сосудистой

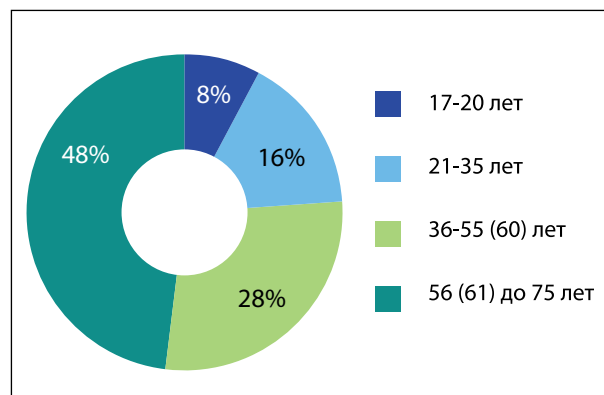


Рисунок 1. Распределение пациентов с коинфекцией по возрасту.

Figure 1. Distribution of patients with coinfection by age.

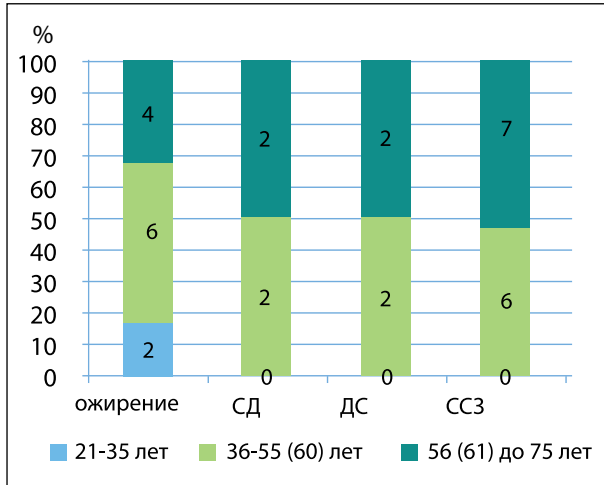


Рисунок 2. Характеристика сопутствующих заболеваний у обследуемых.

Figure 2. Characteristics of concomitant diseases in the subjects.

системы (13), дыхательной системы (4), а также ожирение (12) и сахарный диабет (5). Зачастую пациенты имели сочетанную сопутствующую патологию. Среди пациентов второй группы регистрировалось ожирение у двух пациентов. Наблюдения по коморбидному фону представлены на рисунке 2.

Полученные данные совпадают с опубликованными данными зарубежных ученых, где авторы отнесли заболевания сердечно-сосудистой, дыхательной систем, а также эндокринные нарушения к одному из рисков развития коинфекции [3, 7].

Таблица 1 / Table 1

Показатели клинического анализа крови и иммунной системы контрольной группы, пациентов с коинфекцией, пациентов с COVID-19

Indicators of clinical analysis of blood and immune system in the control group, patients with coinfection, patients with COVID-19

