

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Айтбаев К.А.¹, Муркамилов И.Т.^{2,3}, Фомин В.В.⁴, Кудайбергенова И.О.², Юсупов Ф.А.⁵

НЕТОЗ КАК ФАКТОР, СПОСОБСТВУЮЩИЙ РАЗВИТИЮ И ПРОГРЕССИРОВАНИЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА И ЕГО МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, 720040, Бишкек, Кыргызстан²Кыргызская государственная медицинская академия имени И.К. Ахунбаева, 720020, Бишкек, Кыргызстан³ГОУ ВПО «Кыргызско-Российский славянский университет», 720000, Бишкек, Кыргызстан⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия⁵Ошский государственный университет, 723500, Ош, Кыргызстан

Нетоз — новая форма гибели клеток — привлекает в последние годы пристальное внимание исследователей из-за его двойственного влияния на патологический процесс. Будучи изначально защитной реакцией врожденной иммунной защиты, направленной на улавливание и обезвреживание проникших в организм патогенов (бактерий, вирусов и грибов), нетоз при его чрезмерной активации может, напротив, способствовать прогрессированию заболевания, вызывая аутоиммунизацию, повреждение окружающей ткани или возникновение атеротромботических событий. В этом обзоре представлены данные о том, что образование в процессе нетоза внеклеточных ловушек нейтрофилов, называемых NETs, играет важную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) и его микрососудистых осложнений. Например, при СД 1-го типа смерть β -клеток способствует секвестрации нейтрофилов в поджелудочную железу и четко коррелирует с увеличением нетоза. У пациентов с СД 2-го типа продукты высвобождения NETs также значительно повышены. Повышенный уровень dsDNA, маркера нетоза, коррелирует с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и диабетической болезнью почек, что также согласуется со способствующей ролью нетоза в патогенезе таких диабетических осложнений, как нарушение заживления ран и диабетическая ретинопатия. Механизмы, связывающие нетоз с высоким уровнем глюкозы, не совсем понятны, поскольку нетоз повышен и у пациентов с диабетом, которые строго контролируют уровень глюкозы. Можно лишь предполагать, что нетоз не является следствием нарушения гликемического контроля, а, напротив, вызывает гипергликемию, которая в еще большей степени повышает исходно высокий уровень нетоза у пациентов с диабетом.

Ключевые слова: нетоз; внеклеточные ловушки нейтрофилов; сахарный диабет; NADPH-оксидазы.

Для цитирования: Айтбаев К.А., Муркамилов И.Т., Фомин В.В., Кудайбергенова И.О., Юсупов Ф.А. Нетоз как фактор, способствующий развитию и прогрессированию сахарного диабета и его микрососудистых осложнений. *Клиническая медицина.* 2021;99(11–12):608–614. DOI: <http://dx.doi.org/10.30629/0023-2149-2021-99-11-12-608-614>

Для корреспонденции: Муркамилов Илхом Торобекович — e-mail: murkamilov.i@mail.ru

Aitbaev K.A.¹, Murkamilov I.T.^{2,3}, Fomin V.V.⁴, Kudaibergenova I.O.², Yusupov F.A.⁵

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETOSIS) AS A FACTOR CONTRIBUTING TO THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF DIABETES MELLITUS AND ITS MICROVASCULAR COMPLICATIONS

¹Scientific and Research Institute of Molecular Biology and Medicine, 720040, Bishkek, Kyrgyzstan²Kyrgyz State Medical Academy named after Akhunbaev I.K., 720020, Bishkek, Kyrgyzstan³Kyrgyz-Russian Slavic University, 720000, Bishkek, Kyrgyzstan⁴First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia⁵Osh State University, 723500, Osh, Kyrgyzstan

NETosis, a new form of cell death, has attracted close attention of researchers in recent years due to its dual effect on the pathological process. Being initially a defense reaction of the innate immune defence aimed at trapping and neutralizing pathogens (bacteria, viruses and fungi) that have invaded the body, NETosis, in case of excessive activation, has an opposite effect. It can contribute to the progression of the disease, causing autoimmunization, damage to surrounding tissue, or the occurrence of atherothrombotic events. This review presents data dealing with the formation of extracellular traps of neutrophils, called NETs. NETosis plays an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM) and its microvascular complications. For example, in type 1 DM, β -cell death promotes sequestration of neutrophils into the pancreas and is clearly correlated with increased NETosis. In patients with type 2 DM, the release is also significantly increased. High levels of dsDNA, a marker of NETosis, are correlated with the development of cardiovascular disease and DM caused kidney disease, which is also consistent with the contributing role of NETosis in the pathogenesis of diabetic complications such as impaired wound healing and diabetic retinitis. The mechanisms linking NETosis with high glucose levels are not clearly understood, as NETosis is also increased in diabetic patients strictly controlling glucose levels. One can only assume that NETosis is not a consequence of impaired glycemic control. On the contrary, it causes hyperglycemia, which further increases the initially high level of NETosis in patients with DM.

Keywords: NETosis; extracellular traps of neutrophils; diabetes; NADPH-oxidase.

