

© Коллектив авторов, 2025
УДК [616.379-008.64-06-092+616.155.34]:612.017.1
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2025.20067>
ISSN – 2073-8137

Особенности формирования внеклеточных ловушек в ответ на стимуляцию нейтрофильных лейкоцитов тромбином у больных сахарным диабетом и различными вариантами диабетического поражения стоп

И. В. Друк¹, Д. Г. Новиков¹, А. Н. Золотов¹, Н. А. Кириченко¹,
Е. А. Кирх¹, А. Ю. Савочкина², В. В. Ходус³, Е. А. Сорокина³

¹ Омский государственный медицинский университет, Российская Федерация

² Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Российская Федерация

³ Клиническая медико-санитарная часть № 9, Омск, Российская Федерация

Features of extracellular trap formation in response to neutrophil leukocyte stimulation by thrombin in patients with diabetes mellitus and various types of diabetic foot damage

Druk I. V.¹, Novikov D. G.¹, Zolotov A. N.¹, Kirichenko N. A.¹,
Kirkh E. A.¹, Savochkina A. Yu.², Khodus V. V.³, Sorokina E. A.³

¹ Omsk State Medical University, Russian Federation

² South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

³ Clinical Medical Unit № 9, Omsk, Russian Federation

Определяли способность к формированию внеклеточных ловушек клетками крови в составе фракций мононуклеарных клеток и гранулоцитов у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа, осложнённым синдромом диабетической стопы без (n=10) и с нейроостеоартропатией Шарко (n=8). В мононуклеарной фракции пациентов обнаружено 15–30 % нейтрофилов низкой плотности, в группе контроля (n=12) их доля была минимальной. Спонтанное и стимулированное тромбином образование нитевидных внеклеточных ловушек было наиболее выражено у больных нейроостеоартропатией. В этой группе выявлено также повышение уровня интерлейкина-8 (в 4,4 раза) и цитруллинированного гистона H3 (в 5,7 раза) по сравнению с группой контроля. Полученные данные свидетельствуют о вероятной роли воспаления, опосредованного нейтрофилами низкой плотности, в патогенезе нейроостеоартропатии.

Ключевые слова: сахарный диабет, синдром диабетической стопы, нейроостеоартропатия, нейтрофилы низкой плотности, нетоз, нейтрофильные внеклеточные ловушки, цитруллинированный гистон H3, интерлейкин-8, C-реактивный белок

We determined the ability of extracellular traps to be formed by blood cells in fractions of mononuclear cells and granulocytes in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic foot syndrome without (n=10) and with Charcot neuro-osteoarthropathy (n=8). The mononuclear cell fraction of patients contained 15–30 % of low-density neutrophils (LDNs), whereas their proportion in the control group (n=12) was minimal. Spontaneous and thrombin-stimulated formation of filamentous extracellular traps was most pronounced in patients with neuro-osteoarthropathy. Furthermore, this group exhibited a significant increase in the levels of interleukin-8 (4.4-fold) and citrullinated histone H3 (5.7-fold) compared to the control group. The obtained data indicate a probable role of LDN-mediated inflammation in the pathogenesis of Charcot neuro-osteoarthropathy.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot syndrome, neuro-osteoarthropathy, low-density neutrophils, netosis, neutrophil extracellular traps, citrullinated histone H3, interleukin-8, C-reactive protein

Для цитирования: Друк И. В., Новиков Д. Г., Золотов А. Н., Кириченко Н. А., Кирх Е. А., Савочкина А. Ю., Ходус В. В., Сорокина Е. А. Особенности формирования внеклеточных ловушек в ответ на стимуляцию нейтрофильных лейкоцитов тромбином у больных сахарным диабетом и различными вариантами диабетического поражения стоп. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2025;20(4):313–320. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2025.20067>

For citation: Druk I. V., Novikov D. G., Zolotov A. N., Kirichenko N. A., Kirkh E. A., Savochkina A. Yu., Khodus V. V., Sorokina E. A. Features of extracellular trap formation in response to neutrophil leukocyte stimulation by thrombin in patients with diabetes mellitus and various types of diabetic foot damage. *Medical News of North Caucasus*. 2025;20(4):313–320. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2025.20067> (In Russ.)

ВЛ	–	внеклеточные ловушки	LDN	–	low density neutrophils (нейтрофилы низкой плотности)
НВЛ	–	нейтрофильные внеклеточные ловушки	MoETs	–	monocyte extracellular traps (внеклеточные ловушки моноцитов)
НОА	–	нейроостеоартропатия	NADPH	–	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (никотинамидадениндинуклеотид фосфат)
СД	–	сахарный диабет	NETs	–	neutrophil extracellular traps (нейтрофильные внеклеточные ловушки)
СД1	–	сахарный диабет 1 типа	NOA	–	neuro-osteoarthropathy (нейроостеоартропатия)
СД2	–	сахарный диабет 2 типа	PAD4	–	peptidyl arginine deiminase 4 (пептидиларгининдеминаза 4)
СДС	–	синдром диабетической стопы	PADI4	–	peptidyl arginine deiminase 4 gene (ген пептидиларгининдеминазы 4)
СРБ	–	С-реактивный белок	T1DM	–	Type 1 Diabetes Mellitus (сахарный диабет 1 типа)
CitH3	–	citruullinated histone H3 (цитруллинированный гистон H3)	T2DM	–	Type 2 Diabetes Mellitus (сахарный диабет 2 типа)
DAMPs	–	damage-associated molecular patterns (паттерны молекулярных структур, ассоциированные с повреждением)			
DFS	–	diabetic foot syndrome (синдром диабетической стопы)			
IL-8	–	interleukin-8 (интерлейкин-8)			

Сахарный диабет (СД) является хроническим заболеванием, сопряженным с высоким риском развития поздних осложнений, которые значительно повышают тяжесть течения заболевания и смертность пациентов [1]. Одним из наиболее серьезных и распространенных осложнений является синдром диабетической стопы (СДС) [2]. СДС – это ведущая причина госпитализации среди пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД2) [2]. Частота встречаемости СДС составляет от 4 % до 15 % [2]. Необходимость в ампутации стопы у пациентов с СД2 в 30–40 раз выше по сравнению с пациентами, не страдающими СД, а пятилетняя смертность после ампутации оценивается в диапазоне от 39 % до 68 % [2].

