

ПОЛТОРАК АЛЕКСАНДР ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДА СЕПСИСА У ПАЦИЕНТОВ
С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И РЕЦИПИЕНТОВ СОЛИДНЫХ
ОРГАНОВ: РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА**

3.1.14 - трансплантология и искусственные органы

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Савочкина Альбина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник хирургического отделения трансплантологии и диализа, профессор кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского».

Арзуманов Сергей Викторович – доктор медицинских наук, руководитель группы трансплантации и заместительной почечной терапии отдела общей и реконструктивной урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «27» декабря 2022 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте www.transpl.ru

Автореферат разослан « »

2022 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДСТИО 001.21

Кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Во второй половине XX века и до настоящего времени происходит стремительное развитие медицинских технологий, из которых можно выделить трансплантацию органов. В настоящее время в мире операции по пересадке солидных органов насчитывают десятки тысяч [Ватазин А.В., 2016].

В мире каждый год пересаживается более 120 000 солидных органов (почки, печень, сердце, легкие, поджелудочная железа и тонкий кишечник), а сепсис остается одной из преобладающих причин смерти среди реципиентов солидных органов [Abbott KC et al., 2001; Kalil AC, 2007].

Состояние иммунитета у пациента после трансплантации оказывается измененным, поэтому если инфекционный процесс не диагностируется на ранней стадии, то он может быстро приобрести диссеминированный характер и привести к летальному исходу [Готье С.В., 2010]. Повышенные показатели смертности могут быть результатом сильно ослабленного иммунитета из-за невозможности отмены поддерживающей иммуносупрессии [Schachtner T, 2017].

Сепсис является одной из самых обсуждаемых проблем современной медицины. Это связано, прежде всего, с увеличением частоты его возникновения и высокой смертностью, достигающей даже в ведущих клиниках 40% при сепсисе и 80-90% при септическом шоке [Долгушин И.И. и соавт., 2019; Полторак А.Е. и соавт., 2022].

Начиная с 1991 года и до 2016 годы трижды менялись представления о диагностических критериях и определении понятия «сепсис». Согласно новым дефинициям [Sepsis-3, 2016 год; Савочкина А.Ю. и соавт., 2022], основной причиной сепсиса является дисрегуляторный ответ организма на инфекцию [Куликов В.А. и соавт., 2012]. Дисрегуляторные нарушения при сепсисе могут наблюдаться, в частности, со стороны работы иммунной системы и непосредственно врожденного иммунитета.

Сегодня продолжают изучать новые биомаркеры сепсиса, связанные с изменениями в регуляции иммунной системы, а также возможность их реализации в виде мультимаркерных панелей [Faix JD, 2013], в которых необходимо определить правильную комбинацию.

При наличии таких моделей появится возможность прогнозировать течение и исход заболевания, а также корректировать лечение пациентов с сепсисом, в том числе пациентов с сепсисом после трансплантации.

Таким образом, после трансплантации особое значение имеет своевременная диагностика сепсиса и определение прогноза его развития, что требует разработки эффективных диагностических подходов к оценке состояния врожденного иммунитета, определяющих течение и исход сепсиса у больных после трансплантации.

Цель исследования

На основе анализа изменений показателей врожденного иммунитета разработать модель прогнозирования исхода сепсиса у больных различными заболеваниями и реципиентов солидных органов.

Задачи исследования

1. Сравнить показатели врожденного иммунитета (общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, уровень нейтрофильных внеклеточных ловушек, пептидиларгинин-деиминазы 4, прокальцитонина и цитокинов) в крови здоровых лиц и больных сепсисом с благоприятным и неблагоприятным исходом заболевания.

2. Сравнить динамику величины иммунологических показателей крови у пациентов с благоприятным и летальным исходом сепсиса.

3. Провести корреляционный анализ между значениями иммунологических показателей крови при сепсисе и выявить значимые взаимосвязи между ними, в зависимости от исхода.

4. Разработать модель прогноза исхода сепсиса у пациентов с различными заболеваниями и реципиентов солидных органов, основанную на результатах анализа иммунологических показателей крови.

Научная новизна

Получены новые знания о динамике изменения показателей врожденного иммунитета в зависимости от исхода сепсиса. Наиболее выраженные изменения иммунологических показателей регистрируются на третьи сутки заболевания.

Впервые определены взаимосвязи между показателями врожденного иммунитета в крови при сепсисе и получены новые данные, которые расширяют понимание патогенеза сепсиса и его исходов.

На основании многофакторной логистической регрессии и дискриминантного анализа разработаны математические модели, включающие иммунологические показатели, для прогноза исхода сепсиса. Выбрана наиболее удачная модель и апробирована на пациентах после трансплантации солидных органов.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы вносят большой вклад в понимание роли факторов врожденного иммунитета в защите организма при сепсисе.

Получен патент RU 2715557 от 02.03.2020 г. «Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови». Метод обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек открывает возможности изучения

данного показателя для диагностики не только сепсиса, но и других заболеваний, оценки тяжести течения болезней и эффективности лечения.

Использование математических моделей, на основании иммунологических показателей, позволит прогнозировать исход сепсиса, в том числе у пациентов после трансплантации солидных органов.

Методология и методы исследования

В исследовании приняли участие 20 условно здоровых лиц и 44 больных с сепсисом (20 женщин и 24 мужчины) в возрасте от 24 до 78 лет, а также 2 пациента после трансплантации трупной печени. Для выполнения поставленных задач пациенты с сепсисом были разделены на 2 группы в зависимости от исхода: в 1-ю группу (n=25) включены пациенты с благоприятным исходом, во 2-ю группу (n=19) – пациенты с летальным исходом. Материалом для исследования служила цельная периферическая кровь и сыворотка крови. В крови определяли общее количество лейкоцитов, нейтрофилов с подсчетом лейкоцитарной формулы и количества нейтрофильных внеклеточных ловушек. Нейтрофильные внеклеточные ловушки определяли согласно методике (патент RU 2715557 от 02.03.2020 г. «Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови»). Для изучения уровней прокальцитонина, пептидиларгининдеиминазы 4 и цитокинов использовали метод иммуноферментного анализа, который проводили на анализаторе Personal Lab (Adaltis, Италия).

