

## ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ ДИСБИОЗ МИКРОБИОТЫ И СЫВОРОТОЧНЫЕ БИОМАРКЕРЫ КАК ОТРАЖЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Е. А. Черневская <sup>✉</sup>, А. Ю. Меглей, И. В. Буюкова, Н. Ю. Ковалева, К. М. Горшков, В. Е. Захарченко, Н. В. Белобородова

Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Синдром «хронического критического состояния» (ХКС) объединяет пациентов с длительной зависимостью от жизнеобеспечивающих методов терапии. У значительной доли пациентов пусковым фактором ХКС служат тяжелые повреждения головного мозга. Число исследований по изучению микробиоты при различных патологических состояниях растет с каждым годом, однако особенности микробиоты кишечника при ХКС все еще недостаточно изучены. Целью работы было выявить связь изменений таксономического состава микробиоты кишечника, воспалительных и неврологических сывороточных биомаркеров с тяжестью поражения центральной нервной системы у пациентов в ХКС. В сравнительном проспективном исследовании у 29 пациентов с поражением ЦНС в ХКС методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) обнаружены изменения таксономического состава микробиоты. Корреляционный анализ уровней биомаркеров и представителей микробиоты кишечника выявил статистически значимые корреляции: кортизола с *F. prausnitzii* ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ) и *B. thetaiotaomicron* ( $r = -0,57$ ;  $p < 0,05$ ) в группе пациентов в вегетативном состоянии; коэффициента СРБ/альбумин с *S. aureus* ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,05$ ), *B. fragilis group/F. prausnitzii* с S100 ( $r = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ) в группе пациентов с сохраненным сознанием; результатов по шкале комы Глазго с уровнем *Enterococcus spp.* ( $r = -0,77$ ;  $p < 0,05$ ) в обеих группах. Таким образом, комплексная диагностика с применением метода ПЦР-РВ и современных биомаркеров позволяет оценить связь таксономических изменений состава микробиоты кишечника со степенью неврологического дефицита. Данный подход позволит оптимизировать использование антибактериальных препаратов и/или разработать альтернативные стратегии для менее агрессивного воздействия на микробиоту кишечника.

**Ключевые слова:** микробиота кишечника, ось «кишечник – мозг», хроническое критическое состояние, биомаркеры, прокальцитонин, кортизол, коэффициент СРБ/альбумин, ПЦР в реальном времени, *Feacalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterococcus spp.*

**Вклад авторов:** Е. А. Черневская, А. Ю. Меглей — оценка таксономического состава микробиоты и уровня биомаркеров, анализ полученных данных, написание текста рукописи; Н. В. Белобородова — дизайн исследования, редактирование рукописи; И. В. Буюкова, Н. Ю. Ковалева, К. М. Горшков — отбор и работа с пациентами, сбор клинических данных; В. Е. Захарченко — получение данных для анализа, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили рукопись.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 2/19/2 от 20 июня 2019 г.). Все пациенты или их законные представители подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Александровна Черневская  
ул. Петровка, д. 25, с. 2, г. Москва, 127051; echernevskaya@fnkcr.ru

**Статья получена:** 20.08.2020 **Статья принята к печати:** 03.09.2020 **Опубликована онлайн:** 16.09.2020

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.053

## TAXONOMIC DYSBIOSIS OF GUT MICROBIOTA AND SERUM BIOMARKERS REFLECT SEVERITY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM INJURY

Chernevskaya EA <sup>✉</sup>, Meglei AYu, Buyakova IV, Kovaleva NYu, Gorshkov KM, ZakharchenkoVE, Beloborodova NV

Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russian

The term “chronic critical illness” (CCI) refers to patients with prolonged dependence on intensive care. In most patients, CCI is triggered by severe brain injury. Ever more studies researching the microbiota in pathologic conditions are published every year, but a lot is yet to be elucidated about the composition of the gut microbiota in CCI. The aim of this study was to investigate possible correlations between changes in the taxonomic abundance of the gut microbiota, levels of proinflammatory and neurological serum biomarkers and the severity of central nervous system injury in patients with CCI. Our prospective observational pilot study included 29 patients with CCI. Using real-time PCR allowed us to detect changes in the taxonomic abundance of the gut microbiota. The correlation analysis of serum biomarkers and the taxonomic composition of the gut microbiota revealed statistically significant correlations between cortisol levels and the abundance of *F. prausnitzii* ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ) and *B. thetaiotaomicron* ( $r = -0,57$ ;  $p < 0,05$ ) in vegetative state patients; between the CRP/albumin ratio and the abundance of *S. aureus* ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,05$ ); between the abundance of *B. fragilis group/F. prausnitzii* and S100 levels ( $r = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ) in conscious patients; between Glasgow coma scale scores and the abundance of *Enterococcus spp.* ( $r = -0,77$ ;  $p < 0,05$ ) in both groups. Thus, the association between the changes in the taxonomic composition of the gut microbiota and the severity of neurologic deficit can be evaluated using PCR-based diagnostic techniques and blood serum biomarkers. This approach will help to optimize antibacterial treatment regimens and/or develop alternative strategies to minimize the aggressive effect of antibiotics on the gut microbiota.

**Keywords:** gut microbiota, gut-brain axis, chronic critical illness, biomarkers, procalcitonin, cortisol, CRP/albumin ratio, real-time PCR, *Feacalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterococcus spp.*

**Author contribution:** Chernevskaya EA, Meglei AYu — taxonomic microbiota profiling, serum biomarker tests, data analysis, manuscript preparation; Beloborodova NV — study design, final version of the manuscript; Buyakova IV, Kovaleva NYu, Gorshkov KM — patient recruitment and treatment, clinical data collection; ZakharchenkoVE — sample collection, final version of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Protocol № 2/19/2 dated June 20, 2019). Informed consent was obtained from all study participants or their legal representatives.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Chernevskaya  
Petrovka, 25, s. 2, Moscow, 127051; echernevskaya@fnkcr.ru

**Received:** 20.08.2020 **Accepted:** 03.09.2020 **Published online:** 16.09.2020

**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.053

Достижения в области интенсивной терапии за последние десятилетия значительно снизили смертность пациентов при острых критических состояниях, но вместе с тем увеличили долю пациентов, оставшихся длительно зависимыми от методов интенсивной терапии. Это привело к появлению понятия ХКС [1]. Среди критериев ХКС: пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) не менее двух недель; необходимость проведения интенсивной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) более 14–28 дней; стойкое воспаление; иммуносупрессия; синдром гиперметаболизма-гиперкатаболизма; повышенная восприимчивость к инфекциям [2–4].