Показатели	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (N=12)	Группа 3 (N=13)	Группа 4 (N=17)
L, 10 ⁹ /л	6 [5,15; 7,25]	6,75 [5,6; 8,1]	6,8 [5,4; 8,76]	8,05 [7,65; 10,83]
Лимф, %	36 [33; 38]	39 [27,3; 45]	10 [5,4; 17,3] ↓	11 [9; 14] ↓
Лимф, абс.	2,142 [1,902; 2,597]	2,814 [1,7; 2,9]	0,8 [0,237; 0,935] ↓	1,028 [0,641; 1,406]
CD 3, %	62 [60; 66]	56,5 [34; 58]	40 [35; 57] ↓	46 [39; 54] ↓
CD 3, абс.	1,339 [1,146; 1,609]	1,571 [0,941; 1,711]	0,37 [0,23; 0,45] ↓	0,50 [0,16; 0,715] ↓
CD 4, %	43 [39; 46]	42,5 [32; 48]	37 [31; 45] ↓	36 [30; 41] ↓
CD 4, абс.	0,841 [0,752; 1,049]	0,973 [0,3; 1,4] ↑	0,362 [0,12; 0,47] ↓	0,37 [0,19; 0,56] ↓
CD 8, %	24 [22; 27]	20 [12,5; 25]	20 [10,6; 25]	32 [25; 34] ↑
CD 8, абс.	0,514 [0,421; 0,651]	0,498 [0,1; 0,5]	0,129 [0,1; 0,5] ↓	0,292 [0,19; 0,475]
CD 19, %	15 [11; 16]	24 [14; 26,25] ↑	24 [13,65; 27] ↑	15 [12; 21]
CD 19, абс.	0,29 [0,24; 0,36]	0,447 [0,1; 0,5] ↑	0,23 [0,1; 0,37]	0,15 [0,11; 0,21]
ФП, %	59 [52; 67]	43 [30,8; 47]	33 [27; 41] ↓	33 [26; 37] ↓
ФИ, усл. Ед.	3,6 [3,3; 4,1]	5,8 [3,5; 6,7]	4,95 [3,1; 5,9]	3,8 [3,5; 3,9]
НСТ спонт., %	5,8 [4,9; 6,6]	2,7 [0,7; 4] ↓	3,8 [1,2; 6,5] ↓	1,2 [0,7; 2,3] ↓
НСТ стим., %	37,2 [31,6; 42,8]	6 [1,5; 7,5] ↓	5,8 [4,3; 6,5] ↓	44,2 [37,8; 45,4]
ЦИК, ЕД.	69 [64; 74]	201 [127,3; 353] ↑	51 [37,1; 83]	178 [97; 393] ↑
IgA, г/л	1,9 [1,76; 2,04]	4,93 [1,8; 5,1] ↑	1,37 [1,13; 3,95]	2,53 [2,15; 3,03]
IgM, г/л	1,34 [1,25; 1,64]	0,6 [0,2; 0,8] ↓	0,3 [0,1; 0,6] ↓	1,31 [1,13; 1,31]
IgG, г/л	12,56 [11,04; 14,52]	13,59 [3,4; 14,7]	1,5 [0,7; 6,1] ↓	10,56 [8,94; 15,68]

Примечания: жирным шрифтом выделены показатели, достоверно (p<0,05) отличающиеся от нормативных значений.

Согласно данным метаанализа, необходимость в ИВЛ в группах с коморбидным фоном была выше в 2,31 раза, а риск госпитализации в отделение реанимации интенсивной терапии – в 2,09 раза выше, чем у пациентов только с COVID-19 [1, 5]. Среди исследуемых второй и третьей групп тяжелых форм течения коинфекции не наблюдалось.

Анализ полученных данных показал, что все обращения приходились в среднем на 3,5±0,5 дня от начала заболевания. Все случаи коинфекции имели следующие характерные клинические особенности: повышение температуры тела в пределах 38,5 в течение трех дней, типичные катаральные проявления с поражением верхних дыхательных путей. Всем пациентам было проведено КТ-исследование легких. Лишь у 16% обследуемых были зафиксированы изменения в легочной ткани, характерные для вирусно-бактериальной пневмонии. Уровень оксигенации при проведении пульсоксиметрии, а также аускультативная картина были в пределах нормы. При проведении ПЦР-исследования отделяемого из носоглотки выявлены положительные результаты SARS-CoV-2 и грипп В у 92%, у 8 % SARS-CoV-2 и H1N1. Достоверно важных различий в изменениях клинико-иммунологических параметров у пациентов с гриппом В и H1N1 не выявлено. Изменения в биохимическом анализе крови выявлены только у пациентов с осложненным течением инфекции в виде повышения ферритина 326 нг/мл, фибриногена 5,1 г/л, в клиническом анализе крови ускоренное СОЭ 71 мм/ч.

При оценке иммунологических параметров крови следует отметить стереотипные изменения в третьей и четвертой группах. В обеих группах выявлены лимфопения, как относительных и абсолютных значений в третьей группе, так и изолированно относительных значений в четвертой группе.

Отмечается достоверное повышение уровня IL-8 при коинфекции и COVID-19, что объясняет выраженный катаральный синдром при респираторных инфекциях. Эти показатели сходны у групп разного возраста. Выраженные изменения выявлены в третьей и четвертой группах при оценке цитокинов (IL-6, FNO-α, TGF-β). Содержание моноцитов, базофилов и эозинофилов существенно не поменялось у обследуемых по сравнению с контрольной группой.