Роль полинейропатии в патогенезе синдрома диабетической стопы (СДС) подтверждается эпидемиологическими данными – именно она служит ключевым звеном в развитии этого осложнения у половины пациентов [2]. Поздние стадии СДС часто включают развитие диабетической нейроостеоартропатии (НОА), известной как стопа Шарко, которая характеризуется стерильной деструкцией костей и суставов [2]. Вследствие сенсомоторной нейропатии этот деструктивный процесс часто протекает безболезненно, что значительно усложняет раннюю диагностику [2]. Патфизиологические концепции НОА подчеркивают центральную роль нейроваскулярных нарушений, а также активацию систем, регулирующих костный метаболизм, таких как фактор транскрипции NF-κB и система цитокинов RANK/RANKL/OPG [2]. В последние годы активно изучается роль нетоза – новой формы гибели клеток, специфичной для нейтрофилов [1, 3]. Этот процесс приводит к высвобождению нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), представляющих собой волокнистую сеть, состоящую из деспирализованной хроматиновой ДНК с фиксированными на ней противомикробными белками [1]. Клинические исследования показывают, что у пациентов с СД продукты высвобождения НВЛ значительно повышены [3] и коррелируют с наличием таких осложнений, как нарушение заживления ран, диабетическая ретинопатия и атеросклероз [1, 3].

Таким образом, диабетическая НОА является стерильным воспалительно-деструктивным процессом [2], а нетоз играет важную роль в диабетическом повреждении тканей [3]. Следовательно, оценка его вклада в патогенез стопы Шарко критически важна. Это открывает перспективы для разработки терапии, направленной, в том числе, на процесс нетоза при синдроме диабетической стопы [1].

Цель исследования: определить способность к *ex vivo* формированию внеклеточных ловушек клетками мононуклеарной и гранулоцитарной фракций крови

и уровни цитруллинированного гистона H3 (CitH3), С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина-8 (IL-8) в крови у пациентов с сахарным диабетом, осложненным СДС, с наличием и отсутствием нейроостеоартропатии Шарко.

Материал и методы. Критерии включения в исследование: возраст пациентов обоего пола старше 18 лет, ранее верифицированный сахарный диабет 1 (СД1) или 2 типа (СД2), подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии невключения: наличие или даже подозрение на наличие злокачественных новообразований, критическая ишемия стоп, тромбофлебит нижних конечностей, уровень HbA1c > 10%, наличие ВИЧ-инфекции, туберкулеза, отсутствие информированного согласия. В исследование поперечного среза в соответствии с общими критериями включения/невключения были включены 18 пациентов (10 женщин, 8 мужчин; медиана возраста – 62,0 [52,0; 66,75] года; стаж диабета – 18,0 [12,0; 23,75] лет), поступивших на стационарное лечение в центр критической ишемии конечностей и диабетической стопы в период с апреля по август 2025 года. Пациенты были распределены на 2 группы: группа с синдромом диабетической стопы и язвенным дефектом стоп: группа СДС (n=10; мужчин – 6; СД2 – 10); группа с нейроостеоартропатией – группа НОА (n=8; мужчин – 1; СД2 – 7; СД1 – 1). В группу контроля вошли здоровые волонтеры (n=12; мужчин – 7; медиана возраста – 56,0 [47,75; 62,75] лет); критерии включения для данной группы: отсутствие соматических заболеваний, в том числе СД; критерии невключения: те же, что у пациентов с СД. Текущая терапия СД2 была представлена, согласно клиническим рекомендациям, пероральными сахароснижающими препаратами (групп бигуаниды, производные сульфонилмочевины, ингибиторы дипептидилпептидазы-4, ингибиторы натрийзависимого переносчика глюкозы 2 типа) и инсулинотерапией по принципу базис-болус.

После разделения клеток крови методом центрифугирования в фиколл-верографиневом градиенте ($p_1=1,077$; $p_2=1,105$ г/мл) был проведен анализ состава фракций – мононуклеаров и гранулоцитов. Клеточные популяции дважды отмывали физиологическим раствором. Концентрацию клеток в суспензиях, приготовленных из каждой фракции, доводили до значения 5000 клеток. Препараты окрашивали по методу Романовского – Гимзы. Исследование образцов осуществляли на световом микроскопе, оснащенный иммерсионным объективом, при тысячекратном увеличении. Контроль качества выделения подтвердил, что во фракции гранулоцитов в группе контроля присутствовали исключительно нейтрофильные лейкоциты.

Изучали особенности формирования внеклеточных ловушек клетками, находящимися в слое мононукле-

аров и в слое гранулоцитов, вне действия стимулятора (спонтанный нетоз) и после 30 мин инкубации взвеси клеток с тромбином (индуцированный нетоз). Для индукции образования НВЛ использовали «Тромбин-реагент» из «Набора реагентов для определения тромбинового времени ПГ-9» (НПО «Ренам», Россия) с активностью тромбина в рабочем растворе 3 МЕ/мл. Соотношение стимулятора к объему стимулируемых клеток 1:10.