For citation: Aitbaev K.A., Murkamilov I.T., Fomin V.V., Kudaibergenova I.O., Yusupov F.A. Neutrophil extracellular traps (NETosis) as a factor contributing to the development and progression of diabetes mellitus and its microvascular complications. *Klinicheskaya meditsina.* 2021;99(11–12):608–614. DOI: <http://dx.doi.org/10.30629/0023-2149-2021-99-11-12-608-614>

For correspondence: Ilhom T. Murkamilov — e-mail: murkamilov.i@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 20.09.2021

Полиморфноядерные нейтрофилы (ПЯН) играют центральную роль в реакциях врожденного иммунного ответа организма, составляя первую линию защиты от вторжения патогенов, таких как бактерии, грибы, простейшие и вирусы [1]. При инфицировании или воспалении ПЯН первыми из лейкоцитов мигрируют в поврежденные или инфицированные места, чтобы устранить вторгшиеся микроорганизмы с помощью таких цитотоксических механизмов, как фагоцитоз и деградация за счет синтеза активных форм кислорода (АФК), дегрануляция, или высвобождение антимикробных пептидов, и захват микробов с помощью так называемых внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs — neutrophil extracellular traps) [2].

NETs образуются в результате процесса, который был впервые описан в 1996 г. H. Takei и соавт. как новый способ гибели клеток, отличающийся от некроза и апоптоза [3]. Используя для выяснения взаимосвязи между активацией нейтрофилов и их последующей гибелью форбол-12-миристинат-13-ацетат (PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate) — мощный активатор нейтрофилов — авторы наблюдали в нейтрофилах, обработанных PMA, четкие морфологические изменения, начиная со слияния многодольчатого ядра, за которым следовало снижение конденсации хроматина, а вскоре после этого — разрушение ядерной оболочки с сохранением цитоплазматических органелл. В 2004 г. V. Brinkmann и соавт. интерпретировали этот необычный процесс гибели клеток и назвали его «нетоз» [4].

Нетоз — важный процесс врожденного иммунного ответа, который может вызываться как инфекционными, так и «стерильными» стимулами, такими как цитокины, кристаллы холестерина, мононатриевой мочевой кислоты, иммунные комплексы и аутоантитела [5–8]. Кроме того, показано, что нетоз играет роль в адаптивном иммунном ответе [9], а также стимулирует иммунную систему при воспалительных реакциях [10, 11].

В процессе нетоза происходит высвобождение NETs, которые представляют собой большие сетчатые структуры, состоящие из длинных липких нитей, гистоновых белков и гранулярных компонентов [4]. NETs предотвращают миграцию внеклеточных патогенов, нейтрализуют и убивают бактерии, грибы, вирусы и паразитов [2]. NETs в конечном итоге удаляются из внеклеточной среды либо посредством поглощения макрофагами через активный процесс эндоцитоза, либо с помощью ДНКазы I — эндонуклеазы, которая расщепляет хроматин внутри NETs [12, 13]. Несмотря на положительное влияние формирования NETs на клиренс патогенов, появляется все больше доказательств того, что чрезмерное образование NETs может вносить вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит [14], системную красную волчанку [15], васкулиты и, в послед-

нее время, диабет [14, 16, 17]. В данной статье мы рассматриваем и обсуждаем основные механизмы нетоза, а также его роль в патогенезе сахарного диабета (СД) и вызванных им микрососудистых осложнений.

Модели нетоза

На сегодняшний день описаны три модели нетоза: 1) суицидный нетоз; 2) витальный нетоз с высвобождением ядерной ДНК; 3) витальный нетоз с высвобождением митохондриальной ДНК [18]. Если при суицидном нетозе высвобождение ядерного содержимого приводит к гибели клетки, то при витальных нетозах продолжительность жизни нейтрофилов, а также их способность фагоцитировать патогены сохраняются [19].

Наиболее изучен обычный суицидный нетоз. В этой модели нейтрофилы сначала активируются связыванием лиганда с toll-подобными рецепторами нейтрофилов и рецепторами для IgG-Fc, комплемента или цитокинов [20]. После активации эндоплазматический ретикулум высвобождает накопленные ионы кальция в цитоплазму [20]. Увеличение цитозольных катионов кальция в свою очередь активирует путь протеинкиназы C (PKC)/Raf/MEK/ERK, что приводит к фосфорилированию gp91phox для активации комплекса NADPH-оксидаза (NOX, NADPH oxidase) и последующего образования АФК. Цитозольные катионы Ca^{2+} также действуют как кофакторы для пептидиларгинин-деиминазы 4 (PAD4, peptidyl arginine deaminase 4), фермента, который катализирует гидролиз пептидиларгинина с образованием пептидилцитруллина на гистонах. Этот процесс, называемый цитруллинированием гистонов, способствует потере положительных зарядов, необходимых для взаимодействия гистонов с ДНК, и, следовательно, ведет к деконденсации хроматина [21, 22]. При суицидном нетозе АФК действуют как вторичные мессенджеры, способствующие транслокации нейтрофильной эластазы (NE, neutrophil elastase) и миелопероксидазы (MPO, myeloperoxidase) из азурофильных гранул в ядро. NE гидролизует гистоны, чтобы нарушить упаковку хроматина, тогда как MPO связывает хроматин и синергетически с NE, способствует деконденсации хроматина [23]. В результате усиливается процесс постепенного разделения и потери ядерной мембраны, которая распадается на более мелкие отдельные пузырьки. Деконденсированный хроматин затем связывается с цитоплазматическими белками и другими внутриклеточными гранулами. Наконец ДНК высвобождается в виде внеклеточных ловушек, вторичных по отношению к клеточному лизису, захватывая в конечном итоге экзогенные бактерии [21, 22, 24–26].