Выявлено достоверное уменьшение относительного и абсолютного количества зрелых Т-лимфоцитов (CD-3) у больных третьей и четвертой групп. При этом отмечались увеличение абсолютного и относительного количества хелперов CD-4 у пациентов второй группы и увеличение

Таблица 2 / Table 2

Характеристика показателей цитокинов в сыворотке крови в острый период инфекционных заболеваний**Characteristics of cytokine indices in blood serum in the acute period of infectious diseases**

Показатели	Норма (пг/мл, нг/мл)	Группа 2	Группа 3	Группа 4
IL-6	Не >10 пг/мл	1,2 [0,7; 4,1]	1,3 [0,6; 4,3]	80,5 [59,8; 119,6] ↑
IL-8	Не >10 пг/мл	11,7 [7,1; 16,4] ↑	15,1 [14,3; 20,9] ↑	21,4 [5,91; 27,7] ↑
FNO-α	Не >6 пг/мл	4,7 [2,1; 5,8]	3,1 [2,7; 6,1]	3,85 [1,01; 6,85]
TGF-β	До 36 нг/мл	5,99 [0,6; 11,6]	68,3 [47,5; 92,3] ↑	43,5 [37,2; 61,7] ↑

Примечания: жирным шрифтом выделены показатели, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от нормативных значений.

В-лимфоцитов CD-19 у пациентов второй и третьей групп. Приrost цитотоксических В-лимфоцитов выявлен только у пациентов с изолированным течением COVID-19.

Важным фактором является снижение фагоцитарного показателя лишь у пациентов третьей и четвертой групп при неизменном фагоцитарном индексе. Вразрез отмечено снижение спонтанного НСТ-теста у всех обследованных групп.

Таким образом, у пожилых пациентов с коинфекцией наравне с пациентами с изолированным течением COVID-19 выявлена супрессия параметров клеточного иммунитета, в первую очередь Т-системы иммунитета. У молодых пациентов и пациентов среднего возраста отмечались разнонаправленные изменения параметров клеточного иммунитета при коинфекции гриппа и COVID-19.

При оценке гуморального иммунитета установлено повышение уровня иммуноглобулина А (IgA) у пациентов второй и четвертой групп при неизменном содержании уровня IgM и G. Содержание ЦИК превышает две нормы в этих группах. У пациентов третьей группы изменений со стороны гуморального иммунитета и ЦИК не отмечено.

При оценке цитокинов отмечается повышение различных групп белков в зависимости от нозологии. Так, у пациентов с изолированным течением COVID-19 выявлено сочетанное повышение IL-6, IL-8, TGF-β, что вместе с нарушением баланса Th1/Th2 дает неблагоприятный прогноз и свидетельствует в пользу развития хронических заболеваний легких. Дисбаланс цитокинов у пациентов третьей группы скорее обусловлен наличием у пациентов ХОБЛ в анамнезе жизни. Других значимых отклонений у пациентов второй группы со стороны цитокинов не выявлено. С учетом имеющихся данных можно предположить, что при сочетанных вирусных инфекциях в отличие от изолированных риск развития фиброзных изменений в легких минимален.

Обсуждая результаты, необходимо отметить, что если в организме не происходит выработки специфического иммунного ответа против вируса, то будет наблюдаться постоянное усиление неспецифического воспалительного ответа, приводящее к обширному повреждению ткани и усугубляющее инфекцию. Несмотря на различную нозологию, возраст пациентов, у большинства обследованных выявились стереотипные изменения иммунологических показателей. Выраженные изменения со стороны CD-3 наблюдались как под влиянием SARS-CoV-2, так и при коинфекции, но у пожилых пациентов. Следует считать важным

отсутствие тяжелых клинических форм у пациентов с коинфекцией, что в целом совпадает с литературными данными [4, 7]. Снижение фагоцитарной активности у пациентов третьей группы обусловлено обострением хронических заболеваний. Напротив, увеличение ЦИК во второй и четвертой группах может быть объяснено развитием аутоиммунных реакций, индуцированных действием вируса с повреждением тканей и запуском процессов ангиогенеза. О риске развития фиброза свидетельствует повышение IL-6,

TGF-β у пациентов с изолированным течением коронавирусной инфекции уже на ранних сроках заболевания, чего нельзя отметить у пациентов с коинфекцией независимо от возраста и сопутствующей патологии. В целом изменения, возникшие у пациентов из третьей группы, объясняются уже имеющимися особенностями организма.