Большинство пациентов, перенесших тяжелые органические повреждения головного мозга, отвечают критериям ХКС. Первичная патология утяжеляет неврологическую дисфункцию, которая может быть и самостоятельным элементом ХКС как результат функционально-метаболических нарушений, опосредованных воспалительными и невоспалительными компонентами: чрезмерная активация микроглии; нарушение перфузии головного мозга; нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ); изменение нервной передачи [3]. Такие аномальные процессы определяют по повышенным уровням маркеров воспаления/повреждения головного мозга [5]. На сегодняшний день не существует универсального биомаркера, способного отразить сложные патофизиологические процессы, характерные для критического состояния, поэтому для мониторинга пациентов в ХКС необходима комплексная оценка биомаркеров. Наиболее востребованы среди них белок S100 и нейронспецифичная энзолаза (NSE) [6–8], свидетельствующие о повреждении нервной ткани, а также неспецифичные маркеры воспаления — интерлейкин-6 (IL6) [9] и С-реактивный белок (СРБ) [10].

Важную роль в развитии ХКС может играть изменение состава микробиоты кишечника пациентов. Интерес к изучению микробиоты при критических состояниях обусловлен возможностью ее влияния на функции ЦНС человека [11, 12]. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) может играть роль в возникновении и прогрессировании органной недостаточности при критических состояниях [13, 14]. Пациенты в ХКС имеют метаболические нарушения, приводящие к развитию белково-энергетической недостаточности [15], коморбидные заболевания ЖКТ, вызванные в том числе питанием через назогастральный зонд [16], что может служить причиной дисбиотических нарушений при ХКС [17]. Число исследований, посвященных изучению микробиоты при критических состояниях, растет с каждым годом, однако особенности микробиоты кишечника при ХКС все еще недостаточно изучены [18].

Существует целый ряд методов для изучения микробиоты человека: от традиционного культивирования микроорганизмов до современных технологий секвенирования ДНК следующего поколения (NGS). Перспективной альтернативой классическим культуральным методам в изучении микробиоты является метод ПЦР-РВ, позволяющий в кратчайшие сроки не только качественно, но и количественно оценить основные группы бактерий микробиоты кишечника [19].

Целью данного исследования было выявить связь изменений таксономического состава микробиоты кишечника, воспалительных и неврологических сывороточных биомаркеров с тяжестью поражения ЦНС у пациентов в ХКС.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В сравнительное проспективное исследование включены пациенты с поражением ЦНС различной этиологии ( $n = 29$ ), находящиеся в ХКС в одном из ОРИТ Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦРП) в период с июня 2019 г. по март 2020 г.

Критерии включения в исследование: пациенты с поражением ЦНС различной этиологии, соответствующие критериям ХКС (пребывание в ОРИТ не менее двух недель и/или необходимость проведения ИВЛ более чем 14–28 дней) в возрасте от 18 до 75 лет включительно, поступающие в ОРИТ ФНКЦРП для интенсивной нейрореабилитации. Критерии исключения: возраст старше 75 лет; химиотерапия/лечение гормональными (стероидными) препаратами; диагностированная нейроинфекция; прием антибактериальных, про-/пре- и метаболитических препаратов на момент поступления в ОРИТ.

Возраст пациентов составил от 20 до 75 лет (медиана 56 (32–63) лет), из них 17 женщин (58,6%) и 12 мужчин (41,4%). По нозологическим формам в исследование включены 15 пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), семь пациентов после перенесенных тяжелых черепно-мозговых травм (ЧМТ), четыре пациента с осложненным течением послеоперационного периода после нейрохирургических вмешательств, три — с аноксическим поражением головного мозга после успешных реанимационных мероприятий при клинической смерти. На ИВЛ находились 10 пациентов и 19 пациентов (на самостоятельном дыхании через трахеостомическую трубку). Все пациенты находились на энтеральном питании, больше половины из них ( $n = 15$ ) получали питание через назогастральный зонд или гастростому. В связи с инфекционными осложнениями (уринфекция, инфекция нижних дыхательных путей) антибактериальную терапию получал 21 пациент (табл. 1). Кроме того, всем пациентам назначали комплексный препарат (метабиотик), содержащий в своем составе активные метаболиты *Bacillus subtilis*, сорбент и пребиотический компонент.

У пациентов оценивали уровень сознания (вегетативное состояние, сохранное сознание), неврологический статус по шкале комы Глазго (ШКГ) (15 баллов — ясное сознание, 14–13 баллов — оглушение, 12–9 баллов — сопор, 8–6 баллов — кома), назначение антибактериальных препаратов в день отбора биоматериала.

## Отбор образцов клинического материала

По одному образцу кишечного содержимого и венозной крови собирали в день поступления (до начала антибактериальной терапии) и затем на каждые седьмые сутки в динамике до момента перевода из ОРИТ (2–7 образцов от одного пациента). Сбор, транспортирование и хранение клинического материала проводили в строгом соответствии с методическими рекомендациями [20]. Взятие кишечного содержимого производили в одноразовый стерильный контейнер. Контейнеры доставляли в лабораторию и хранили до начала исследования при +2–8 °С. Время от взятия материала до начала исследования не превышало 24 ч. Для выделения ДНК использовали супернатант: 0,1 г кишечного содержимого смешивали с 800 мкл изотонического раствора и перемешивали на вортексе до получения гомогенной суспензии; полученную смесь центрифугировали в течение 30 с при 12 045 g.