Роль нетоза в патогенезе СД 1-го типа

Показано, что подавление функции нейтрофилов и формирования NETs замедляет развитие СД 1-го типа

[27]. В экспериментальных моделях СД 1-го типа физиологическая гибель β -клеток вызывала привлечение и активацию клеток В-1а (CD5+), нейтрофилов и плазматоидных дендритных клеток (pDC, plasmacytoid dendritic cells) в поджелудочную железу. Впоследствии дцДНК (двухцепочечная ДНК) — специфические IgG секретируются активированными клетками В-1а, стимулируя нейтрофилы высвобождать ДНК-связывающий кателицидин — родственный антимикробный пептид (CRAMP, cathelicidin-related antimicrobial peptide), который связывает собственную ДНК. Собственная ДНК, дцДНК-специфические IgG и пептид CRAMP затем активировали pDC, что приводило к продукции интерферона- α . Также гистологический анализ подтвердил присутствие NETs, связанных с высвобождением CRAMP [27]. Аналогичного характера исследование, проведенное с участием 107 взрослых пациентов с впервые диагностированным СД 1-го типа и 21 ребенка со стойкими островковыми аутоантителами и семейным анамнезом СД 1-го типа, выявило значительно более низкое содержание в крови количества нейтрофилов по сравнению с контрольными субъектами того же возраста и пола. Примечательно, что у всех испытуемых не было лабораторных признаков острой инфекции [28]. Дальнейшие исследования, направленные на понимание механизма нарушения гомеостаза нейтрофилов при СД 1-го типа, показали, что снижение уровня нейтрофилов в периферической крови было вызвано не нарушением выхода нейтрофилов из костного мозга или нарушением их дифференцировки, а скорее увеличением секвестрации нейтрофилов в ткань поджелудочной железы [29]. В последующих работах была сделана попытка связать нетоз при СД 1-го типа с гибелью β -клеток. Выполненные в этом направлении исследования показали, что уровни циркулирующих протеиназы 3 (PR3, proteinase 3) и NE и их ферментативные активности были значительно повышены у пациентов с СД 1-го типа, особенно у пациентов с длительностью заболевания менее 1 года по сравнению с контрольными субъектами того же возраста и пола. Увеличение содержания NE и PR3 положительно коррелировало с ростом числа и титров аутоантител против антигенов β -клеток. В соответствии с повышенными уровнями NE и PR3, у пациентов с СД 1-го типа наблюдалось заметное увеличение циркулирующих комплексов МРО-ДНК по сравнению со здоровыми субъектами. В совокупности эти наблюдения дают основание полагать, что увеличение уровней циркулирующих белков NE и PR3 может быть связано с усиленным образованием внеклеточных ловушек нейтрофилов [30].

Для дальнейшего понимания связи между NE, PR3 и началом СД 1-го типа были изучены изменения экспрессии NE и PR3 у мышей с диабетом без ожирения в возрасте от 2 до 30 нед. Результаты исследований показали, что ферментативная активность циркулирующих NE и PR3 была значительно повышена и поддерживалась до начала СД. Интересно, что активность NE/PR3 у диабетических мышей постепенно снижалась до исходного уровня, что, скорее всего, является следствием прекра-

щения аутоиммунного ответа после полного разрушения β -клеток [30]. Эти данные подтверждают роль нетоза в патогенезе β -клеточного аутоиммунитета и выделяют NE и PR3 в качестве чувствительных биомаркеров для диагностики СД 1-го типа.

Роль нетоза в патогенезе СД 2-го типа

Учитывая, что развитие нетоза связано с воспалением, а пациенты с СД 2-го типа характеризуются состоянием хронического воспаления низкой степени, процесс образования NETs был оценен в сыворотке крови 38 пациентов с СД 2-го типа и 38 контрольных субъектов, не страдающих диабетом того же возраста и пола [31]. Пациенты с СД 2-го типа демонстрировали повышенное содержание продуктов нетоза, включая эластазу нейтрофилов, моно- и олигонуклеосомы и бесклеточную дцДНК, по сравнению с контрольными лицами. Примечательно, что наблюдалась положительная корреляция между HbA1c и моно- и олигонуклеосомами, в то время как дцДНК коррелировала с наличием нефропатии и сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, было показано, что сывороточные концентрации интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), маркеров системного воспаления низкой степени, которые также являются индукторами NETs, были повышены у пациентов с СД 2-го типа по сравнению с контрольными лицами и положительно коррелировали с концентрациями дцДНК [31]. Также сообщалось, что высокий уровень глюкозы (25 ммоль/л) значительно увеличивал скорость нетоза и высвобождение NETs *in vitro* с PMA и без него по сравнению с 5 ммоль/л глюкозы и 25 ммоль/л маннита [31]. Чтобы оценить эффект метаболического контроля, нетоз был повторно оценен у пациентов с диабетом после лечения метформином (500–2500 мг/день) [32]. Несмотря на восстановление уровней глюкозы и HbA1c до нормальных значений после 6 мес. лечения метформином, NET-структуры, нуклеосомы и комплексы NE-dsDNA все еще присутствовали в плазме пациентов с диабетом. Эти функциональные ответы нейтрофилов восстановились до нормального уровня лишь после 12 мес. лечения без изменения количества нейтрофилов в течение этого периода. При этом нейтрофилы у пациентов с диабетом на момент постановки диагноза имели повышенные уровни базальной продукции NETs по сравнению с контрольными лицами. Интересно, что нейтрофилы от пациентов с диабетом не реагировали на дальнейшую стимуляцию PMA или TNF- α , как нейтрофилы здоровых доноров. Это подтверждает тот факт, что нейтрофилы у пациентов с СД уже обладают повышенной базальной продукцией NETs и не способны в дальнейшем подвергаться нетозу [32]. Вместе с тем данное исследование впервые показало, что, несмотря на нормализацию уровня глюкозы, уровень нетоза остается повышенным. В этой связи можно предположить, что повышенное образование NETs не является следствием нарушения гликемического контроля.