Для визуализации клеток и внеклеточных структур микропрепараты из фракций гранулоцитов и мононуклеаров, приготовленные по методу «раздавленной капли», окрашивали интеркалирующим красителем – пропидия йодидом. Микроскопию проводили с использованием комбинированного освещения: флуоресценции от ртутной лампы, возбуждаемой в диапазоне 450–480 нм и регистрируемой выше 515 нм для детекции ДНК-позитивных объектов, и в проходящем свете от галогеновой лампы для оценки общей морфологии клеток. В образцах гранулоцитарной фракции рассчитывали процентное содержание (относительное количество) облаковидных и нитевидных нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) относительно общего числа всех зарегистрированных объектов, к которым относили как люминесцентно-позитивные структуры (НВЛ, клетки раннего нетоза, активированные нейтрофилы), так и люминесцентно-негативные (интактные нейтрофилы). Аналогичный подсчет выполняли для фракции мононуклеарных клеток с той лишь разницей, что обнаруженные там нитевидные и облаковидные ДНК-содержащие структуры идентифицировали как внеклеточные ловушки (ВЛ). Данная терминология связана с методическим ограничением, не позволяющим установить – происходят ли ВЛ от мононуклеаров или от нейтрофилов низкой плотности (рис. 1).

Концентрации цитруллинированного гистона Н3 (CitH3), С-реактивного белка (СРБ) и интерлейкина-8 (IL-8) определяли в образцах сыворотки венозной крови, полученной в соответствии с актуальными требованиями к преаналитическому этапу лабораторного исследования. Для определения концентрации CitH3 использовали тест-систему Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3) ELISA Kit (Cayman Chemical, США). Для определения концентрации СРБ использовали высокочувствительный метод: тест-система «СРБ-ИФА-БЕСТ высокочувствительный» («Вектор-Бест», Россия). Если концентрация СРБ в исследуемом образце превышала 10 МЕ/л, то образец анализируют

повторно после дополнительного разведения в 10 раз, с последующим умножением полученных значений в этом образце на 10. IL-8 определяли при помощи тест-системы «ИНТЕРЛЕЙКИН-8 – ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Результаты регистрировали на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad, США). Определение аналитов проводили в полном соответствии с инструкциями производителей тест-систем.

Поскольку распределение всех анализируемых показателей в сравниваемых группах существенно отклонялось от нормального, статистический анализ проводили с применением непараметрических методов. Данные представлены как медиана с указанием межквартильного диапазона (25-й и 75-й процентиля). Для выявления статистически значимых различий между группами контроля, СДС и НОА был использован критерий Краскела – Уоллиса с последующим попарным апостериорным анализом (post hoc). При сравнении выборок между независимыми группами по качественным признакам использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса. Все расчеты выполняли в среде IBM SPSS Statistics 23 и Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Пациенты группы СДС в сравнении с группой НОА были старше по возрасту. По остальным характеристикам группы не различались (табл. 1).

Следует отметить, что общая концепция патогенеза осложнений СД строится на роли хронического низкоинтенсивного воспаления, в условиях которого активируются процессы формирования НВЛ (нетоз), системной гемокоагуляции, приводящие к деструкции тканей и микрососудистой окклюзии [4–7]. Однако в литературе не выделяются специфические особенности или биомаркеры нетоза, наблюдаемые исключительно при диабетической НОА. Кроме того, представляется обоснованной попытка использовать тромбин в качестве стимулятора нетоза у таких больных, что является элементом научной новизны. Хроническое воспаление и гипергликемия при СД способствуют изменению функций нейтрофилов. У пациентов с СД анализ клеточного состава фракции мононуклеаров показал существенное увеличение процентного отношения нейтрофилов, доля которых достигала 15–30 % (рис. 2). В литературных источниках клетки с такой морфологией и плотностью идентифицируются как нейтрофилы низкой плотности (LDN – low density neutrophils), их появление в моноцитарном кольце является одним из маркеров

дисрегуляции воспалительного процесса. У пациентов с СД2 наблюдается значительное повышение циркулирующих LDN [4], которые обладают большей способностью к формированию НВЛ [5, 6] и продукции провоспалительных цитокинов [8] в сравнении с нейтрофилами нормальной плотности. В противоположность этой находке, в наблюдаемой нами группе здоровых добровольцев уровень LDN оставался в пределах 1 %, что соотносится с опубликованными ранее значениями нормального процентного отношения LDN, которое не превышает 2 % от общей популяции нейтрофилов [9, 10].

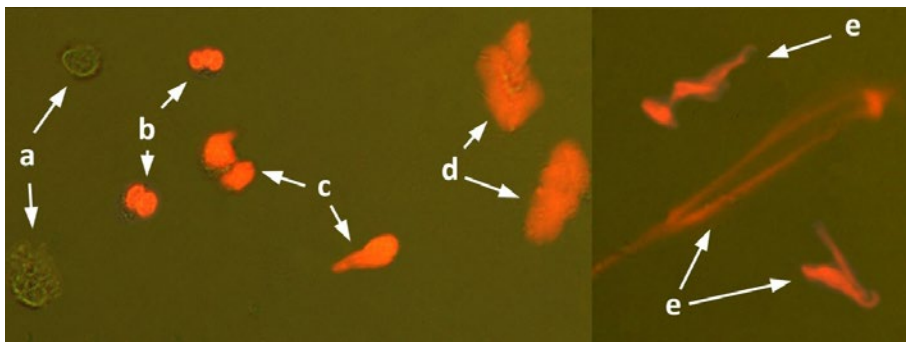


Рис. 1. Морфология клеток и внеклеточных ловушек в препаратах, выделенных из фракций гранулоцитов и мононуклеаров.