Для проведения данного исследования применялись клинические, лабораторные и статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сепсис приводит к увеличению значений иммунологических показателей крови (общее количество лейкоцитов, нейтрофилов; уровни нейтрофильных внеклеточных ловушек, пептидиларгининдеиминазы 4, прокальцитонина и цитокинов). На первые сутки заболевания у больных с летальным исходом регистрируются более высокие уровни интерлейкинов (ИЛ 1 β , ИЛ 6, ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18 и ФНО- α) по сравнению с больными с благоприятным исходом. При благоприятном исходе сепсиса изначально высокие уровни иммунологических показателей к третьим суткам становятся ниже, тогда, как при летальном исходе на третьи сутки количество нейтрофильных внеклеточных ловушек увеличивается, а остальные показатели остаются на том же уровне.

2. Летальный исход сепсиса характеризуется потерей взаимосвязей между ИЛ 10 и другими иммунологическими показателями, а также

появлением корреляционной связи между ИЛ 18 и нейтрофильными внеклеточными ловушками.

3. Разработана модель прогноза исхода сепсиса на основе трех иммунологических показателей (НВЛ, ИЛ 18, PADI 4), которая имеет специфичность – 84,0%, чувствительность – 100%. Показана эффективность использования этой модели для прогноза исходов сепсиса у больных после трансплантации солидных органов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов в ходе научного исследования, закономерность выводов и практических рекомендаций определялись достаточным числом наблюдений, применением современных и разнообразных методов статистического анализа.

Апробация работы состоялась 29 сентября 2022 года на совместном заседании проблемной комиссии № 2, кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и сотрудников научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения работы изложены и обсуждены на XIV конференции иммунологов Урала с международным участием (Челябинск, 2017); на объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019); на научно-практической конференции «Аспирантские чтения-2019» (Челябинск, 2019).

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на осуществление научных исследований и разработок «Функциональная активность системы врожденного иммунитета в норме и при патологии» (2018-2020 гг.), № государственной регистрации АААА-А18-118021890009-1.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты, полученные в ходе данного исследования, используются в текущей практике отделения реанимации и интенсивной терапии №2 Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Челябинская

областная клиническая больница», а также используются в учебном процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации при проведении практических занятий и в курсе лекций.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Автор принимал непосредственное участие в определении цели, задач, разработки дизайна исследования, формулировки выводов и практических рекомендаций. Автором работы лично был проведен поиск и анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования. Автор самостоятельно набирал материал для исследования, проводил статистическую обработку полученных данных. Представление результатов исследования в докладах на конференциях и в научных публикациях выполнено автором лично и в соавторстве с научным руководителем.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (5 статей - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных), 1 публикация - в сборниках материалов всероссийской научной конференции. Получен патент РФ на изобретение.

Объем и структура работы

Работа изложена на 102 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Указатель литературы содержит 160 источников, в том числе 32 отечественных и 128 зарубежных. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 8 рисунками, содержит 3 формулы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач за период с 2014 по 2019 год на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России и кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России было проведено иммунологическое обследование 20 условно здоровых лиц и 44 пациентов с сепсисом, находившихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ Челябинской областной клинической больницы, а также 2-х пациентов после ортотопической трансплантации трупной печени. Диагноз выставлялся лечащим врачом либо врачом-реаниматологом в соответствии с действующей классификацией: Сепсис-2 либо Сепсис-3. Диагноз сепсиса был подтвержден микробиологическим исследованием. При бактериологическом посеве из раны и крови были выделены следующие микроорганизмы: *Acinetobacter baumannii* (63%), *Klebsiella pneumoniae* (45%), *Pseudomonas aeruginosa* (34%), *Escherichia coli* (31%), *Enterococcus faecium* (31%), *Enterococcus faecalis* (29%), *Proteus mirabilis* (15%), *Candida albicans* (13%), *Staphylococcus epidermidis* (13%), *Staphylococcus aureus* (9%), *Staphylococcus haemolyticus* (9%), *Candida glabrata* (4%), *Proteus vulgaris* (4%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4%), *Streptococcus viridans* (4%), *Enterobacter cloacae* (4%), *Staphylococcus hominis* (4%), *Citrobacter freundii* (2%), *Corynebacterium paurometabolum* (2%), *Klebsiella oxytoca* (2%), *Serratia marcescens* (2%), *Pasteurella multocida* (2%), *Staphylococcus saprophyticus* (2%). Хотелось бы отметить, что у 82% пациентов с сепсисом при бактериологическом посеве раны была выделена смешанная (Грам+ и Грам-) микрофлора, при этом высевалось 2 и более микроорганизмов. При бактериологическом посеве крови в подавляющем большинстве случаев встречалась моноинфекция.

Контрольную группу составили условно здоровые лица (n=20).

Антибактериальная терапия проводилась согласно результатам микробиологического исследования и с учетом чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Из 44 пациентов было 24 мужчины и 20 женщин. Возраст пациентов варьировал от 19 до 78 лет, средний возраст – 54,9 лет. В зависимости от исхода заболевания пациенты были разделены на две группы: в 1-ю группу (n=25) включены пациенты с благоприятным исходом, во 2-ю группу (n=19) – пациенты с летальным исходом.

Определено, что у пациентов с абдоминальным сепсисом заболевание протекает в более тяжелой форме (септический шок).