Чтобы дополнительно оценить влияние метформина на нетоз, продукты NETs оценивались в плазме пациентов с преддиабетом, которым случайным образом на-

значали метформин или плацебо в течение 2 мес. Кроме того, чтобы контролировать влияние глюкозы, компоненты NETs также оценивались в плазме пациентов с СД 2-го типа до и после лечения дапаглифлозином или инсулином [33]. Через 2 мес. лечения у пациентов в группе метформина наблюдалось значительное снижение концентраций дцДНК, эластазы нейтрофилов, протеиназы-3 и гистонов по сравнению с пациентами в группе плацебо. Примечательно, что никаких изменений уровня глюкозы или чувствительности к инсулину не наблюдалось. Более того, у пациентов, которые начали базальную терапию инсулином или дапаглифлозином, циркулирующие биомаркеры не были значительно снижены после 3 мес. лечения по сравнению с исходным уровнем. Эти наблюдения предполагают, что наблюдаемые эффекты метформина на нетоз не зависят от контроля глюкозы. В исследованиях *in vitro* метформин значительно подавлял нетоз в нейтрофилах, стимулированных ПМА и иономицином. Кроме того, метформин предотвращал транслокацию через мембрану изоформы протеинкиназы С-бета II (PKC-βII, protein kinase C-beta II isoform), которая является медиатором индуцированных гипергликемией хронических осложнений, а также подавлял активацию NADPH-оксидазы в нейтрофилах, являющейся критически важной стадией NOX-зависимого нетоза [33]. Эти данные подчеркивают, что ингибирование нетоза — это новый многообещающий фармакологический эффект, который может оказывать метформин.

Весьма важные результаты получены и в других исследованиях по изучению роли нетоза в патогенезе диабета. Так, было показано, что экспрессия PAD4, ключевого фермента в деконденсации хроматина и опосредовании нетоза, была значительно повышена у пациентов с СД 1-го или 2-го типа по сравнению со здоровыми лицами из контрольной группы [16]. Кроме того, у пациентов с СД 2-го типа базальные уровни кальция были заметно повышены, а внутриклеточные уровни кальция положительно коррелировали с уровнями глюкозы сыворотки крови натощак [34]. Поскольку кальций индуцирует образование активных форм кислорода и PAD4-опосредованное цитруллинирование гистонов с последующей деконденсацией хроматина, то эти данные еще раз свидетельствуют об его важной роли в формировании NET-структур. Кроме того, было показано, что нетоз метаболически нуждается в глюкозе [35]. Данный факт свидетельствует о том, что повышенный уровень глюкозы ассоциирован с нетозом на многих уровнях.

Роль нетоза в патогенезе микрососудистых осложнений, вызванных СД

Нейропатия. По сообщениям, нетоз вовлечен и в развитие осложнений, вызванных диабетом. Так, показано, что NETs влияют на заживление диабетических ран, которые часто встречаются у диабетических пациентов с дистальной симметричной полинейропатией (DSP, distal symmetric polyneuropathy) [16, 36–40]. При исследовании иссеченных кожных ран у мышей с диабетом наблюдались более высокие уровни цитруллинированного

гистона H3 (H3Cit), маркера нетоза, а заживление ран происходило с задержкой по сравнению с мышами дикого типа (WT, wild type) с нормальным гликемическим индексом. В то же время ДНКаза I, фермент, участвующий в разрушении NETs, ускорял заживление ран как у мышей с СД, так и мышей WT. Для дальнейшего подтверждения роли нетоза в заживлении ран были использованы мыши с нокаутом фермента протеин-аргининдеиминаза (Padi4 -/-). В отличие от повышенного уровня сигналов H3Cit, который был обнаружен в ранах мышей WT, H3Cit не выявлялся в ранах от мышей Padi4 -/-, несмотря на нормальное рекрутирование нейтрофилов.