Примечание. Микрофотографии различных стадий активации нейтрофилов и формирования внеклеточных ловушек: люминесцентно-негативные – (а) интактные нейтрофилы; люминесцентно-позитивные – (б) активированные нейтрофилы; (с) клетки раннего нетоза; (д) облаковидные внеклеточные ловушки; (е) нитевидные внеклеточные ловушки. Окраска йодидом пропидия, визуализация люминесцентной микроскопией. Ув. $\times 600$

Таблица 1

Характеристика исследуемых групп

Показатель	Группа СДС, n=10	Группа НОА, n=8	Уровень значимости различий
Возраст, Ме [Q1; Q3]	65,00 [62,50; 71,50]	51,50 [48,50; 59,00]	U 12,50; p=0,016
Мужчин, абс	6	1	χ^2 2,46; p=0,117
СД1, абс	0	1	χ^2 0,44; p=0,506
ИМТ, кг/м ² , Ме [Q1; Q3]	31,51 [26,13; 34,41]	31,94 [29,59; 35,63]	U 37,00; p=0,824
Стаж СД, лет, Ме [Q1; Q3]	17,50 [12,00; 21,00]	21,00 [14,25; 26,50]	U 29,00; p=0,351
Стаж диабетического поражения стоп, лет, Ме [Q1; Q3]	4,00 [4,00; 5,75]	6,50 [4,50; 13,50]	U 26,50; p=0,248
Нейропатическая форма, абс	0	4	χ^2 2,17; p=0,141
Нейроишемическая форма, абс	10	4	χ^2 2,17; p=0,141
Д. ретинопатия, абс	6	5	χ^2 0,14; p=0,705
Д. нефропатия, абс	8	8	χ^2 0,01; p=0,921
Д. нейропатия, абс	10	8	χ^2 0,36; p=0,549
АССЗ, абс	10	5	χ^2 0,86; p=0,353
ГБ, абс	10	8	χ^2 0,36; p=0,549
ХСН, абс	8	7	χ^2 0,04; p=0,832
Поражение стоп одностороннее, абс	2	1	χ^2 0,04; p=0,832
Малая ампутация в анамнезе, абс	5	3	χ^2 0,00; p=0,958
Большая ампутация в анамнезе, абс	1	0	χ^2 0,45; p=0,503
Индекс коморбидности Чарлсона	4,00 [4,00; 4,00]	3,50 [3,00; 4,00]	U 23,00; p=0,143
НbA1c, %, Ме [Q1; Q3]	7,00 [6,65; 9,23]	7,40 [6,00; 8,85]	U 37,50; p=0,859
Холестерин общий, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	4,60 [3,33; 4,88]	3,60 [3,30; 4,33]	U 30,00; p=0,399
Холестерин ЛПНП, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	2,99 [1,84; 3,14]	2,17 [1,84; 2,69]	U 28,00; p=0,307
ТГ, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	1,65 [1,23; 1,80]	1,80 [1,45; 2,28]	U 30,50; p=0,424
Холестерин ЛПВП, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	1,03 [0,87; 1,10]	0,80 [0,74; 0,94]	U 18,50; p=0,062
СОЭ, мм/ч, Ме [Q1; Q3]	49,00 [29,75; 54,50]	37,00 [28,75; 58,00]	U 38,00; p=0,894
Лейкоциты, абс x 10 ⁹ /л, Ме [Q1; Q3]	9,05 [8,53; 10,18]	7,65 [6,05; 9,38]	U 27,50; p=0,286
Нb, г/л, Ме [Q1; Q3]	116,00 [99,50; 118,00]	94,50 [86,25; 112,25]	U 21,00; p=0,100
Тромбоциты, абс x 10 ⁹ /л, Ме [Q1; Q3]	255,00 [243,50; 290,50]	246,00 [227,00; 283,25]	U 34,00; p=0,625

Примечание: АССЗ – атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания, ГБ – гипертоническая болезнь; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ТГ – триглицериды; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности.

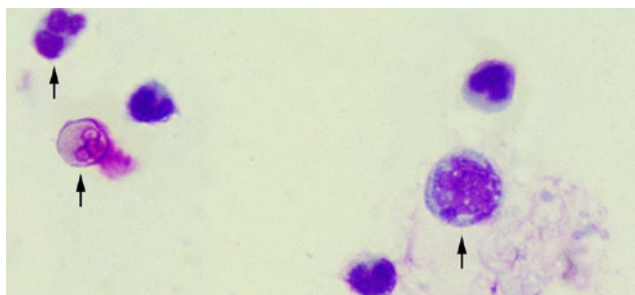


Рис. 2. Нейтрофилы низкой плотности (LDN) в составе фракции мононуклеаров у пациента с СД2, осложненным диабетической стопой и нейроостеоартропатией Шарко. Окраска по Романовскому – Гимзе. Ув. ×600

При микроскопии нативных микропрепаратов, приготовленных из фракции мононуклеарных клеток без дополнительной стимуляции, в группах СДС и НОА визуализировались структуры, соответствующие облаковидным и нитевидным внеклеточным ловушкам, что свидетельствует о спонтанной активации клеток фракции мононуклеаров (рис. 3). В группе контроля спонтанное формирование внеклеточных ловушек в моноцитарной фракции не наблюдалось. Облаковидные внеклеточные ловушки чаще обнаруживались как в группе НОА, так и в группе СДС по сравнению с контролем (p Kruskal – Wallis = 0,0113; post hoc: для НОА p=0,0252; для СДС p=0,0463). Относительное количество нитевидных внеклеточных ловушек, сформировавшихся в процессе спонтанного нетоза, было