**Таблица 1.** Обследуемые пациенты. ИВЛ — искусственная вентиляция легких, ТСТ — трахеостомическая трубка, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ЧМТ — черепно-мозговая травма

Пациенты в вегетативном состоянии (n = 10)					
Пациент	Возраст/ пол	Диагноз	Дыхание	Антибактериальная терапия	ШКГ
1	40 / ж	Аноксическое повреждение головного мозга	ИВЛ	Оксазолидинон (линезолид), цефалоспорины, карбапенемы	9
2	64 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, гликопептиды (ванкомицин)	10
3	32 / ж	Послеоперационные осложнения	ИВЛ, ТСТ	Фосфомицины (монурал), карбапенемы, аминогликозиды, гликопептиды (ванкомицин)	12–15
4	61 / ж	ОНМК	ТСТ	Нитрофураны (макмирор), карбапенемы, гликопептиды, рифампицин	13
5	38 / ж	ОНМК	ИВЛ	Карбапенемы	6
6	31 / ж	ЧМТ	ТСТ	–	13–15
7	69 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Карбапенемы, аминогликозиды, тетрациклины	9–12
8	51 / м	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, гликопептиды (ванкомицин), тетрациклины	13
9	62 / м	Послеоперационные осложнения	ИВЛ, ТСТ	Гликопептиды (ванкомицин), аминогликозиды, цефалоспорины, фосфомицины (монурал)	9–14
10	26 / ж	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, тетрациклины, гликопептиды (ванкомицин), сульфаниламиды	10–12
Пациенты с сохранным сознанием (n = 19)					
1	26 / м	ОНМК	ТСТ	Макролиды, гликопептиды	15
2	56 / м	Аноксическое повреждение головного мозга	ТСТ	–	15
3	58 / ж	ОНМК	ТСТ	–	15
4	60 / м	ОНМК	ТСТ	Нитрофураны, энтерол	15
5	22 / ж	ЧМТ	ТСТ	–	15
6	42 / ж	ОНМК	ТСТ	–	–
7	20 / м	ЧМТ	ТСТ	Цефалоспорины	–
8	63 / ж	ОНМК	ТСТ	Карбапенемы, аминогликозиды	12–14
9	74 / м	ОНМК	ТСТ	–	14
10	32 / м	Послеоперационные осложнения	ТСТ	–	15
11	44 / м	Аноксическое повреждение головного мозга	ТСТ	Карбапенемы, тетрациклины	15
12	69 / ж	ЧМТ	ИВЛ	–	13
13	58 / м	ОНМК	ТСТ	Фторхинолоны, аминогликозиды	14–15
14	74 / м	ОНМК	ИВЛ	Аминогликозиды, сульфаниламиды, нитрофураны, тетрациклины, цефалоспорин, противогрибковые	10
15	76 / м	ОНМК	ТСТ	Цефалоспорины, гликопептиды, фосфомицины	10–14
16	72 / ж	Послеоперационные осложнения	ИВЛ	Карбапенемы, гликопептиды, противогрибковые	14
17	23 / ж	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, гликопептиды	15
18	51 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Цефалоспорины, гликопептиды, аминогликозиды	11–15
19	57 / м	ОНМК	ТСТ	Тетрациклины, карбапенемы, гликопептиды	10

Дальнейшее исследование проводили согласно протоколу, представленному в наборе тест-системы Колонофлор-16 («АльфаЛаб»; Россия). Взятие крови производили из венозного катетера в пробирку без антикоагулянта. Образцы сыворотки получали путем центрифугирования венозной крови при 1500 g в течение 10 мин. Сыворотку разливали по 500 мкл в одноразовые пробирки типа эппендорф, замораживали и хранили до начала исследования при –20 °С.

#### Оценка таксономического состава микробиоты кишечника

Для оценки использовали отечественную тест-систему «Колонофлор-16» («АльфаЛаб»; Россия), которая включает

реагенты для выделения ДНК, смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для ДНК всех бактерий (общая бактериальная масса), смеси для амплификации, специфичные для каждого выявленного вида (или группы) бактерий. Измерения проводили на амплификаторе планшетного типа CFX 96 (BioRad; США).

#### Определение биомаркеров сыворотки крови

Образцы сыворотки крови в объеме 200 мкл использовали для определения концентраций: NSE, белка S100, прокальцитонина (PCT), IL6 и кортизола с использованием соответствующих наборов реактивов (Roche Diagnostics; Швейцария). Измерение биомаркеров проводили на

**Таблица 2.** Сравнение таксономического состава микробиоты кишечника в группах пациентов в зависимости от антибиотикотерапии (АБТ) на момент взятия биоматериала

Показатель	Референсные значения	Пациенты, медиана (25%-й квартиль; 75%-й квартиль)	
		Получали АБТ (n = 19)	Не получали АБТ (n = 21)
Общая бактериальная масса	$< 10^{12}$	$2 \times 10^{12}$ ( $3 \times 10^{11}$ – $8 \times 10^{12}$ )	$2,5 \times 10^{12}$ ( $2 \times 10^{11}$ – $10^{13}$ )
<i>Lactobacillus spp.</i>	$10^7$ – $10^8$	$4 \times 10^7$ ( $2 \times 10^6$ – $10^9$ )	$3 \times 10^7$ ( $7 \times 10^6$ – $6,5 \times 10^9$ )
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$10^9$ – $10^{10}$	$4 \times 10^8$ ( $3 \times 10^8$ – $3 \times 10^{10}$ )	$9 \times 10^8$ ( $9,5 \times 10^7$ – $8,5 \times 10^9$ )
<i>Escherichia coli</i>	$10^7$ – $10^8$	$5 \times 10^8$ ( $7 \times 10^7$ – $3 \times 10^9$ )	$3 \times 10^8$ ( $4,5 \times 10^7$ – $3,5 \times 10^9$ )
<i>Bacteroides fragilis group</i>	$10^9$ – $10^{12}$	$1,5 \times 10^{12}$ ( $2 \times 10^{11}$ – $8 \times 10^{12}$ )	$4 \times 10^{12}$ ( $3 \times 10^{11}$ – $10^{13}$ )
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$10^8$ – $10^{11}$	$5 \times 10^7$ ( $9,5 \times 10^6$ – $6 \times 10^8$ )	$10^8$ ( $10^7$ – $3 \times 10^{10}$ )
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$< 10^4$	$3 \times 10^8$ ( $2 \times 10^5$ – $10^9$ )	$6 \times 10^5$ ( $2 \times 10^5$ – $10^9$ )
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$< 10^4$	$1,5 \times 10^{11}$ ( $2 \times 10^6$ – $10^{13}$ )	$2 \times 10^{14}$ ( $1,1 \times 10^6$ – $4,5 \times 10^{14}$ )
<i>Candida spp.</i>	$< 10^4$	$2 \times 10^7$ ( $6 \times 10^6$ – $5 \times 10^7$ )	$2 \times 10^7$ ( $7 \times 10^6$ – $2 \times 10^7$ )
<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 10^4$	$4 \times 10^8$ ( $3 \times 10^7$ – $6 \times 10^{11}$ )	$2 \times 10^8$ ( $3 \times 10^7$ – $10^9$ )
<i>Enterococcus spp.</i>	$< 10^8$	$8 \times 10^5$ ( $7 \times 10^5$ – $9 \times 10^6$ )	$1,2 \times 10^6$ ( $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$ )
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	$10^9$ – $10^{12}$	$6 \times 10^8$ ( $2 \times 10^7$ – $4 \times 10^9$ )	$2,5 \times 10^8$ ( $2,5 \times 10^7$ – $2 \times 10^9$ )
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$< 10^{11}$	$8 \times 10^8$ ( $10^7$ – $3 \times 10^9$ )	$5,1 \times 10^8$ ( $5,1 \times 10^7$ – $5,5 \times 10^9$ )
<i>Clostridium difficile</i>	–	$2 \times 10^8$ ( $10^7$ – $2 \times 10^9$ )	$4 \times 10^7$ ( $2 \times 10^5$ – $10^9$ )
<i>Clostridium perfringens</i>	–	–	$6 \times 10^5$ ( $6 \times 10^5$ – $2 \times 10^6$ )
<i>Proteus spp.</i>	$< 10^4$	$10^9$ ( $2,5 \times 10^8$ – $2 \times 10^{10}$ )	$6,5 \times 10^8$ ( $10^8$ – $10^{10}$ )
<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Citrobacter spp.</i>	$< 10^4$	$4,5 \times 10^7$ ( $6,5 \times 10^6$ – $6,5 \times 10^8$ )	$5 \times 10^8$ ( $2 \times 10^7$ – $4 \times 10^9$ )
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	–	$2 \times 10^7$ ( $5 \times 10^6$ – $2 \times 10^8$ )	$1,95 \times 10^6$ ( $3 \times 10^5$ – $4,5 \times 10^7$ )
<i>Parvimonas micra</i>	–	$2,55 \times 10^8$ ( $7,5 \times 10^6$ – $10^{14}$ )	$10^7$ ( $2 \times 10^5$ – $2 \times 10^{12}$ )
Отношение <i>Bacteroides fragilis group</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,1–100	5000 (100–100 000)	667 (100–15 000)