Примечательно, что мыши Padi4 -/- не обладали клиническими признаками инфекции, а заживление их ран было ускоренным. Это можно объяснить тем обстоятельством, что у мышей Padi4 -/-, несмотря на снижение уровня нетоза, другие функции нейтрофилов, такие как фагоцитоз, остаются неизменными. Интересно отметить, что ускоренное заживление ран сохранялось при индуцировании СД 1-го типа у мышей Padi4 -/-. Данный факт позволяет предположить, что СД задерживает заживление ран, активируя нетоз. Таким образом, был сделан вывод о том, что ингибирование PAD4, а также активирование фермента ДНКазы I могут служить в качестве новых потенциальных терапевтических подходов к заживлению ран [16]. Данный вывод полностью нашел подтверждение в результатах последующих экспериментальных исследований. Так, ингибирование PAD4 с помощью СI-амидина уменьшало образование NETs и способствовало заживлению ран у мышей с СД [38], а ингибирование PKC-βII также предотвращало чрезмерное производство NETs у мышей с диабетом и способствовало ускоренному заживлению ран [40]. Интересно, что PKC-βII тесно коррелировала с фосфорилированием p47phox, активируя таким образом NADPH-оксидазу и способствуя продукции АФК [41].

Чтобы подтвердить эти доклинические данные, необходимо было установить у пациентов с диабетом влияние нетоза на замедленное заживление ран. С использованием в этих целях протеомики было обнаружено, что количество продуктов NET повышается при длительно незаживающих язвах диабетической стопы человека (DFU, *diabetic foot ulcers*). Более того, поскольку DFU ассоциированы с системным воспалением, биомаркеры нетоза оценивались в кровотоке пациентов с диабетической язвой стопы по сравнению с подобранными пациентами с СД, но без DFU. В результате было обнаружено, что компоненты NETs, включая эластазу, гистоны, липокалин (связанный с желатиназой нейтрофилов) и протеиназу-3, повышены в крови пациентов с язвами диабетической стопы. Кроме того, было показано, что высокие концентрации эластазы и протеиназы-3 сыворотки крови были связаны с инфекцией, в то же время сывороточная эластаза служила и предиктором замедленного заживления ран [38]. В совокупности эти данные означают, что нетоз задерживает заживление DFU.

В соответствии с этими выводами недавнее исследование выявило высокие уровни продуктов NETs в сыво-

ротках пациентов с диабетической стопой [42]. Заживление ран также значительно замедлялось у мышей с СД, лишенных рецептора лептина (LepRdb/db), что сопровождалось высокими уровнями NETs по сравнению с контрольными мышами с нормогликемией (LepRm+/db). Кроме того, уровни дцДНК, PAD4 и цитруллинированного гистона H3 были существенно повышены в модели нетоза, индуцированного PMA *in vitro*. Важно отметить, что исследование впервые продемонстрировало значительное ингибирование нетоза с помощью сероводорода (H₂S) — эндогенной сигнальной молекулы с антиоксидантным действием, что привело к ускоренному заживлению ран у мышей LepRdb/db. Ингибирующий эффект H₂S на продукцию NETs был связан с блокированием ROS-индуцированной активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), ERK1/2 и p38 сигнальных путей, участвующих в процессе нетоза [42].

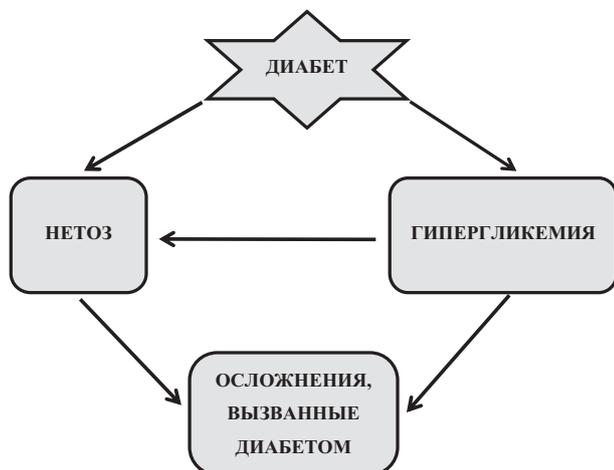
Ретинопатия. Считается, что помимо нейропатии нетоз связан с развитием диабетической ретинопатии, поскольку воспаление было идентифицировано в качестве ключевого фактора в возникновении этого микрососудистого осложнения. В исследовании «случай–контроль» эта гипотеза связи нейропатии с нетозом нашла фактическое подтверждение: маркеры образования NETs, включая уровни циркулирующего ДНК-гистонового комплекса и полиморфноядерной эластазы нейтрофилов, были повышены у пациентов с диабетической ретинопатией по сравнению с пациентами с диабетом без ретинопатии. Интересно, что многомерный логистический регрессионный анализ, скорректированный на уровни глюкозы в крови натощак и HbA_{1c}, показал, что маркеры образования NETs являются значимыми независимыми факторами риска ретинопатии [43]. Эти наблюдения подчеркивают значимость NETs как потенциальной терапевтической мишени при диабетической ретинопатии.