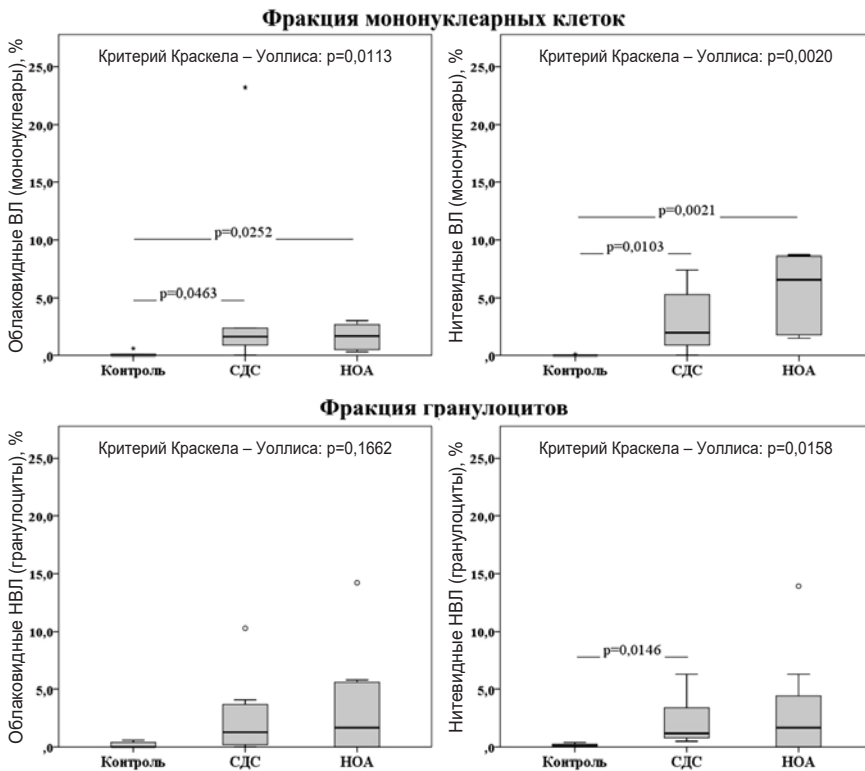


Рис. 3. Относительное количество внеклеточных ловушек в нативном микропрепарате (спонтанный нетоз) клеток мононуклеарной и гранулоцитарной фракций: Контроль – здоровые волонтеры; СДС – пациенты с синдромом диабетической стопы; НОА – пациенты с нейроостеоартропатией. Данные представлены в виде Ме [Q1; Q3]

выше и в группе СДС, и в группе НОА по сравнению с контролем (p Kruskal – Wallis = 0,0020; post hoc: для СДС $p=0,0103$, для НОА $p=0,0021$) (рис. 3).

Образование внеклеточных ловушек во фракции мононуклеаров можно рассматривать в контексте процесса этоза, поскольку их источником, вероятно, наряду с нейтрофилами низкой плотности, могут выступать моноциты (MoETs) [11]. Методология исследования не позволяет определить источник происхождения внеклеточных ловушек в моноцитарной фракции. Тем не менее выявленные различия в спонтанном образовании внеклеточных ловушек в моноцитарной фракции демонстрируют усиление провоспалительного потенциала клеток, которые находятся в моноцитарном кольце, у пациентов как с СДС, так и с НОА.

Анализ нестимулированных клеток фракции гранулоцитов не выявил значимых межгрупповых различий в количестве облаковидных внеклеточных ловушек (p Kruskal – Wallis = 0,1662). Однако формирование нитевидных НВЛ в группе СДС превышало значения в контроле (p Kruskal – Wallis = 0,0158; post

hoc: $p=0,0146$) (рис. 3). В группе НОА межквартильный размах относительного количества нитевидных ловушек был значительно выше наблюдаемого в контроле, однако апостериорный анализ не подтвердил статистической значимости различий. Разброс количества нитевидных НВЛ фракции гранулоцитов у пациентов из группы НОА позволяет предположить существование клинически значимых фенотипов воспаления в рамках НОА, требующих дальнейшего стратифицированного анализа.

Воздействие тромбина на мононуклеарную фракцию, выделенную из крови здоровых доноров (группа контроля), не вызывало значимой активации клеток: количество как облаковидных, так и нитевидных внеклеточных ловушек было единичным и не превышало 1 % (рис. 4). Напротив, в образцах пациентов с НОА воздействие тромбина приводило к статистически значимому увеличению доли как облаковидных ВЛ (p Kruskal – Wallis = 0,0113; post hoc: $p=0,0122$), так и нитевидных ВЛ (p Kruskal – Wallis = 0,0017; post hoc: $p=0,0013$). При этом в группе НОА клет-

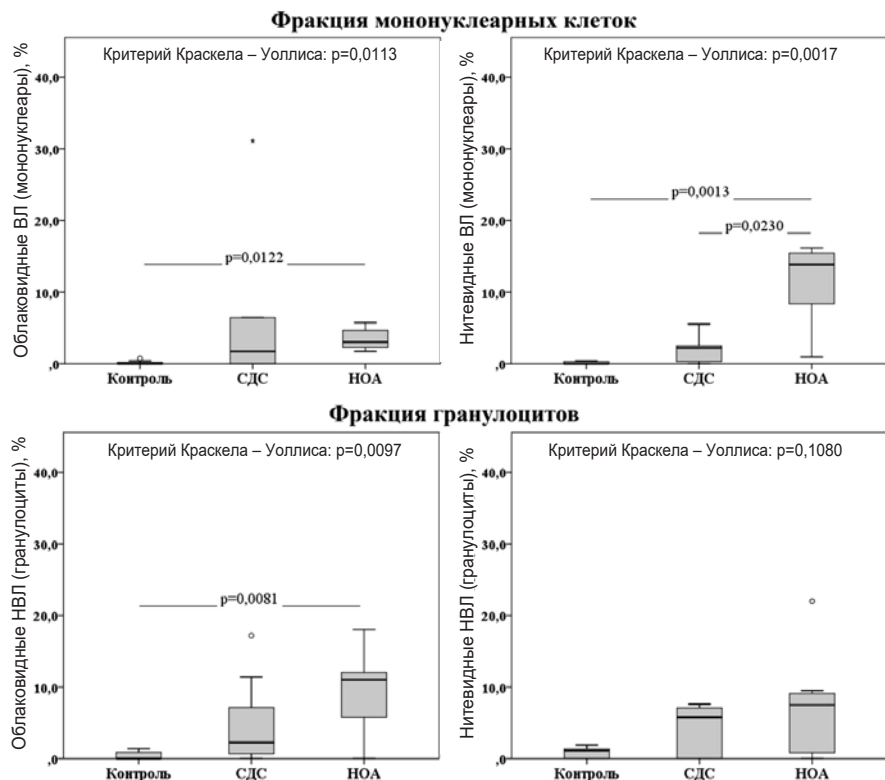


Рис. 4. Относительное количество внеклеточных ловушек в микропрепарате клеток мононуклеарной и гранулоцитарной фракций после 30 мин инкубации с тромбином (индуцированный нетоз): Контроль – здоровые волонтеры; СДС – пациенты с синдромом диабетической стопы; НОА – пациенты с нейроостеоартропатией. Данные представлены в виде Ме [Q1; Q3]