В зависимости от локализации сепсиса в исследование были включены 28 пациентов (63,3%) с абдоминальным сепсисом и 16 (36,7%) пациентов с экстраабдоминальными источниками инфекции. Установлено, что абдоминальный сепсис чаще заканчивается летальным исходом и протекает в более тяжелой форме.

Материалом для исследования функциональной активности нейтрофилов и уровня биологически активных веществ служили: цельная периферическая кровь и сыворотка крови.

Забор венозной крови у больных проводили в динамике: на первые и третьи сутки заболевания. У пациентов определяли общее количество лейкоцитов и нейтрофилов, уровни прокальцитонина, PADI 4, цитокинов и количество внеклеточных ловушек.

Для подсчета лейкоцитарной формулы (процентного соотношения различных видов лейкоцитов) микроскопировали сухие фиксированные и окрашенные по Романовскому – Гимзе мазки.

Прокальцитонин, PADI 4 и цитокины в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа, на анализаторе Personal Lab (Adaltis, Италия) с применением соответствующих тест-систем.

Для определения внеклеточных сетей из цельной периферической крови готовили мазок на стекле (аналогично мазку для лейкоцитарной формулы в общем анализе крови). Для фиксации мазка использовали 96%-ый этиловый спирт.

Фиксированный препарат окрашивали раствором азур-эозина по Романовскому в разведении 1:9, выдерживали 10-20 минут и промывали фосфатным буфером. Окрашенный препарат высушивали на воздухе.

Учет проводили с помощью светового микроскопа, используя иммерсионный объектив, масло иммерсионное для микроскопии, увеличение 40. Внеклеточная ДНК представлена тонкими фиолетово – красными нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизменного лейкоцита.

Проводили подсчет следующих морфологических групп: 1 группа объединяет клетки с сегментированным ядром, 2 группа включает клетки с U- или S-образным ядром, 3 группа – это клетки с недифференцированным ядром и к 4 группе относят свободнолежащие красно-фиолетовые волокна, представляющие собой нити ДНК. Проводили подсчет 100 структур разных групп и определяли процентное содержание каждой морфологической единицы

(патент RU 2715557 от 02.03.2020 г. «Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови»).

В ходе статистического анализа полученных данных использовали методы описательной статистики, выборочных сравнений, оценки диагностической эффективности и многомерные эксплораторные методы. Для описания количественных величин в качестве меры положения рассчитывали медиану (Me), а в качестве мер разброса использовали верхнюю и нижнюю квартили (Q1...Q3). Сравнение групп пациентов по количественным показателям проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Для построения моделей прогноза риска неблагоприятного исхода использовали множественную логистическую регрессию и линейный дискриминантный анализ. Для отбора наиболее перспективных предикторов использовали технологию построения «Случайного леса» (Random forest) из деревьев классификации и регрессии, в которой оценивали важность предиктора в 2, 3, 4 и 5 сочетаниях. Отобранные предикторы использовали далее в моделях логистической регрессии. Для дискриминантного анализа исходные данные трансформировали степенным преобразованием Бокса – Кокса, а отбор показателей в модель проводили прямой пошаговой техникой. Нормальность распределения преобразованных показателей проверяли критерием Шапиро – Уилка, а равенство ковариационных матриц в группах с различным исходом – с помощью M-критерия Бокса. Качество полученных моделей оценивали по статистической значимости эффектов отдельных предикторов ($P \leq 0,05$) и по диагностической эффективности (чувствительность и специфичность) всей модели. Расчёты выполнены в пакетах Statistica (version 8.0; StatSoft Inc.) и MedCalc (version 13.0; Medcalc Software LTD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ показателей врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с различным исходом заболевания

На первом этапе исследования проведен сравнительный анализ между иммунологическими показателями: общее количество лейкоцитов, нейтрофилов; уровни нейтрофильных внеклеточных ловушек, пептидиларгинин-деиминазы 4, прокальцитонина и цитокинов в периферической у больных с сепсисом в зависимости от исхода на 1-е и 3-е сутки. Результаты исследований представлены в таблицах 1 – 4.

Таблица 1 – Показатели врожденного иммунитета условно здоровых лиц и пациентов с сепсисом в зависимости от исхода на 1-е сутки, Me (LQ; UQ)

Показатель	Контрольная группа n=20	Пациенты с благоприятным исходом сепсиса (n=25)	Пациенты с летальным исходом сепсиса (n=19)	p
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	4,95 (4,45; 5,67)	11,8 (7,78; 14,9)	13,4 (9,70; 19,0)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
Нейтрофилы, %	59,0 (51,0; 64,3)	82,5 (77,0; 87,3)	86,0 (77,0; 90,0)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	2,99 (2,36; 3,43)	8,93 (6,14; 12,6)	11,8 (8,10; 14,3)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
НВЛ, %	1,50 (0,25; 2,00)	21,0 (10,5; 30,5)	18,0 (13,0; 25,0)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
РАDI 4, пг/мл	0,97 (0,50; 1,20)	34,6 (26,8; 53,4)	35,7 (28,5; 39,0)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
ПКТ, пг/мл	0,020 (0,008; 0,042)	599 (336; 1550)	1330 (594; 3960)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
ИЛ 1 β , пг/мл	1,53 (1,40; 1,80)	2,50 (1,90; 3,70)	3,60 (2,60; 6,70)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,009$
ИЛ 6, пг/мл	21,7 (19,9; 23,9)	77,3 (32,5; 175)	256 (129; 398)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,002$
ИЛ 8, пг/мл	16,8 (15,6; 18,1)	61,8 (34,7; 89,5)	133 (80,3; 255)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,001$
ИЛ 10, пг/мл	8,44 (7,90; 9,20)	20,5 (10,3; 43,4)	33,75 (18,0; 76,4)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,014$
ИЛ 18, пг/мл	271 (265; 283)	607 (452; 929)	980 (856; 1170)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,001$
ФНО- α , пг/мл	2,23 (2,10; 3,00)	6,91 (3,80; 13,2)	9,92 (6,43; 18,5)	$p^{\text{к-1,2}} < 0,001$
Примечание: $p^{\text{к-1,2}}$ – достоверность различий показателей больных с сепсисом и контрольной группы p^{1-2} – достоверность различий показателей у больных с сепсисом в зависимости от исхода				