Как указывалось выше, образование NETs связано с генерацией АФК, индуцированной NADPH-оксидазой. Так, когда нейтрофилы, изолированные от здоровых людей, подвергали воздействию увеличивающихся концентраций глюкозы, предварительно нагруженных 2', 7'-дихлорфлуоресцеина диацетатом (DCFH-DA) и дигидроэтидием (DHE), то они демонстрировали повышенные уровни АФК. Данный факт означает, что образование NETs связано с индуцированным гипергликемией перепроизводством АФК. Соответственно, предварительная обработка либо дифенилиодом, либо апоцинином — ингибиторами NADPH-оксидазы, уменьшала образование NETs и высвобождение внеклеточной ДНК в нейтрофилах, подвергшихся воздействию высокого уровня глюкозы [44]. Кроме того, NETs обнаруживались в сыворотках пациентов с диабетической ретинопатией независимо от стадии заболевания [44]. Как отмечалось в предыдущих исследованиях по заживлению ран, эти результаты предполагают, что NADPH-оксидаза имеет решающее значение в продукции NETs при диабетической ретинопатии, индуцированной высокой глюкозой.

Другие микрососудистые осложнения. Помимо установленной роли нетоза в заживлении ран и ретинопатии, появляется все больше данных в пользу того, что образование NETs является фактором риска и для других микрососудистых осложнений. Недавнее исследование показало, что сывороточный уровень комплекса МПО-ДНК, маркера NETs, был повышен у пациентов с хорошо контролируемым СД 2-го типа, получавших несколько (≥ 3) противодиабетических препаратов, по сравнению с пациентами, получавшими меньше их число (< 3). При этом уровни комплекса МПО-ДНК в сыворотке положительно коррелировали с клиническими и лабораторными параметрами, включая ИМТ и альбумин мочи, которые, как известно, являются маркерами риска таких микрососудистых осложнений, как диабетическая нефропатия или диабетическое заболевание почек [45]. Эти данные свидетельствуют о том, что образование NETs может служить маркером риска почечных осложнений, вызванных диабетом, у пациентов с хорошим контролем гликемии. Несмотря на эти наблюдения, необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять роль NETs в патогенезе диабетической нефропатии. Но тем не менее роль NADPH-оксидазы в микрососудистых осложнениях, вызванных диабетом, в частности диабетической нефропатии, хорошо задокументирована [46–51]. Поскольку при нейропатии и ретинопатии нетоз и формирование NETs сильно зависят от NADPH-индуцированной продукции АФК, можно выдвинуть гипотезу о том, что нетоз можно рассматривать как ключевой фактор в возникновении и развитии диабетической болезни почек. Однако важно отметить, что влияние NADPH-оксидазы на другие заболевания может различаться. Например, ранее было показано, что NADPH-оксидаза 4 (NOX4) обеспечивает защиту сердца от хронического стресса, вызванного нагрузкой, и имеет большое значение для полного развития эксцентрической гипертрофии сердца и ремоделирования сердца во время хронической перегрузки объемом [52, 53]. Кроме того, было показано, что NOX4 оказывает антиатеросклеротическое действие, следовательно, ингибиторы NOX4 следует тщательно оценивать на предмет возможного развития побочных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы [54].

Заключение

В обзоре подчеркивается важная роль, которую играет нетоз в патогенезе СД и его микрососудистых осложнений (см. рисунок). В частности, показано, что нетоз, или процесс образования NETs активируется широким спектром провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, особенно при СД, который характеризуется состоянием хронического воспаления слабой степени. Также представлены данные о том, что ряд окислительно-восстановительных путей, включая пути NADPH-оксидазы, ответственны за развитие ключевых патологических событий, связанных с микрососудистыми осложнениями, вызванными диабетом. Этим самым признается роль АФК, индуцированных



Предполагаемая взаимосвязь между гипергликемией и осложнениями, вызванными диабетом

NADPH-оксидазой, как возможного моста между нетозом и сахарным диабетом. Дальнейшие исследования, направленные на лучшее понимание точных механизмов, лежащих в основе связи нетоза с гипергликемией, будут важным шагом не только к идентификации нетоза в качестве возможного маркера прогрессирования диабета, но и к раскрытию вероятных терапевтических преимуществ (в частности, для использования в целях персонализированной медицины) нацеливания на нетоз в контроле прогрессирования микрососудистых осложнений, вызванных диабетом [55].

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rosales C., Lowell C.A., Schnoor M., Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:1–2. Article ID 9748345. DOI: 10.1155/2017/9748345
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18:134–147. DOI .10.1038/nri.2017.105
- Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;59:229–240. DOI: 10.1002/jlb.59.2.229
- Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews: Microbiology*. 2007;5:577–582. DOI: 10.1038/nrmicro1710
- Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J. et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS ONE*. 2012;7:e48111. DOI: 10.1371/journal.pone.0048111
- Schorn C., Janko C., Latzko M., Chaurio R., Schett G., Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:277. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00277
- Behnen M., Leschczyk C., Moller S., Batel T., Klingner M., Solbach W., Laskay T. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIb and Mac-1. *Journal of Immunology*. 2014;193:1954–1965. DOI: 10.4049/jimmunol.1400478
- Yalavarthi S., Gould T.J., Rao A.N., Mazza L.F., Morris A.E., Nunez-Alvarez C. et al. Release of neutrophil extracellular traps by

- neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheumatology*. 2015;67:2990–3003. DOI: 10.1002/art.39247
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C. & Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews: Immunology*. 2011;11:519–531. DOI: 10.1038/nri3024
- Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*. 2011;3:73ra20. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001201
- Semeraro F., Ammolto C.T., Morrissey J.H., Dale G.L., Friese P., Esmon N.L. et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011;118:1952–1961. DOI: 10.1182/blood-2011-03-343061
- Hakim A., Furnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *PNAS*. 2010;107:9813–9818. DOI: 10.1073/pnas.0909927107
- Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *Journal of Immunology*. 2013;191:2647–2656. DOI: 10.4049/jimmunol.1300436
- Corsiero E., Pratesi F., Prediletto E., Bombardieri M. & Migliorini P. NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:485. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00485
- Cooper M.E., Vranes D., Youssef S., Stacker S.A., Cox A.J., Rizkalla B. et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*. 1999;48:2229–2239. DOI: 10.2337/diabetes.48.11.2229
- Wong S.L., Demers M., Martinod K., Gallant M., Wang Y., Goldfine A.B. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*. 2015;21:815–819. DOI: 10.1038/nm.3887
- Qin J., Fu S., Speake C., Greenbaum C.J., Odegard J.M. NETosis associated serum biomarkers are reduced in type 1 diabetes in association with neutrophil count. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016;184:318–322. DOI: 10.1111/cei.12783
- Delgado-Rizo V., Martinez-Guzman M.A., Iniguez-Gutierrez L., Garcia-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:81. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081
- Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122:2784–2794. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671
- Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:302. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00302
- Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207:1853–1862. DOI: 10.1084/jem.20100239
- Lewis H.D., Liddle J., Coote J.E., Atkinson S.J., Barker M.D., Bax B.D. et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nature Chemical Biology*. 2015;11:189–191. DOI: org/10.1038/nchembio.1735
- Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakim A. & Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*. 2010;191:677–691. DOI: 10.1083/jcb.201006052
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532–1535. DOI: org/10.1126/science.1092385
- Neeli I., Khan S.N., Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *Journal of Immunology*. 2008;180:1895–1902. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1895
- Neeli I., Dwivedi N., Khan S. & Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *Journal of Innate Immunity*. 2009;1:194–201. DOI: 10.1159/000206974
- Diana J., Simoni Y., Furio L., Beaudoin L., Agerberth B., Barrat F., Lehen A. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine*. 2013;19:65–73. DOI: 10.1038/nm.3042
- Harsunen M.H., Puff R., D’Orlando O., Giannopoulou E., Lachmann L., Beyerlein A. et al. Reduced blood leukocyte and neutrophil