ки мононуклеарной фракции (LDN и, возможно, моноциты) чаще формировали нитевидные ВЛ по сравнению с группой СДС (*post hoc*: $p=0,0230$), что свидетельствует о повышенной способности к нетозу данных клеток в ответ на стимуляцию тромбином (рис. 4).

Нейтрофилы нормальной плотности из фракции гранулоцитов в группе НОА в ответ на стимуляцию тромбином активно формировали облаковидные НВЛ, демонстрируя статистически значимое увеличение доли ловушек данного типа относительно контроля (p Kruskal – Wallis = 0,0097; *post hoc*: $p=0,0081$). В группе СДС аналогичная тенденция к увеличению не достигала статистической значимости. Анализ фракции гранулоцитов также выявил тенденцию к увеличению способности к формированию нитевидных НВЛ как в группе НОА, так и в группе СДС, однако статистической значимости межгрупповые различия также не достигали. Таким образом, наиболее выраженная чувствительность к стимуляции тромбином была характерна именно для клеток фракции моноцитов (LDN и, возможно, моноциты) в группе НОА с большей их способностью к формированию ВЛ нитевидного типа. Выраженное образование *ex vivo* облаковидных ВЛ нейтрофилами низкой и нормальной плотности в ответ на активацию тромбином также представляет собой отличительную особенность группы НОА.

Известно, что неконтролируемое высвобождение внеклеточных ловушек способствует повреждению тканей. ВЛ действуют напрямую как повреждающие молекулярные паттерны (DAMPs), а также косвенно – стимулируя местное воспаление, повышая циркулирующие IL-6, IL-8, СРБ [4], это приводит к замедлению процессов заживления [7] и усугублению деструкции костей и суставов при развитии НОА [2]. Процесс образования ВЛ запускается через синтез активных форм кислорода, образующихся при участии ферментов NADPH-оксидазы и пептидиларгининдеиминазы 4 типа (PAD4). PAD4 вызывает цитруллинирование гистонов, в том числе H3 (CitH3) [12]. Повышение экспрессии гена PAD4 (*PADI4*) иногда связывается с риском замедленного заживления ран и инфицирования у пациентов с СД [13]. Уровни цитруллинированного гистона H3 отрицательно коррелируют с потенциалом спонтанного заживления язв при наличии СДС, будучи связаны с повышенной частотой ампутаций [14].

В нашем наблюдении уровень цитруллинированного гистона H3 (CitH3), одного из маркеров состоявшегося нетоза [15], коррелирующий со способностью к образованию нитевидных НВЛ [16], статистически значимо различался между исследуемыми группами ($p<0,0001$) (табл. 2). Медианная концентрация CitH3 была в 3,0 раза выше в группе СДС ($p=0,0059$) и в 5,7 раза – в группе НОА ($p=0,0009$; табл. 2) в сравнении с контролем.

Концентрация СРБ также различалась между контролем и группами СДС, НОА ($p<0,0001$). Медианный уровень СРБ по сравнению с группой здоровых был существенно повышен как в группе СДС (в 5,7 раза, $p=0,0018$), так и в группе НОА (в

9,4 раза, $p=0,0003$; табл. 2). При этом между группами СДС и НОА статистически значимой разницы выявлено не было ($p=0,1939$). Известно, что СРБ выступает не только в качестве неспецифического маркера системного воспаления, но и может оказывать непосредственное воздействие на нейтрофилы, стимулируя нетоз [17], а его удаление из плазмы, напротив, снижает способность нейтрофилов к образованию НВЛ, что было показано на корготе больных СД2 с сердечно-сосудистой патологией [18].

Таблица 2

Концентрация CitH3, СРБ и IL-8 в сыворотке крови здоровых и больных СДС и нейроостеоартропатией, Ме [Q1; Q3]

Группа	CitH3, нг/мл	СРБ, МЕ/л	IL-8, пг/мл
Контроль (n=12)	1,23 [0,85; 1,53]	1,73 [1,36; 2,89]	2,55 [0,38; 5,34]
СДС (n=10)	4,91 [2,20; 8,97]	11,16 [8,42; 18,58]	10,91 [6,73; 16,39]
НОА (n=8)	8,29 [5,06; 14,62]	18,01 [16,49; 20,76]	13,68 [3,12; 15,77]
Уровень значимости p			
	$p<0,0001^*$ $p_{\text{Контроль-СДС}}=0,0059^{**}$ $p_{\text{Контроль-НОА}}=0,0009^{**}$ $p_{\text{СДС-НОА}}=0,3531^{**}$	$p<0,0001^*$ $p_{\text{Контроль-СДС}}=0,0018^{**}$ $p_{\text{Контроль-НОА}}=0,0003^{**}$ $p_{\text{СДС-НОА}}=0,1939^{**}$	$p=0,0477^*$ $p_{\text{Контроль-СДС}}=0,0463^{**}$ $p_{\text{Контроль-НОА}}=0,0308^{**}$ $p_{\text{СДС-НОА}}=0,9273^{**}$

Примечание: * – по критерию Краскела – Уоллиса; ** – апостериорное сравнение (*post hoc*).