Таблица 2 – Показатели врожденного иммунитета условно здоровых лиц и пациентов с сепсисом в зависимости от исхода на 3-и сутки, Me (LQ; UQ)

Показатель	Контрольная группа <i>n</i> =20	Пациенты с благоприятным исходом сепсиса (<i>n</i> =25)	Пациенты с летальным исходом сепсиса (<i>n</i> =19)	р
	К	1	2	
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	4,95 (4,45; 5,67)	9,25 (7,10; 13,2)	13,1 (10,3; 17,1)	$p^{k-1,2} < 0,001$
Нейтрофилы, %	59,0 (51,0; 64,3)	82,5 (77,0; 87,3)	85,0 (80,5; 90,5)	$p^{k-1,2} < 0,001$
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	2,99 (2,36; 3,43)	7,55 (5,37; 10,6)	10,7 (8,16; 14,7)	$p^{k-1,2} < 0,001$
НВЛ, %	1,50 (0,25; 2,00)	10,0 (8,0; 23,0)	37,0 (24,0; 51,0)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,001$
РАDI 4, пг/мл	0,97 (0,50; 1,20)	28,0 (25,0; 36,1)	34,6 (28,8; 51,8)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,022$
ПКТ, пг/мл	0,020 (0,008; 0,042)	368 (226; 423)	785 (354; 2960)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,044$
ИЛ 1 β , пг/мл	1,53 (1,40; 1,80)	1,90 (1,00; 2,70)	2,70 (2,20; 4,90)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,001$
ИЛ 6, пг/мл	21,7 (19,9; 23,9)	58,7 (32,7; 90,9)	206 (78; 328)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,001$
ИЛ 8, пг/мл	16,8 (15,6; 18,1)	50,7 (21,8; 89,1)	136 (76; 217)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,001$
ИЛ 10, пг/мл	8,44 (7,90; 9,20)	14,6 (8,59; 26,4)	32,3 (16,7; 92,8)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,002$
ИЛ 18, пг/мл	271 (265; 283)	598 (387; 819)	991 (953; 1280)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} < 0,001$
ФНО- α , пг/мл	2,23 (2,10; 3,00)	3,61 (1,35; 6,55)	6,43 (4,42; 17,5)	$p^{k-1,2} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,003$
Примечание: $p^{k-1,2}$ – достоверность различий показателей больных с сепсисом и контрольной группы p^{1-2} – достоверность различий показателей у больных с сепсисом в зависимости от исхода				

Таблица 3 – Сравнительный анализ показателей врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с благоприятным исходом в динамике заболевания, Me (LQ; UQ)

Показатель	Сутки заболевания	Пациенты с благоприятным исходом сепсиса (n=25)	p
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	1	11,8 (7,78; 14,9)	0,322
	3	9,25 (7,10; 13,2)	
Нейтрофилы, %	1	82,5 (77,0; 87,3)	0,914
	3	83,0 (77,0; 87,3)	
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	1	8,93 (6,14; 12,6)	0,698
	3	7,55 (5,37; 10,6)	
НВЛ, %	1	21,0 (10,5; 30,5)	0,346
	3	10,0 (8,0; 23,0)	
РАDI 4, пг/мл	1	34,6 (26,8; 53,4)	<0,01
	3	28,0* (25,0; 36,1)	
ИЛ 1 β , пг/мл	1	2,5 (1,9; 3,7)	0,015
	3	1,9* (1,0; 2,7)	
ИЛ 6, пг/мл	1	77,3 (32,5; 175)	0,03
	3	58,7* (32,7; 90,9)	
ИЛ 8, пг/мл	1	61,8 (34,7; 89,5)	0,587
	3	50,7 (21,8; 89,1)	
ИЛ 10, пг/мл	1	20,5 (10,3; 43,4)	0,028
	3	14,6* (8,59; 26,4)	
ИЛ 18, пг/мл	1	607 (452; 929)	0,032
	3	598* (387; 819)	
ФНО- α , пг/мл	1	6,91 (3,80; 13,2)	0,007
	3	3,61* (1,35; 6,55)	
ПКТ, пг/мл	1	599 (336; 1550)	0,003
	3	368* (226; 423)	
Примечание: * - статистически значимые отличия показателей в динамике у пациентов с сепсисом при благоприятном исходе			

Таблица 4 – Сравнительный анализ показателей врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с летальным исходом на 1-е и 3-и/последние сутки заболевания, Me (LQ; UQ)

Показатель	Сутки заболевания	Пациенты с летальным исходом сепсиса (n=19)	p
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	1	13,4 (9,7; 19,0)	0,76
	3/посл.	13,1 (10,3; 17,1)	
Нейтрофилы, %	1	86,0 (77,0; 90,0)	0,82
	3/посл.	85,0 (80,5; 90,5)	
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	1	11,8 (8,10; 14,3)	0,69
	3/посл.	10,7 (8,16; 14,7)	
НВЛ, %	1	18,0 (13,0; 25,0)	0,024
	3/посл.	37,0* (24,0; 51,0)	
РАDI 4, пг/мл	1	35,7 (28,5; 39,0)	0,52
	3/посл.	34,6 (28,8; 51,8)	
ИЛ 1 β , пг/мл	1	3,6 (2,6; 6,7)	0,981
	3/посл.	2,7 (2,2; 4,9)	
ИЛ 6, пг/мл	1	256 (129; 398)	0,277
	3/посл.	206 (78; 328)	
ИЛ 8, пг/мл	1	133 (80,3; 255)	0,809
	3/посл.	136 (76; 217)	
ИЛ 10, пг/мл	1	33,8 (18,0; 76,4)	0,872
	3/посл.	32,3 (16,7; 92,8)	
ИЛ 18, пг/мл	1	980 (856; 1170)	0,26
	3/посл.	991 (953; 1280)	
ФНО- α , пг/мл	1	9,92 (6,43; 18,5)	0,314
	3/посл.	6,43 (4,42; 17,5)	
ПКТ, пг/мл	1	1330 (594; 3960)	0,123
	3/посл.	785 (355; 2960)	
Примечание: * - статистически значимые отличия показателей в динамике у пациентов с сепсисом при летальном исходе			