автоматическом электрохемилюминисцентном анализаторе Cobas e411 (Roche; Швейцария).

Определение концентраций альбумина и СРБ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе AU 480 (Beckman Coulter; США) с применением оригинальных реагентов.

Данные представлены в виде медианы, 25 и 75%-го квартилей. При сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни; корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Все полученные различия в группах считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Статистический анализ проводили с использованием Statistica 13.0 (Stat Soft Inc.; США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 29 пациентов (см. табл. 1). Особенности течения ХКС, независимо от первичной нозологической формы, позволили объединить разнородных пациентов с тяжелым поражением ЦНС в общую группу исследования. Анализ микробиоты кишечника пациентов в зависимости от проводимой антибактериальной терапии (АБТ) не выявил статистически значимых различий между группами пациентов (табл. 2). Поэтому в дальнейшем при сопоставлении групп пациентов мы ориентировались на неврологическую оценку.

По уровню сознания пациентов разделили на две группы (см. табл. 1) согласно общепринятым критериям [21]: пациенты в вегетативном состоянии или с минимальным сознанием ( $n = 10$ ); пациенты в сознании, имевшие грубые когнитивные и психические нарушения ( $n = 19$ ), что является одним из признаков ХКС. Группы были сопоставимы по возрасту (табл. 3).

При исследовании таксономического состава микробиоты кишечника в группах пациентов в ХКС методом ПЦР-РВ обнаружены следующие особенности (рис. 1):

- общая бактериальная масса сопоставима с референсными значениями, рекомендованными производителем;

- в составе микробиоты пациентов присутствуют *Clostridium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, которых в норме не обнаруживают;

- логарифмы концентраций (lg КОЕ/г) шести видов микроорганизмов (*Klebsiella spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*/ *Citrobacter spp.*) значительно превышают референсные значения в 1,5–2 раза;

- уровень *Bacteroides thetaiotaomicron* снижен по сравнению с референсными значениями;

- достоверные различия между группами пациентов по уровню сознания выявлены для *F. prausnitzii* ( $p = 0,015$ ).

Значения таких сывороточных биомаркеров, как кортизол, СРБ, альбумин и коэффициент СРБ/альбумин, статистически значимо различались в двух исследуемых группах (см. табл. 3). Уровень PCT не превышал референсные значения ни у пациентов с сохранным сознанием, ни у пациентов в вегетативном состоянии, но различия между двумя этими группами были достоверными ( $p = 0,009$ ) (см. табл. 3).

При оценке степени нарушения сознания по ШКГ образцы пациентов были разделены на три группы, в соответствии с балльной оценкой: 15 баллов — ясное сознание ( $n = 37$ ), 14–13 баллов — оглушение ( $n = 33$ ), 12–6 баллов — сопор/кома ( $n = 40$ ). Выявлены статистически значимые различия в уровнях коэффициента СРБ/альбумин (см. рис. 2), кортизола и IL6 (рис. 3).

Таблица 3. Сравнение показателей у пациентов в ХКС

Показатель, единица измерения	Референсные значения	Пациенты, медиана (25%-й квартиль; 75%-й квартиль)		p
		С сохранным сознанием (n = 19)	В вегетативном состоянии (n = 10)	
Возраст, лет	–	57 (32–69)	51 (38–62)	0,82
РСТ, нг/мл*	<0,25	0,058 (0,039–0,095)	0,107 (0,08–0,177)	0,009
Кортизол, нмоль/л*	166–507	367 (244–623)	682 (492–816)	0,001
ИЛ-6, пг/мл	<7	31 (15–47)	35 (14–67)	0,293
S100, мкг/л	<0,1	0,097 (0,05–0,16)	0,105 (0,06–0,19)	0,423
NSE, нг/мл	15,7–17	17,8 (12,8–23)	15,2 (9,7–22)	0,248
СРБ, мг/л*	<5	35 (18–78)	76 (33–147)	0,004
Альбумин, г/л*	35–55	33 (28–35)	28 (25–35)	0,038
СРБ/альбумин, отн. ед.*	<1	1,2 (0,5–2,2)	2,5 (0,9–5,8)	0,003

Примечание: \* — статистически значимые различия.

Для выявления связи в системе «кишечник–мозг» провели корреляционный анализ уровней сывороточных биомаркеров и представителей микробиоты кишечника. В группе пациентов в вегетативном состоянии выявили статистически значимые обратные корреляции кортизола с *F. prausnitzii* ( $r = -0,62$ ) и с *B. thetaiotaomicron* ( $r = -0,57$ ). В группе пациентов с сохранным сознанием обнаружены прямые корреляции коэффициента СРБ/альбумин с *S. aureus* ( $r = 0,72$ ), *B. fragilis group/F. prausnitzii* с S100 ( $r = 0,45$ ).