Лечение проводилось с учетом сочетанной нозологии и симптомов, имеющихся на момент заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на явное отсутствие интоксикационного синдрома и других проявлений тяжелого инфекционного процесса, характер изменений параметров иммунитета у пациентов с коинфекцией обуславливает развитие адекватного противовирусного иммунитета, чего нельзя сказать об иммунитете у пациентов с изолированным течением COVID-19 в период разгара заболевания. Изменений иммунитета, происходящих при коинфекции в острый период заболевания, недостаточно для развития фиброзных изменений в легких. Изучение данного вопроса необходимо продолжить в динамике заболевания для оценки рисков отдаленных последствий. Возможность обнаружения вирусов гриппа у пациентов с COVID-19 может поменять стратегию лечения и подавления реакций цитокинового шторма у пациентов в критическом состоянии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ivanova IA, Omelchenko ND, Filippenko AV, et al. Role of the cellular immunity in the formation of the immune response in coronavirus infections. *Medical Immunology (Russia)*. 2021;23(6):1229-1238. (In Russ.). [Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., и др. Роль клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа при коронавирусных инфекциях. *Медицинская иммунология*. 2021;23(6):1229-1238]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-ROT-2302>
- Suwanwongse K, Shabarek N. Can Coinfection With Influenza Worsen COVID-19 Outcomes? *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2020;8:2324709620953282. <https://doi.org/10.1177/2324709620953282>
- Chuchalin AG. Pulmonary fibrosis in patients with COVID-19: A review. *Therapeutic archive*. 2022;94(11):1333-1339. (In Russ.). [Чучалин А.Г. Фиброз легких у больных, перенесших COVID-19. *Терапевтический архив*. 2022;94(11):1333-1339]. <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.11.201943>
- Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):762-768. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>

5. Usenko DV, Tkhakushinova NK, Shaturina TT, et al. Acute respiratory infections and flu during the COVID-19 pandemic. What to expect in 2021–2022? *Russian Medical Inquiry*. 2021;5(11):721-727. (In Russ.). [Усенко Д.В., Тхакушинова Н.Х., Шатурина Т.Т., и др. Острые респираторные инфекции и грипп в период пандемии COVID-19 – к чему готовиться в сезоне 2021–2022 гг.? *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2021;5(11):721-727]. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-11-721-727>
6. Kawai S, Fukushima K, Yomota M, et al. Number of Patients with Influenza and COVID-19 Coinfection in a Single Japanese Hospital during the First Wave. *Jpn J Infect*. 2021;74(6):570-572. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.1009>
7. Cong B, Deng S, Wang X, Li Y. The role of respiratory coinfection with influenza or respiratory syncytial virus in the clinical severity of COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2022;12:05040. <https://doi.org/10.7189/jogh.12.05040>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	ADDITIONAL INFORMATION
Источник финансирования. Работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.	Study funding. The study was the authors' initiative without external funding.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.	Conflict of interest. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest associated with the content of this article.
Участие авторов. Я.А. Сафронова – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование. А.С. Паньков – редактирование, утверждение окончательного варианта статьи. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.	Contribution of individual authors. Ya.A. Safronova – was responsible for development of the study concept, scientific data collection, its systematization and analysis, wrote the first draft of the manuscript. A.S. Pankov – provided detailed manuscript editing and critical revision, approved its final version. All authors gave their final approval of the manuscript for submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work, implying proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.
Автор для переписки Яна Александровна Сафронова Адрес: Оренбургский государственный медицинский университет, ул. Советская, 6, г. Оренбург, Россия, 460014. E-mail: charkina.ya@yandex.ru	Corresponding Author Yana A. Safronova Address: Orenburg State Medical University, 6 Sovetskaya st., Orenburg, Russia, 460014. E-mail: charkina.ya@yandex.ru