Установлено, что у пациентов с сепсисом независимо от исхода и времени исследования все изучаемые показатели статистически значимо выше при сравнении с аналогичными показателями условно здоровых лиц. При благоприятном исходе сепсиса к 3-м суткам заболевания такие показатели как ИЛ 1 β , ИЛ 6, ИЛ 10, ИЛ 18, ФНО- α , РАDI 4, прокальцитонин снижаются. При летальном исходе сепсиса из всех изучаемых показателей достоверно значимым является увеличение НВЛ на 3-и сутки при сравнении с 1-ми сутками заболевания. Остальные иммунологические показатели в группе

больных с летальным исходом статистически значимо не менялись и оставались на уровне аналогичных иммунологических показателей на первые сутки заболевания.

При проведении сравнительного анализа между иммунологическими показателями крови у больных с сепсисом в зависимости от исхода установлено, что уровни ИЛ 1 β , ИЛ 6, ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18, ФНО- α были статистически значимо выше у больных с неблагоприятным исходом сепсиса. На 3-и сутки у пациентов с благоприятным исходом сепсиса происходит достоверное снижение почти всех анализируемых показателей, и НВЛ, РАDI 4, ПКТ, ИЛ 1 β , ИЛ 6, ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18, ФНО- α оказываются статистически значимо меньше, чем у больных в группе с летальным исходом. Полученные данные свидетельствуют о том, что факторы врожденного иммунитета имеют важное значение при сепсисе и влияют на исход заболевания.

Анализ взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета у пациентов с сепсисом

Результаты корреляционного анализа представлены в таблицах 5 – 8. Анализ взаимосвязей показал, что сепсис, закончившийся благоприятно, характеризуется наличием большего количества взаимосвязей. При этом количество сильных, статистически значимых корреляционных связей увеличивается по мере развития заболевания. На третьи сутки заболевания при благоприятном исходе сепсиса регистрируются взаимосвязи, которые отсутствуют при летальном исходе. Также при летальном исходе сепсиса появляются новые корреляционные зависимости, которые не свойственны при благоприятном исходе.

Таблица 5 – Взаимосвязи между показателями врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с благоприятным исходом на 1-е сутки заболевания

Пациенты с благоприятным исходом (n=25)		
Показатели	Коэффициент корреляции (ρ)	p
Лейкоциты– ИЛ 1	-0,392	0,053
ИЛ 1 – ИЛ 6	0,482	0,015
ФНО- α – ИЛ 18	0,428	0,033
Лейкоциты– ИЛ 10	0,421	0,036
ФНО- α – ИЛ 10	0,584	0,009
НВЛ–РАDI 4	0,401	0,047
Лейкоциты – НВЛ	0,599	0,002

Таблица 6 – Взаимосвязи между показателями врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с летальным исходом на 1-е сутки заболевания

Пациенты с летальным исходом (n=19)		
Показатель	Коэффициент корреляции (ρ)	p
ИЛ 1 – ИЛ 18	-0,531	0,019
ИЛ 6 – ИЛ 10	0,379	0,062
ИЛ 6 –РАDI 4	0,457	0,049
ФНО-α – ИЛ 18	0,419	0,074
НВЛ –ФНО-α	0,536	0,018
Лейкоциты – НВЛ	0,514	0,024

Таблица 7 – Взаимосвязи между показателями врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с благоприятным исходом на 3-и сутки заболевания

Пациенты с благоприятным исходом (n=25)		
Показатель	Коэффициент корреляции (ρ)	p
ИЛ 1 – ИЛ 6	0,511	0,009
ИЛ 6 – ИЛ 8	0,436	0,029
ИЛ 6 – ИЛ 18	0,412	0,041
ИЛ 8 – ИЛ 10	0,759	<0,001
НВЛ – лейкоциты	0,589	0,002
ИЛ 1 – ИЛ 8	0,56	0,004
ИЛ 6 – ИЛ 10	0,66	<0,001
ФНО-α – ИЛ 18	0,464	0,022

Таблица 8 – Взаимосвязи между показателями врожденного иммунитета при сепсисе у пациентов с летальным исходом на 3-и сутки заболевания

Пациенты с летальным исходом (n=19)		
Показатель	Коэффициент корреляции (ρ)	p
ИЛ 1 – ИЛ 6	0,649	0,003
ИЛ 6 – ИЛ 8	0,523	0,022
ИЛ 6 – ИЛ 18	0,456	0,05
НВЛ – лейкоциты	0,63	0,004
ИЛ 8 – ИЛ 18	0,486	0,035
ИЛ 8 – ПКТ	0,81	0,015
НВЛ – ИЛ 18	-0,611	0,005

Хотелось бы выделить корреляционные зависимости между ИЛ 10 и другими иммунологическими показателями. При благоприятном исходе сепсиса на 1-е сутки заболевания ИЛ 10 коррелировал с количеством лейкоцитов и ФНО- α , а на 3 –и сутки заболевания ИЛ 10 коррелировал с ИЛ 8 и ИЛ 6. При летальном исходе с ИЛ 10 статистически значимых взаимосвязей обнаружено не было.