С помощью корреляционного анализа была выявлена сильная обратная связь уровня *Enterococcus spp.* со значениями ШКГ ( $r = -0,77$ ;  $p \leq 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования подтвердили, что состав микробиоты кишечника у пациентов в ХКС существенно отличается от референсных значений независимо от неврологического статуса. Дисбиотические нарушения у пациентов в ХКС выражены повышенными уровнями представителей типа *Proteobacteria*, грибов рода *Candida spp.*, условно-патогенных видов *Firmicutes* и *Bacteroides*, а также сокращением численности комменсальной микробиоты

(см. рис. 1), являющейся продуцентом низкомолекулярных метаболитов (*F. prausnitzii*), что соотносится с результатами работ, проведенных с использованием технологий секвенирования микробиоты кишечника по 16S РНК у пациентов, находящихся в ОРИТ [22], а также у пациентов с повреждением головного мозга в критическом состоянии [23]. Так, у перенесших инсульт пациентов выражен дисбиоз с преобладанием продуцентов короткоцепочечных жирных кислот, включая *Odoribacter* и *Akkermansia*, коррелировал с исходом заболевания [24]. Однако в указанном исследовании оценивали состав микробиоты в первые 48 ч после инсульта, и нами не найдено источников, в которых детально описан состав микробиоты при хронизации процесса, что подчеркивает новизну полученных результатов.

Анализ биомаркеров показал статистически значимые различия в уровнях кортизола, СРБ, альбумина и значениях коэффициента СРБ/альбумин в группе пациентов с сохранным сознанием по сравнению с группой в вегетативном состоянии (см. табл. 3). Обнаружены статистически значимые корреляции биомаркеров с уровнем некоторых представителей микробиоты кишечника, что подтверждает концепцию о наличии

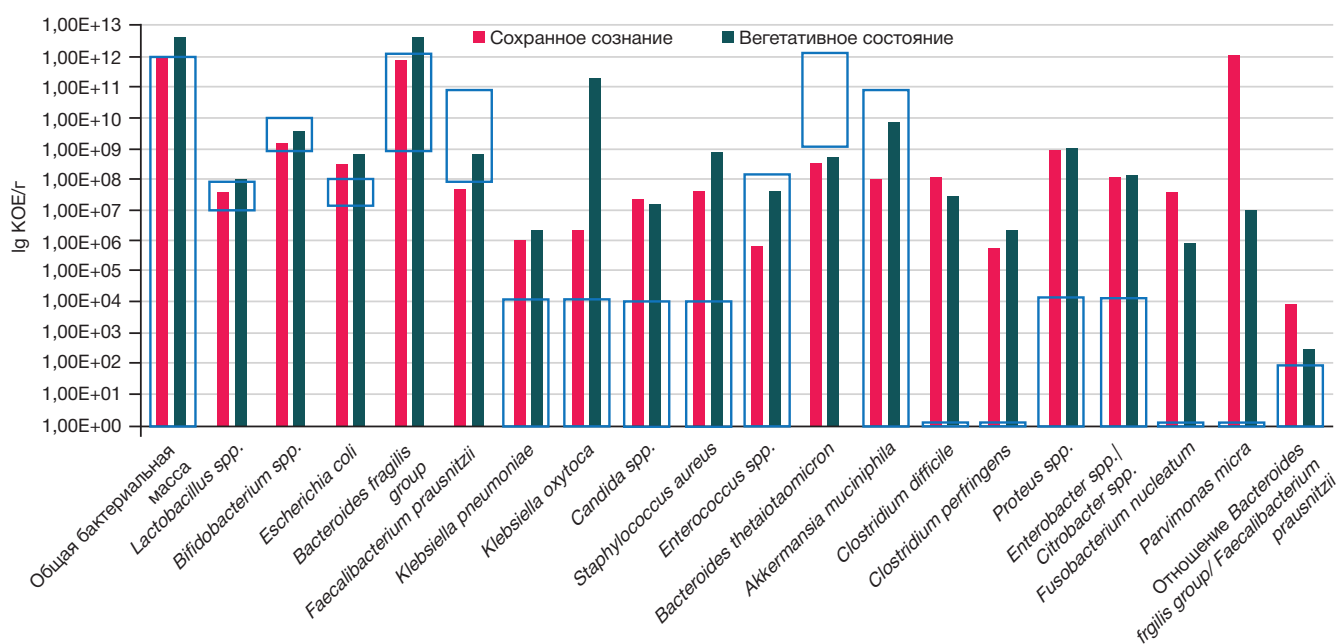


Рис. 1. Сравнение таксономического состава микробиоты кишечника между группами пациентов в сознании ( $n = 19$ ) и в вегетативном состоянии ( $n = 10$ ) с референсными значениями (синие рамки), рекомендованными производителем, по 20 показателям

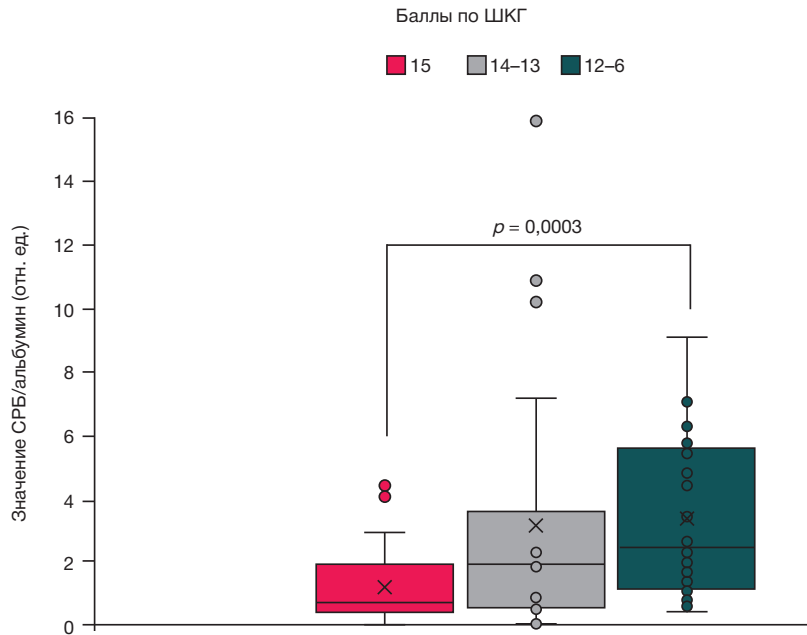


Рис. 2. Значение коэффициента СРБ/альбумин в зависимости от баллов ШКГ ( $p < 0,05$  при сравнении между группами в 15 и 12–6 баллов по ШКГ)