Статистический анализ уровня IL-8, значимого хемоаттрактанта нейтрофилов и регулятора нетоза [19], показал статистическую значимость различий ($p=0,0477$) между группами контроля, СДС и НОА (табл. 2). Медианная концентрация IL-8 была в 3,3 раза выше в группе СДС ($p=0,0463$) и в 4,4 раза выше в группе НОА ($p=0,0308$), в сравнении с группой контроля. Уровень IL-8 значимо не различался между группами СДС и НОА, что указывает на неспецифичность повышения его концентрации в крови у пациентов с различными вариантами диабетического поражения стоп.

Следует отметить, что цитруллинированный гистон является лишь маркером экстрезии ВЛ, тогда как сама ВЛ содержит протеазы, такие как нейтрофильная эластаза и протеиназа-3, способствующие деградации внеклеточного матрикса. LDN у пациентов с СД2 демонстрируют повышенную адгезию к внеклеточному матриксу через CD18, что является механизмом локального тканевого повреждения [4]. Кроме того, внеклеточные ловушки являются критическим компонентом процесса иммунотромбоза, который ведет к микрососудистой окклюзии и ишемии: внеклеточные ловушки при этом служат структурным каркасом для тромбообразования [20], активируя коагуляцию через высвобождение протромботических компонентов, включая гистоны [12], тканевой фактор [20] и фактор фон Виллебранда [4] и устраняя антикоагулянтный контроль [12]. Ключевые протеиназы – тромбин и плазмин связываются с ДНК внеклеточных ловушек, модулируя их состав посредством протеолиза гистонов, нейтрофильной эластазы [21] и, вероятно, влияя на процесс гемокоагуляции. Ранее была показана роль LDN в иммунотромбозе: LDN оказались способны к формированию

LDN-тромбоцитарных агрегатов [5], которые усиливают нетоз и риск тромботической микрососудистой окклюзии [4].

Значительное повышение у пациентов с НОА уровня IL-8, являющегося мощным хемоаттрактантом, указывает на интенсивный хемотаксис нейтрофилов в очаг поражения. Косвенным подтверждением вовлечения нейтрофилов в патогенез НОА может служить выявление значительной доли нейтрофилов низкой плотности, которые при стимуляции тромбином *ex vivo* демонстрировали повышенную способность к формированию нитевидных и облаковидных ВЛ. Возможно, данный процесс протекает при взаимодействии с моноцитами и даже путем формирования ими ВЛ. С другой стороны, нейтрофилы низкой и нормальной плотности в группе НОА при стимуляции тромбином активно формировали облаковидные НВЛ, которые ассоциируются с преобладанием повреждающих эффектов нетоза над защитными, что характерно для иммунопатологических процессов [22]. Полученные данные позволяют предположить, что при НОА происходит массовая эмиграция нейтрофилов, в том числе гиперреактивных нейтрофилов низкой плотности, в ткани стопы, где их дестабилизация и активный нетоз могут непосредственно участвовать в повреждении костно-суставных структур и формировании характерной деструкции. Данное предположение находит прямое подтверждение в значимом повышении уровня маркера состоявшегося нетоза – цитруллинированного гистона H3, что свидетельствует о выраженном процессе формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек *in vivo* у пациентов с НОА.

Следует также отметить имеющиеся методологические ограничения настоящего исследования, связанные с относительно небольшим объемом выборки (n=18). Формирование когорты в условиях одного лечебного учреждения за ограниченный период времени, а также сравнительная редкость такого осложнения, как диабетическая нейроостеоартропатия (стопа Шарко), не позволили достичь большего числа наблюдений. Данное обстоятельство могло повлиять на статистическую значимость анализа, повышая риск ошибок второго рода, когда реально существующие различия между подгруппами, в частности между пациентами с СДС и НОА, не достигали порога статистической значимости. Малый объем выборки ограничил возможность проведения стра-

тифицированного анализа с учетом потенциально значимых клиничко-демографических факторов, таких как пол, длительность течения диабета, особенности сахароснижающей терапии. На это указывает и обнаруженный разброс значений относительного количества нитевидных ловушек у больных с НОА, что, вероятно, отражает клиническую гетерогенность данной группы. Таким образом, несмотря на статистическую значимость основных выявленных межгрупповых различий, полученные данные следует экстраполировать на генеральную совокупность с определенной долей осторожности.

Заключение. В результате исследования установлено, что группа больных НОА имеет уникальные иммунологические характеристики, существенно отличающиеся ее от группы контроля и проявляющиеся в повышенной способности к формированию внеклеточных ловушек нейтрофилами низкой плотности как спонтанно, так и в условиях воздействия внешнего стимулятора – тромбина. В последнем случае отмечены отличия группы НОА также от группы СДС. Эти иммунологические характеристики соответствуют общей картине воспалительного процесса (более высоким уровням маркера острофазового ответа СРБ, маркера состоявшегося нетоза в тканях – CitH3, а также хемоаттрактанта нейтрофилов – IL-8).

Высокая способность нейтрофилов и, возможно, моноцитов к формированию внеклеточных ловушек в группе НОА с клинической точки зрения, вероятно, следует рассматривать как негативный феномен, отражающий не только выраженность уже сформированного патологического состояния, но и потенциал дальнейшего прогрессирования с присоединением других патогенетических механизмов. Формирование облаковидных внеклеточных ловушек в значительных количествах указывает на потенциальные риски развития иммунопатологии именно у больных НОА. При этом ответ нейтрофильных лейкоцитов на стимуляцию тромбином может оцениваться как потенциальный маркер риска иммунотромбоза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-25-20206, <https://rscf.ru/project/25-25-20206/>.