ИЛ 10 является цитокином с противовоспалительными свойствами и играет центральную роль в развитии инфекции, ограничивая иммунный ответ на патогены и тем самым предотвращая повреждение хозяина [Rosales C, 2018]. Врожденные иммунные реакции должны жестко регулироваться, чтобы избежать гиперактивации и последующего воспалительного повреждения тканей хозяина при одновременном устранении вторгающихся патогенов. ИЛ 10 является важнейшим супрессором воспалительных изменений, а его продукция координирует врожденные иммунные реакции [Liao TL et al., 2021].

Во время инфекций отсутствие ИЛ 10 может сопровождаться иммунопатологическим повреждением тканей, которое наносит ущерб хозяину. Избыточное количество ИЛ 10 всегда приводит к инфекционным заболеваниям, вызванным меньшим выведением патогенов. Таким образом, точная регуляция врожденной экспрессии ИЛ 10 имеет первостепенное значение для гомеостаза хозяина и реакции на воспалительные сигналы.

Возможно, в связи с этим, потеря взаимосвязи ИЛ 10 с другими иммунологическими показателями крови при сепсисе отражает нарушение координации врожденных иммунологических реакций и, возможно, приводит к летальному исходу.

Хотелось бы отметить появление корреляционной связи между НВЛ и ИЛ 18 у больных в группе сепсиса с летальным исходом, которая не регистрируется в группе с благоприятным исходом. ИЛ 18 является одним из важных цитокинов, который играет большую роль в воспалении. Данные литературы свидетельствуют о том, что ИЛ 18 индуцирует образование НВЛ путем усиления притока кальция к нейтрофилам. Увеличенный приток кальция способствует активации активных форм кислорода с высвобождением внеклеточной нейтрофильной ДНК. Кроме того, ИЛ 18 индуцирует выработку цитруллинированных гистонов в нейтрофилах, что является необходимым условием формирования НВЛ [Lerman YV et al., 2015].

Рисунок взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета весьма сложен, а также зависит от большого количества разнонаправленных воздействий, и описать всю сеть корреляционных взаимодействий не представляется возможным [Лебедев К.А. и соавт., 2003].

Выявленные взаимосвязи свидетельствуют об изменении функционирования иммунной системы при сепсисе и требуют более глубокого изучения.

Применение иммунологических показателей для прогноза у больных сепсисом

Данные литературы, основанные на многочисленных исследованиях, свидетельствуют о том, что, вероятнее всего, ни один биомаркер не способен адекватно отражать быстро меняющийся характер состояния септического пациента, даже если его часто контролировать.

На предыдущих этапах нашего исследования был проведён анализ по отдельным показателям: ПКТ, PADI 4, внеклеточных ловушек и цитокинов в крови у больных сепсисом. По изучаемым показателям были выявлены статистически значимые различия, что дало возможность рассматривать их в качестве кандидатов для включения в модель для диагностики.

Так как показателей оказалось большое количество, то на первом этапе мы отобрали наиболее информативные показатели на основе техники построения «Случайного леса» (Random Forest) из деревьев классификации и регрессии [Полторак А.Е. и соавт., 2022].

Случайный лес – это алгоритм машинного обучения, придуманный ещё в прошлом веке. Данный метод создает деревья решений для случайно выбранных блоков данных, получает прогноз от каждого дерева и выбирает наилучшее решение.

Для построения деревьев классификации и их случайного леса были использованы следующие количественные показатели: ИЛ 1β, ИЛ 6, ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18, ФНО-α, PADI 4, НВЛ, ПКТ в периферической крови у больных с сепсисом на 1-е и 3-и сутки (для летального исхода – сутки, предшествующие смерти).

На рисунке 1 представлена диаграмма важности предикторов, построенная по результатам реализации алгоритма «Случайного леса» для разного числа входящих в модель предикторов: от 2 до 5. Чем выше важность предиктора, тем чаще данный показатель стоял в основе ветвлений дерева классификации и регрессии для диагностики исхода.