связи состава и численности микробиоты кишечника с поражением ЦНС. Выявленные обратные корреляции уровня кортизола с уровнем *F. prausnitzii* и *B. thetaiotaomicron* у пациентов в вегетативном состоянии согласуются с данными более ранних исследований, в которых обнаружено, что сокращение численности указанных таксонов приводит к уменьшению нейропротективных функций микробиоты и, как следствие, повреждению нервной ткани [25], смещению иммунореактивности в сторону развития воспаления и аутоиммунных процессов [26]. Повышение уровня кортизола, в свою очередь, отрицательно сказывается на метаболических процессах в организме пациентов в критическом состоянии, смещая равновесие в сторону катаболизма и способствуя развитию синдрома гиперметаболизма-гиперкатаболизма [27, 28].

В проведенном нами исследовании уровни кортизола, СРБ и значение коэффициента СРБ/альбумин у пациентов в вегетативном состоянии были практически вдвое выше, а уровень альбумина — ниже, что свидетельствует о более выраженных воспалительных и катаболических явлениях у этой группы больных. Несмотря на

статистически значимые различия, уровень РСТ не превышал референсных значений в обеих группах, что может свидетельствовать об асептическом воспалении, не связанном с системной бактериальной инфекцией (см. табл. 3).

Коэффициент СРБ/альбумин широко изучают в последнее время как комбинацию маркеров, отражающих системное воспаление и нутритивный статус, и как независимый прогностический маркер у пациентов с инфекцией, злокачественными новообразованиями, в том числе и у пациентов ОРИТ [10, 29, 30]. Нами показано, что у пациентов в ХКС коэффициент СРБ/альбумин отражает степень нарушения сознания по ШКГ (см. рис. 2) и коррелирует с уровнем условно-патогенного представителя микробиоты *S. aureus*. Биомаркеры S100 и NSE принято рассматривать как маркеры острого повреждения нервной ткани [31]. У пациентов в ХКС их уровни изменялись незначительно, не выходя за пределы референсного интервала, что может отражать хронический характер повреждения ткани головного мозга. Обнаруженная прямая корреляция S100 с отношением *Bacteroides fragilis* к *Faecalibacterium prausnitzii*

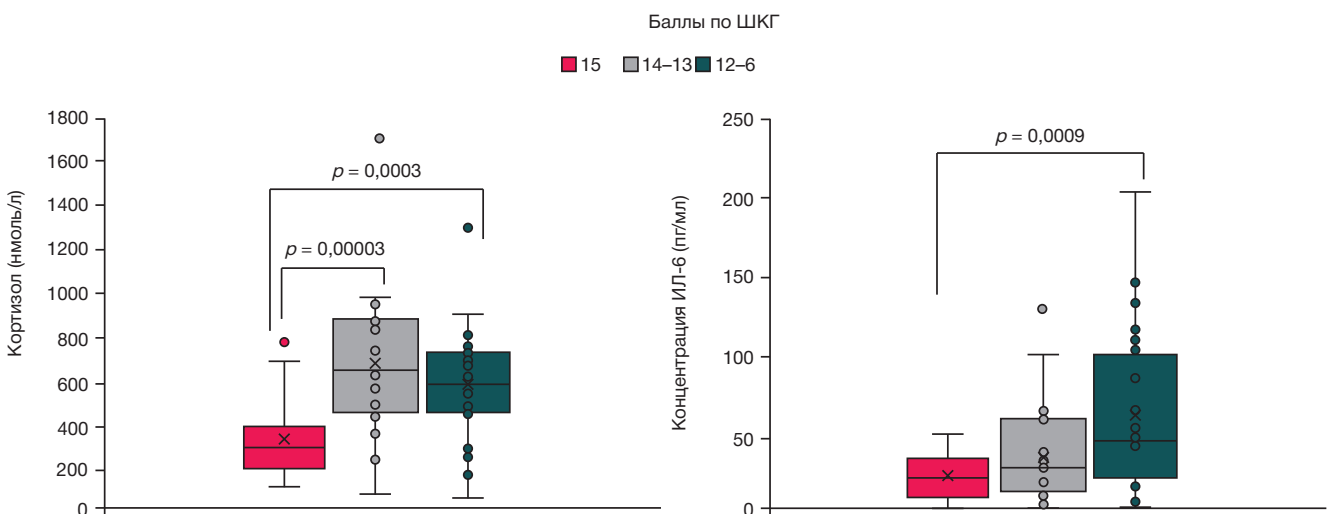


Рис. 3. Концентрация ИЛ-6 и кортизола в сыворотке крови пациентов в зависимости от баллов по ШКГ ( $p < 0,05$  при сравнении между группами в 15 и 14–13, 15 и 12–6 баллов по ШКГ)

как потенциального биомаркера дисбиоза кишечника провоспалительного типа и сильная обратная корреляция ШКГ с уровнем *Enterococcus spp.* подтверждают связь дисбиотических нарушений с дисфункцией головного мозга. Однако связь между изученными таксонами микробиоты кишечника, неврологическими маркерами и степенью неврологического дефицита до конца не ясна и требует углубленного изучения. В опубликованной литературе нам не встретились данные о корреляционной связи между изучаемыми таксонами микробиоты и сывороточными биомаркерами при ХКС.

Таким образом, у пациентов с дисфункцией мозга в ХКС микробиота кишечника подвергается изменениям, позволяющим считать ее «поврежденным органом». Небольшое число наблюдений не позволило оценить вклад антибактериальных препаратов в развитие нарушений таксономического состава микробиоты кишечника ввиду выраженных различий индивидуальных схем АБТ у обследованных пациентов. Однако комплексный подход с применением современных технологий может

способствовать оптимизации АБТ, что является задачей дальнейших исследований.