- numbers in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Hormone and Metabolic Research*. 2013;45:467–470. DOI: 10.1055/s-0032-1331226
29. Valle A., Giamporcaro G.M., Scavini M., Stabilini A., Grogan P., Bianconi E. et al. Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*. 2013;62:2072–2077. DOI: 10.2337/db12-1345
 30. Wang Y., Xiao Y., Zhong L., Ye D., Zhang J., Tu Y. et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with beta-cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63:4239–4248. DOI: 10.2337/db14-0480
 31. Menegazzo L., Ciciliot S., Poncina N., Mazzucato M., Persano M., Bonora B. et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*. 2015;52:497–503. DOI: 10.1007/s00592-014-0676-x
 32. Carestia A., Frechtel G., Cerrone G., Linari M.A., Gonzalez C.D., Casais P. et al. NETosis before and after hyperglycemic control in type 2 diabetes mellitus patients. *PLoS ONE*. 2016;1:e0168647. DOI: 10.1371/journal.pone.0168647
 33. Menegazzo L., Scattolini V., Cappellari R., Bonora B.M., Albiero M., Bortolozzi M. et al. The antidiabetic drug metformin blunts NETosis in vitro and reduces circulating NETosis biomarkers in vivo. *Acta Diabetologica*. 2018;55:593–601. DOI: 10.1007/s00592-018-1129-8
 34. Alexiewicz J.M., Kumar D., Smogorzewski M., Klin M., Massry S.G. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function. *Annals of Internal Medicine*. 1995;123:919–924. DOI: 10.7326/0003-4819-123-12-199512150-00004
 35. Rodriguez-Espinosa O., Rojas-Espinosa O., Moreno-Altamirano M.M., Lopez-Villegas E.O., Sanchez-Garcia F.J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology*. 2015;145:213–224. DOI: 10.1111/imm.12437
 36. Forbes J.M., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*. 2013;93:137–188. DOI: 10.1152/physrev.00045.2011
 37. Callaghan B.C., Price R.S., Feldman E.L. Distal symmetric polyneuropathy: a review. *JAMA* 2015;314:2172–2181. DOI: 10.1001/jama.2015.13611
 38. Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A. et al. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. *Diabetes*. 2016;65:1061–1071. DOI: 10.2337/db15-0863
 39. Volmer-Thole M., Lobmann R. Neuropathy and diabetic foot syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(6):917. DOI: 10.3390/ijms17060917
 40. Das S.K., Yuan Y.F. & Li M.Q. Specific PKC beta II inhibitor: one stone two birds in the treatment of diabetic foot ulcers. *Bioscience Reports*. 2018;38:BSR20171459. DOI: 10.1042/BSR20171459
 41. Fontayne A., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. 2002;41:7743–7750. DOI: 10.1021/bi011953s
 42. Yang C.T., Chen L., Chen W.L., Li N., Chen M.J., Li X. et al. Hydrogen sulfide primes diabetic wound to close through inhibition of NETosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2019; 480:74–82. DOI: 10.1016/j.mce.2018.10.013
 43. Park J.H., Kim J.E., Gu J.Y., Yoo H.J., Park S.H., Kim Y.I. et al. Evaluation of circulating markers of neutrophil extracellular trap (NET) formation as risk factors for diabetic retinopathy in a Case-Control Association Study. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2016;124:557–561. DOI: org/10.1055/s-0042-101792
 44. Wang L., Zhou X., Yin Y., Mai Y., Wang D., Zhang X. Hyperglycemia induces neutrophil extracellular traps formation through an NADPH oxidase-dependent pathway in diabetic retinopathy. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:3076. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03076
 45. Miyoshi A., Yamada M., Shida H., Nakazawa D., Kusunoki Y., Nakamura A. et al. Circulating neutrophil extracellular trap levels in well-controlled Type 2 diabetes and pathway involved in their formation induced by high-dose glucose. *Pathobiology*. 2016;83:243–251. DOI: 10.1159/000444881
 46. Eid A.A., Gorin Y., Fagg B.M., Maalouf R., Barnes J.L., Block K., Abboud H.E. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. *Diabetes*. 2009;58:1201–1211. DOI: 10.2337/db08-1536
 47. Eid A.A., Ford B.M., Block K., Kasinath B.S., Gorin Y., Ghosh-Choudhury G. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 37503–37512. DOI: 10.1074/jbc.M110.136796
 48. Eid A.A., Lee D.Y., Roman L.J., Khazim K., Gorin Y. Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression. *Molecular and Cellular Biology*. 2013;33:3439–3460. DOI: 10.1128/MCB.00217-13
 49. Eid A.A., Ford B.M., Bhandary B., de Cassia Cavaglieri R., Block K., Barnes J.L. et al. Mammalian target of rapamycin regulates Nox4-mediated podocyte depletion in diabetic renal injury. *Diabetes*. 2013;62:2935–2947. DOI: 10.2337/db12-1504
 50. Eid S., Boutary S., Braych K., Sabra R., Massaad C., Hamdy A. et al. mTORC2 signaling regulates Nox4-induced podocyte depletion in diabetes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2016;25:703–719. DOI: 10.1089/ars.2015.6562
 51. Eid S.A., El Massry M., Hichor M., Haddad M., Grenier J., Dia B. et al. Targeting the NADPH oxidase-4 and liver X receptor pathway preserves Schwann cell integrity in diabetic mice. *Diabetes*. 2020;69:448–464. <https://doi.org/10.2337/db19-0517>
 52. Zhang M., Brewer A.C., Schröder K., Santos C.X.C., Grievé D.J., Wang M. et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *PNAS*. 2010;107:18121–18126. DOI: 10.1073/pnas.1009700107
 53. Schnelle M., Sawyer I., Anilkumar N., Mohamed B.A., Richards D.A., Toischer K. et al. NADPH oxidase-4 promotes eccentric cardiac hypertrophy in response to volume overload. *Cardiovascular Research*. 2019;117(1) [epub]. DOI: 10.1093/cvr/cvz331
 54. Schürmann C., Rezende F., Kruse C., Yasar Y., Löwe O., Fork C. et al. The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *European Heart Journal*. 2015;36:3447–3456. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv460
 55. Behravan A. Challenging role of neutrophil extracellular traps in vascular complications of diabetes mellitus. *Integr. Mol. Med.* 2018;5(3):1–5. DOI:10.15761/IMM.1000330

Поступила 20.09.2021

Информация об авторах

Айтбаев Кубаныч Авенович (Aitbaev Kubanych A.) — д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории патологической физиологии НИИ молекулярной биологии и медицины, член правления Общества специалистов по хронической болезни почек Кыргызстана, <https://orcid.org/0000-0003-4973-039X>

Муркамилов Илхом Торобекович (Murkamilov Pkhom T.) — канд. мед. наук, исполняющий обязанности доцента кафедры факультетской терапии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева; старший преподаватель ГОУ ВПО «Кыргызско-Российский славянский университет», нефролог, председатель правления Общества специалистов по хронической болезни почек Кыргызстана, <https://orcid.org/0000-0001-8513-9279>

Фомин Виктор Викторович (Fomin Viktor V.) — д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой факультетской терапии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, проректор по клинической работе и дополнительному профессиональному образованию, ПМГМУ им. И.М. Сеченова, <https://orcid.org/0000-0002-2682-4417>

Кудайбергенова Индира Орозобаевна (Kudaibergenova Indira O.) — д-р мед. наук, профессор, ректор Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева, <https://orcid.org/0000-0003-3007-8127>

Юсупов Фуркат Абдулахатович (Yusupov Furkat A.) — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии, нейрохирургии и психиатрии медицинского факультета Ошского государственного университета, член правления Общества специалистов по хронической болезни почек Кыргызстана, главный невролог Южного региона Кыргызстана, [https:// orcid.org/0000-0003-0632-6653](https://orcid.org/0000-0003-0632-6653)