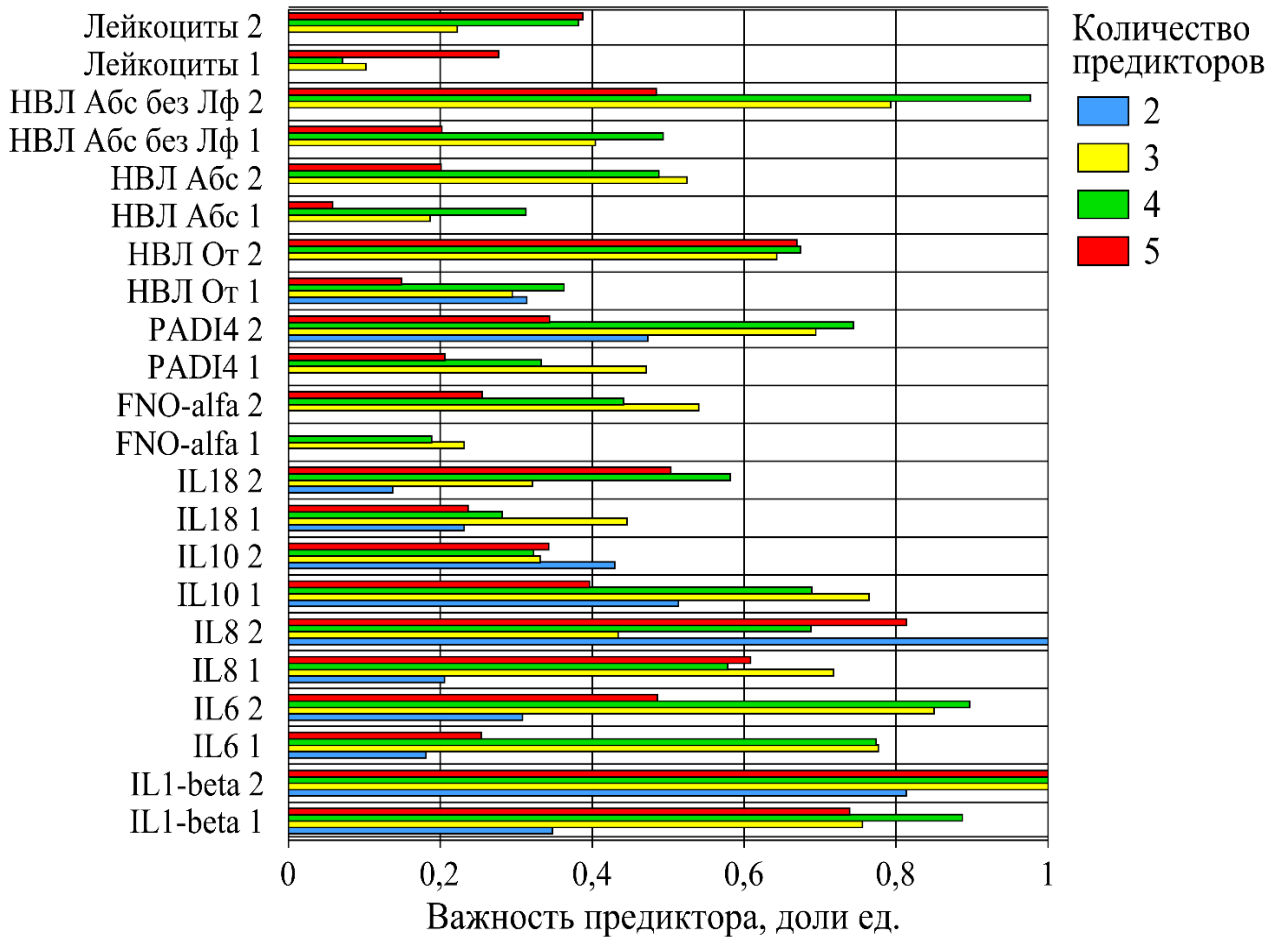


Рисунок 1 - Выявление наиболее информативных показателей исхода у пациентов с сепсисом методом «Случайного леса». Индекс 1 – первые сутки, индекс 2 – 3-и сутки (для летального исхода – сутки, предшествующие смерти): НВЛ Абс без Лф – Абсолютное количество нейтрофильных внеклеточных ловушек в периферической крови при пересчете на количество гранулоцитов от общего количества лейкоцитов

На основании проведенного анализа показано, что для всех показателей прогностическая ценность была выше на 3-и сутки. Наиболее эффективные модели были получены, когда использовали 3 показателя.

На втором этапе с использованием наиболее информативных показателей были построены несколько моделей множественной логистической регрессии. Модель, разработанная на основании множественной логистической регрессии, в которую вошли НВЛ, PADI 4, ИЛ 6 позволила верно классифицировать исходы у 86,4% пациентов и представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Параметры и характеристика модели 2 логистической регрессии для прогноза неблагоприятного исхода (n=44)

Показатели	Коэффициент регрессии ± стандартная ошибка	Отношение шансов [95% ДИ]	Оценка значимости <i>P</i>
НВЛ 3/последние сутки	0,12453 ± 0,050903	1,13 [1,03; 1,25]	0,014
PADI 4 3/последние сутки	0,059557 ± 0,032544	1,06 [1,00; 1,13]	0,067
ИЛ 6 3/последние сутки	0,013257 ± 0,0063731	1,01 [1,00; 1,03]	0,038
Константа	-6,9761	–	–
Модель полностью: $\chi^2_{ML}=34,23$; $df=3$; $P<0,0001$ Чувствительность: 88,0% [71,3; 96,5], Специфичность: 84,2% [63,6; 95,3] Диагностическая эффективность: 86,1% Доля, верно, классифицированных: 86,4% [74,0; 94,1] Площадь под ROC-кривой: 0,941 [0,826; 0,990]			

Дискриминантный анализ также позволил разработать модель прогноза. Предварительная проверка гистограмм распределения наших показателей показала, что они в большинстве случаев были с выраженной положительной асимметрией и существенно отличались от симметричного нормального распределения. Поскольку классический дискриминантный анализ является параметрической техникой, на первом этапе мы трансформировали наши исходные показатели с помощью преобразования Бокса – Кокса (Box–Cox transformation) [Полторак А.Е. и соавт., 2022]. Таким образом были преобразованы все исследуемые иммунологические показатели, и полученные значения использованы далее в дискриминантном анализе. При этом, поскольку число показателей было велико относительно объёма выборки, использовали прямую пошаговую технику автоматического отбора показателей, результаты которой корректировали далее самостоятельно. В итоге были получены следующие статистически значимые предикторы на третьи сутки заболевания для прогноза неблагоприятного исхода: ИЛ 18, НВЛ, PADI 4. Данная модель обладала 100%-ной чувствительностью: все пациенты с неблагоприятным исходом были верно расклассифицированы (таблица 10). Специфичность была ниже: 4 пациента из 25 были неверно отнесены к группе высокого риска.

Таблица 10 – Результаты дискриминантного анализа для выделения пациентов группы риска по исходу

Член модели: показатель	Коэффициент <i>a</i>	<i>F</i>-критерий (<i>df</i>=1/40)	Оценка значимости <i>P</i>
X_1 : ИЛ 18 3/посл. сутки	-0,61	20,28	0,0001
X_2 : PADI 4 3/посл. сутки	-534,9	6,98	0,0117
X_3 : НВЛ 3/посл. сутки	-0,84	11,37	0,0017
<i>Константа</i>	396,84		
Модель полностью: $F_{(3/40)}=20,27$; $P<0,0001$; Чувствительность: 100% (95% ДИ от 87,8 до 100,0) Специфичность: 84,0% (95% ДИ от 66,3 до 94,3) Диагностическая эффективность: 92,0%; Доля, верно, классифицированных: 90,9%.			