## Выводы

1. У пациентов в ХКС выявлены выраженные нарушения таксономического состава микробиоты кишечника независимо от тяжести поражения ЦНС.
2. Обнаруженные статистически значимые корреляции биомаркеров с ШКГ и некоторыми представителями микробиоты свидетельствуют в пользу концепции о связи между численностью и составом микробиоты кишечника и поражением ЦНС.
3. Применение комплексной ПЦР-диагностики позволяет проводить динамическую оценку таксономического состава микробиоты кишечника в кратчайшие сроки.
4. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения важной роли микробиоты кишечника в патогенезе неврологического дефицита. Целенаправленная коррекция микробиоты может повысить эффективность нейрореабилитации даже у пациентов с тяжелыми повреждениями головного мозга.

## Литература

1. Nelson JE, Cox C.E., Hope A.A., Carson S.S. Chronic critical illness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182 (4): 446–54.
2. Белобородова Н. В. Метаболизм микробиоты при критических состояниях (обзор и постулаты). *Общая реаниматология.* 2019; 15 (6): 62–79.
3. Парфёнов А. Л., Петрова М. В., Соловьёва Н. Н., Степанюк Т. А., Зачепилова К. О., Саидов Ш. Х., и др. Белково-энергетическая недостаточность и структура летальности у пациентов в хроническом критическом состоянии. *Здоровье и образование в XXI веке.* 2018; 20 (8): 55–60.
4. Cox CE. Persistent systemic inflammation in chronic critical illness. *Respir Care.* 2012; 57 (6): 859–66.
5. Duda I, Krzych Ł, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Serum levels of the S100B protein and neuron-specific enolase are associated with mortality in critically ill patients. *Acta Biochimica Polonica.* 2017; 64 (4): 681–52.
6. Белобородова Н. В., Острова И. В. Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (обзор). *Общая реаниматология.* 2017; 13 (5): 121–39.
7. Thomas PAW, Moffatt CE, Rudd D, Marshman LAG. S-100β in chronic subdural haematoma: Prospective cohort study. *J Clin Neurosci.* 2019; 67: 145–50.
8. Shaik AJ, Reddy K, Mohammed N, Tandra SR, Rukmini MK, Baba KS. Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury. *Neurochem Int.* 2019; 131: 104509.
9. Kiiski H, Långsjö J, Tenhunen J, Ala-Peijari M, Huhtala H, Hämäläinen M, et al. Time-courses of plasma IL-6 and HMGB-1 reflect initial severity of clinical presentation but do not predict poor neurologic outcome following subarachnoid hemorrhage. *eNeurologicalSci.* 2017; 6: 55–62.
10. Park JE, Chung KS, Song JH, Kim SY, Kim EY, Jung JY, et al. The C-reactive protein/albumin ratio as a predictor of mortality in critically ill patients. *J Clin Med.* 2018; 7 (10): 333.
11. Giau VV, Wu SY, Jamerlan A, Soo SA, Kim AN, Sang YK, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in Alzheimer's disease. 2018; 10 (11): 1765.
12. Kohler J, Borchers F, Endres M, Weiss B, Spies C, Emmrich JV. Cognitive deficits following intensive care. *Dtsch Arztebl Int.* 2019; 116 (38): 627–34.
13. Meng M, Klingensmith NJ, Coopersmith CM. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. *Curr Opin Crit Care.* 2017; 23 (2): 143–8.
14. Otani S, Coopersmith CM. Gut integrity in critical illness. *J Intensive Care.* 2019; 20 (7): 7.
15. Парфёнов А. Л., Петрова М. В., Пичугина И. М., Лугинина Е. В. Формирование коморбидности у пациентов с тяжелым повреждением мозга и исходом в хроническое критическое состояние (обзор). *Общая реаниматология.* 2020; 16 (4): 72–89.
16. Levy H, Hayes J, Boivin M, Tomba T. Transpyloric feeding tube placement in critically ill patients using electromyogram and ery-thromycin infusion. *Chest.* 2004; 125 (2): 587–91.
17. Луфт В. М. Современные возможности нутриционной поддержки больных в интенсивной медицине. *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* 2010; 7 (5): 42–51.
18. Chernevskaya E, Beloborodova N, Klimenko N, Pautova A, Shilkin D, Gusarov V, et al. Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study. *Crit Care.* 2020; 24: 312.
19. Kurina I, Popenko A, Klimenko N, Koshechkin S, Chuprikova L, Filipenko M, et al. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Mol Cell Probes.* 2020; 52: 101570.
20. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09. Москва, 2009. Доступно по ссылке: <http://docs.cntd.ru/document/1200077791>.
21. Кондратьева Е. А., Авдюнина И. А., Кондратьев А. Н., Улитин А. Ю., Иванова Н. Е., Петрова М. В., и др. Определение признаков сознания и прогнозирования исхода у пациентов в вегетативном состоянии. *Вестник ПАМН.* 2016; 71 (4): 273–80.
22. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsher B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio.* 2014; 5 (5): e01361–14.
23. Ravi A, Halstead FD, Bamford A, Casey A, Thomson NM, Schaik W, et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. *Microb Genom.* 2019; 5 (9): e000293.
24. Li N, Wang X, Sun C, Wu X, Lu M, Si Y, et al. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients. *BMC Microbiol.* 2019; 19 (1): 191.
25. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal γδ T cells. *Nature Medicine.* 2016; 22 (5): 516–23.
26. Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Демьянова Е. В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. *Альманах клинической медицины.* 2018; 46 (5): 396–425.

27. Селиванова А. В., Яковлев В. Н., Мороз В. В., Марченков Ю. В., Алексеев В. Г. Изменения гормонально-метаболических показателей у пациентов, находящихся в критическом состоянии. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (5).
28. Рябов Г. А. Энергетический метаболизм при неотложных состояниях. В книге: Ермолова А. С., Абакумова М. М., редакторы. Искусственное питание в неотложной хирургии и травматологии. Москва: НИИ СП им. Н. В. Склифосовского, 2001; с. 21–82.
29. Llop-Talaveron J, Badia-Tahull MB, Leiva-Badosa E. An inflammation-based prognostic score, the C-reactive protein/albumin ratio predicts the morbidity and mortality of patients on parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2018; 37 (5): 1575–83.
30. Oh TK, Song IA, Lee J.H. Clinical usefulness of C-reactive protein to albumin ratio in predicting 30-day mortality in critically ill patients: A retrospective analysis. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14977.
31. Голубев А. М., Петрова М. В., Гречко А. В., Захарченко В. Е., Кузовлев А. Н., Ершов А. В. Молекулярные маркеры ишемического инсульта. *Общая реаниматология*. 2019; 15 (5): 11–22.