Литература/References

1. Zhu Y., Xia X., He Q., Xiao Q. A., Wang D. [et al.]. Diabetes-associated neutrophil NETosis: pathogenesis and interventional target of diabetic complications. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2023;14:1202463. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1202463>
2. Volmer-Thole M., Lobmann R. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. *International J. Mol. Sci.* 2016;17(6):917. <https://doi.org/10.3390/ijms17060917>
3. Njeim R., Azar W. S., Fares A. H., Azar S. T., Kfoury Kassouf H., Eid A. A. NETosis contributes to the pathogenesis of diabetes and its complications. *J. Mol. Endocrinol.* 2020;65(4):R65-R76. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0128>
4. Dumont B. L., Neagoe P.-E., Charles E., Villeneuve L., Tardif J.-C. [et al.]. Low-Density Neutrophils Contribute to Subclinical Inflammation in Patients with Type 2 Diabetes. *Int. J. Molecular Sci.* 2024;25(3):1674. <https://doi.org/10.3390/ijms25031674>
5. Fu Y., Wen Z., Fan J. Interaction of low-density neutrophils with other immune cells in the mechanism of inflammation. *Mol. Med.* 2025;31:133. <https://doi.org/10.1186/s10020-025-01053-1>
6. Hong C. W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* 2017;17(5):298-306. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298>
7. Wong S. L., Demers M., Martinod K., Gallant M., Wang Y. [et al.]. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat. Med.* 2015;21(7):815-819. <https://doi.org/10.1038/nm.3887>
8. Denny M. F., Yalavarthi S., Zhao W., Thacker S. G., Anderson M. [et al.]. Distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J. Immunol.* 2010;184(6):3284-3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199>
9. Marini O., Costa S., Bevilacqua D., Calzetti F., Tamassia N. [et al.]. Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood.* 2017;129(10):1343-1356. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-713206>
10. Sagiv J. Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H. [et al.]. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell. Rep.* 2015;10(4):562-573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>

11. Ibrahim N., Knöbl V., Hayden H., Bauer W. M., Worel N. [et al.]. Human monocyte subsets differ in their capacity to form extracellular traps. *Cell. Death Discovery*. 2024;10(1):281. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02034-y>
12. de Bont C. M., Boelens W. C., Pruijn G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell. Mol. Immunol.* 2019;16(1):19-27. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0024-0>
13. Zhu Y., Xia X., He Q., Xiao Q.-A., Wang D. [et al.]. Genetic Polymorphisms of PADI4 and Their Clinical Implications in Diabetic Patients Undergoing Orthopedic or Traumatological Surgery. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(6):673. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14060673>
14. Yang S., Gu Z., Lu C., Zhang T., Guo X. [et al.]. Neutrophil Extracellular Traps Are Markers of Wound Healing Impairment in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated in a Multidisciplinary Setting. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2020;9(1):16-27. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0943>
15. Tilley D. O., Abuabed U., Zimny Arndt U., Schmid M., Florian S. [et al.]. Histone H3 clipping is a novel signature of human neutrophil extracellular traps. *Elife*. 2022;11:e68283. <https://doi.org/10.7554/eLife.68283>
16. Новиков Д. Г., Золотов А. Н., Индутный А. В., Мордык А. В., Кириченко Н. А. [и др.]. Характеристика продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации цитруллинированного гистона H3 у детей, больных туберкулезом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):95-104. [Novikov D. G., Zolotov A. N., Indutny A. V., Mordyk A. V., Kirichenko N. A. [et al.]. NETs production and citrullinated histone H3 level in children with tuberculosis. *Byulleten sibirskoj mediciny. – Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):95-104. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-95-104>
17. Karasu E., Halbgebauer R., Schütte L., Greven J., Bläsius F. M. [et al.]. A conformational change of C-reactive protein drives neutrophil extracellular trap formation in inflammation. *BMC Biol.* 2025;23(1):4. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-02093-8>
18. Vulesevic B., Lavoie S. S., Neagoe P. E., Dumas E., Räkel A. [et al.]. CRP induces NETosis in heart failure patients with or without diabetes. *Immunohorizons*. 2019;3(8):378-388. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1900026>
19. Teijeira A., Garasa S., Ochoa M. D. C., Cirella A., Oliveira I. [et al.]. Differential Interleukin-8 thresholds for chemotaxis and netosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 2021;51(9):2274-2280. <https://doi.org/10.1002/eji.202049029>
20. Marcos-Jubilar M., Lecumberri R., Páramo J. A. Immunothrombosis: Molecular Aspects and New Therapeutic Perspectives. *J. Clin. Med.* 2023;12(4):1399. <https://doi.org/10.3390/jcm12041399>
21. Lim C. H., Adav S. S., Sze S. K., Choong Y. K., Saravanan R., Schmidtchen A. Thrombin and Plasmin Alter the Proteome of Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Immunol.* 2018;9:1554. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01554>
22. Yousefi S., Simon H. U. NETosis – Does It Really Represent Nature's «Suicide Bomber»? *Front. Immunol.* 2016;7:328. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00328>

Поступила 21.08.2025

Сведения об авторах:

Друк Инна Викторовна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой внутренних болезней и семейной медицины ДПО; тел.: +73812492085; e-mail: drukinna@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8317-7765>

Новиков Дмитрий Георгиевич, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ДПО, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией; тел.: +73812372725; e-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4339-2222>

Золотов Александр Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры патофизиологии; тел.: +73812372725; e-mail: zolotov@omgm.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6775-323X>

Кириченко Николай Александрович, младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории; тел.: +73812372725; e-mail: honomer_1608@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8411-0973>

Кирх Елизавета Александровна, ординатор кафедры внутренних болезней и семейной медицины ДПО; тел.: +73812492085; e-mail: kirh_00@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5649-2783>

Савочкина Альбина Юрьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, директор Научно-исследовательского института иммунологии; тел.: +73512327456; e-mail: alina7423@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0536-0924>

Ходус Владимир Владимирович, руководитель Центра критической ишемии конечностей и диабетической стопы; тел.: +73812561429; e-mail: operset@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0005-2192-1874>

Сорокина Елена Альбертовна, доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по терапевтической помощи; тел.: +73812561429; e-mail: destin2@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0784-3575>