При сравнении двух моделей видно, что их специфичность очень близка, но чувствительность у модели, разработанной на основании дискриминантного анализа, составила 100% и была лучше, чем чувствительность модели, разработанной на основании логистической регрессии – 88,0%. Таким образом, используя статистические параметры, можно утверждать, что модель, разработанная на основе дискриминантного анализа, лучше, чем модель, разработанная на основе логистической регрессии.

Далее модель, разработанная на основании дискриминантного анализа, была апробирована на больных после трансплантации.

Было проанализировано 2 клинических случая с сепсисом после трансплантации трупной печени. У больных были определены уровни НВЛ, PADI 4, ИЛ 18 на 3-и сутки сепсиса, прогнозирован исход заболевания с использованием модели, разработанной на основании дискриминантного анализа. В обоих случаях был получен неблагоприятный прогноз исхода сепсиса, который подтвердился у данных больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе на основании иммунологических показателей у больных сепсисом была разработана модель прогноза исхода заболевания, которую рекомендовано использовать для больных после трансплантации органов. Предложенная диагностическая модель позволяет на основании иммунологических показателей (ИЛ 18, PADI 4, НВЛ) на 3-е сутки заболевания эффективно прогнозировать исход сепсиса у больных после трансплантации с высокой точностью. Это возможность своевременно выявлять больных с риском неблагоприятного исхода и корректировать их лечение.

ВЫВОДЫ

1. Среднее значение показателей врожденного иммунитета – общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, внеклеточных ловушек, уровней пептидиларгинин-деиминазы 4, прокальцитонина, ИЛ 1 β , ИЛ 6, ИЛ 8, ИЛ 10, ИЛ 18, ФНО- α , – у пациентов с сепсисом в 1-е сутки достоверно выше, чем у здоровых лиц; у больных с летальным исходом величина иммунологических показателей достоверно выше, чем у пациентов с благоприятным исходом сепсиса.

2. Динамика значений иммунологических показателей крови различается у пациентов с различным исходом сепсиса: при благоприятном исходе количество нейтрофильных внеклеточных ловушек, уровни пептидиларгинин-деиминазы 4, прокальцитонина и ИЛ 10 достоверно снижаются от первых к третьим суткам, тогда как при летальном исходе регистрируется увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек.

3. Корреляционный анализ выявил дисбаланс взаимосвязей между иммунологическими показателями крови в зависимости от исхода сепсиса. При летальном исходе сепсиса регистрируется отсутствие взаимосвязи между уровнем ИЛ 10 и другими иммунологическими показателями и наличие корреляционной связи между количеством внеклеточных ловушек и уровнем ИЛ 18.

4. Модель, основанная на анализе иммунологических показателей – количества нейтрофильных внеклеточных ловушек, концентрации ИЛ 18 и пептидиларгинин-деиминазы 4 в крови, – позволяет прогнозировать исход сепсиса у пациентов с различными заболеваниями и реципиентов солидных органов со специфичностью 84,0%, чувствительностью 100%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенная диагностическая модель, разработанная на основании дискриминантного анализа и с применением иммунологических показателей (ИЛ 18, РАDI 4, НВЛ), рекомендована для практического применения, так как позволяет эффективно прогнозировать исход заболевания у больных сепсисом, в том числе у больных сепсисом после трансплантации солидных органов. Это дает возможность своевременно выявлять больных с риском неблагоприятного исхода и корректировать их лечение.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Долгушин, И.И. Динамика изменений показателей функциональной активности нейтрофилов у больных с сепсисом с неблагоприятным исходом / И.И. Долгушин, Л.Р. Торопова, А.Ю. Савочкина, О.С. Абрамовских, Е.А. Четвернина, **А.Е. Полторак** // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11(20), №2. – С.295-296.

2) Савочкина, А.Ю. Сравнительный анализ показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных тяжелым сепсисом в зависимости от исхода / А.Ю. Савочкина, Л.Р. Пыхова, О.С. Абрамовских, **А.Е. Полторак**, Е.А. Четвернина // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12(21), №3. – С.407-411.

3) Долгушин, И.И. Сравнительный анализ показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных тяжелым сепсисом и септическим шоком / И.И. Долгушин, А.Ю. Савочкина, Л.Р. Пыхова, О.С. Абрамовских, Е.А. Четвернина, **А.Е. Полторак** // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13(22), №2. – С.236-238.

4) Савочкина, А.Ю. Исходы сепсиса, новый взгляд на старые проблемы / Савочкина А.Ю., Пыхова Л.Р., Абрамовских О.С., Четвернина **Е.А., Полторак А.Е.** // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24, №3. – С. 641-646.

5) Полторак, А.Е. Использование иммунологических показателей для создания модели прогноза исхода сепсиса на основе множественной логистической регрессии и дискриминантного анализа / **Полторак А.Е.**, Савочкина А.Ю. // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – №2. – С. 129 – URL: <https://science-education.ru/article/view?id=31668>.

6) Савочкина, А.Ю. Анализ взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета при сепсисе в зависимости от исхода / Савочкина А.Ю., **Полторак А.Е.**, Никушкина К.В., Зотова М.А. // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т.25, №2. – С. 267-270.

ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

1) Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови. Пат. №2715557 Российская Федерация. – №2019119629: заявл. 24.06.2019: опубл. 02.03.2020. Савочкина А.Ю., Пыхова Л.Р., Абрамовских О.С., Четвернина Е.А., **Полторак А.Е.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НВЛ (NET) – нейтрофильная внеклеточная ловушка (Neutrophil Extracellular Traps, NETs)

ФНО- α - фактор некроза опухоли альфа

ИЛ - интерлейкин

ПКТ – прокальцитонин

РАДИ 4 - пептидиларгинин-деиминаза 4