## References

1. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic critical illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182 (4): 446–54.
2. Beloborodova NV. Metabolizm mikrobioty pri kriticheskikh sostojanijah (obzor i postulaty). *Obshhaja reanimatologija*. 2019; 15 (6): 62–79. Russian.
3. Parfjonov AL, Petrova MV, Solovjova NN, Stepanjuk TA, Zachepilova K O, Saidov ShH, i dr. Belkovo-jenergeticheskaja nedostatochnost' i struktura letal'nosti u pacientov v hronicheskom kriticheskom sostojanii. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2018; 20 (8): 55–60. Russian.
4. Cox CE. Persistent systemic inflammation in chronic critical illness. *Respir Care*. 2012; 57 (6): 859–66.
5. Duda I, Krzych Ł, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Serum levels of the S100B protein and neuron-specific enolase are associated with mortality in critically ill patients. *Acta Biochimica Polonica*. 2017; 64 (4): 681–52.
6. Beloborodova NV, Ostrova IV. Sepsis-associirovannaja jencefalopatija (obzor). *Obshhaja reanimatologija*. 2017; 13 (5): 121–39. Russian.
7. Thomas PAW, Moffatt CE, Rudd D, Marshman LAG. S-100β in chronic subdural haematoma: Prospective cohort study. *J Clin Neurosci*. 2019; 67: 145–50.
8. Shaik AJ, Reddy K, Mohammed N, Tandra SR, Rukmini MK, Baba KS. Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury. *Neurochem Int*. 2019; 131: 104509.
9. Kiiski H, Långsjö J, Tenhunen J, Ala-Peijari M, Huhtala H, Hämäläinen M, et al. Time-courses of plasma IL-6 and HMGB-1 reflect initial severity of clinical presentation but do not predict poor neurologic outcome following subarachnoid hemorrhage. *eNeurologicalSci*. 2017; 6: 55–62.
10. Park JE, Chung KS, Song JH, Kim SY, Kim EY, Jung JY, et al. The C-reactive protein/albumin ratio as a predictor of mortality in critically ill patients. *J Clin Med*. 2018; 7 (10): 333.
11. Giau VV, Wu SY, Jamerlan A, Soo SA, Kim AN, Sang YK, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in Alzheimer's disease. 2018; 10 (11): 1765.
12. Kohler J, Borchers F, Endres M, Weiss B, Spies C, Emmrich JV. Cognitive deficits following intensive care. *Dtsch Arztebl Int*. 2019; 116 (38): 627–34.
13. Meng M, Klingensmith NJ, Coopersmith CM. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. *Curr Opin Crit Care*. 2017; 23 (2): 143–8.
14. Otani S, Coopersmith CM. Gut integrity in critical illness. *J Intensive Care*. 2019; 20 (7): 7.
15. Parfenov AL, Petrova MV, Pichugina IM, Luginina EV. Comorbidity Development in Patients with Severe Brain Injury Resulting in Chronic Critical Condition (Review). *General Reanimatology*. 2020; 16 (4): 72–89.
16. Levy H, Hayes J, Boivin M, Tomba T. Transpyloric feeding tube placement in critically ill patients using electromyogram and erythromycin infusion. *Chest*. 2004; 125 (2): 587–91.
17. Luft V. M. Sovremennye vozmozhnosti nutricionnoj podderzhki bol'nyh v intensivnoj medicine. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2010; 7 (5): 42–51.
18. Chernevskaya E, Beloborodova N, Klimenko N, Pautova A, Shilkin D, Gusarov V, et al. Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study. *Crit Care*. 2020; 24: 312.
19. Kurina I, Popenko A, Klimenko N, Koshechkin S, Chuprikova L, Filipenko M, et al. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Mol Cell Probes*. 2020; 52: 101570.
20. Metodicheskie ukazaniya «Organizacija raboty laboratorij, ispol'zujushih metody amplifikacii nukleinovyh kislot pri rabote s materialom, sodержashhim mikroorganizmy I-IV grupp patogenosti» MU 1.3.2569-09. Москва, 2009. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200077791>. Russian.
21. Kondrateva EA, Avdjunina IA, Kondratev AN, Ulitin AYU, Ivanova NE, Petrova MV, i dr. Opredelenie priznakov soznaniya i prognozirovaniya ishoda u pacientov v vegetativnom sostojanii. *Vestnik RAMN*. 2016; 71 (4): 273–80. Russian.
22. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsheer B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio*. 2014; 5 (5): e01361–14.
23. Ravi A, Halstead FD, Bamford A, Casey A, Thomson NM, Schaik W, et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. *Microb Genom*. 2019; 5 (9): e000293.
24. Li N, Wang X, Sun C, Wu X, Lu M, Si Y, et al. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients. *BMC Microbiol*. 2019; 19 (1): 191.
25. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal γδ T cells. *Nature Medicine*. 2016; 22 (5): 516–23.
26. Sitkin SI, Vahitov TYa, Demjanova EV. Mikrobiom, disbioz tolstoj kishki i vospalitel'nye zabolevanija kishhechnika: kogda funkciya vazhnee taksonomii. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2018; 46 (5): 396–425. Russian.
27. Selivanova AV, Yakovlev VN, Moroz VV, Marchenkov YuV, Alekseev VG. Izmeneniya gormonal'no-metabolicheskikh pokazatelej u pacientov, nahodjashhhsja v kriticheskom sostojanii. *Obshhaja reanimatologija*. 2012; 8 (5). Russian.
28. Ryabov GA. Jenergeticheskij metabolizm pri neotlozhnyh sostojanijah. V knige: Ermolova AS, Abakumova MM, redaktory. *Iskusstvennoe pitanie v neotlozhnoj hirurgii i travmatologii*. Moskva: NII SP im. NV Sklifosovskogo, 2001; с. 21–82. Russian.
29. Llop-Talaveron J, Badia-Tahull MB, Leiva-Badosa E. An inflammation-based prognostic score, the C-reactive protein/albumin ratio predicts the morbidity and mortality of patients on parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2018; 37 (5): 1575–83.
30. Oh TK, Song IA, Lee J.H. Clinical usefulness of C-reactive protein to albumin ratio in predicting 30-day mortality in critically ill patients: A retrospective analysis. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14977.
31. Golubev AM, Petrova MV, Grechko AV, Zaharchenko VE, Kuzovlev AN, Ershov AV. Molekuljarnye markery ishemicheskogo insul'ta. *Obshhaja reanimatologija*. 2019; 15 (5): 11–22. Russian.