

УДК 616-092

Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных атопическим дерматитом в молодом возрасте

Елистратова И.В.¹, Тарасова М.В.², Морозов С.Г.²

¹ — ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России», 143930, Балашиха, мкр. Никольско-Архангельский, ш. Вишняковское, д. 101

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

Целью данной работы было измерение генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных атопическим дерматитом (АД) в стадии ремиссии и в начальный период обострения. Группу больных и доноров составили молодые мужчины. Для стимуляции NADPH оксидазы использовали fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) или PMA (форболмиристатацетат). Оба вещества повышали генерацию супероксидного аниона у больных атопическим дерматитом в начальный период обострения при легкой степени заболевания (индекс SCORAD < 20). У больных атопическим дерматитом средней степени тяжести выброс супероксидного аниона был достоверно подавлен при использовании как fMLP, так и PMA. В работе также определена кинетика генерации супероксидного аниона нейтрофилами в течение трех часов после приёма стандартного завтрака. Кривая данной динамики значительно различалась для доноров и больных атопическим дерматитом.

Ключевые слова: атопический дерматит, нейтрофилы, супероксидный анион, форболовый эфир, fMLP

Введение

Атопический дерматит — это многофакторное заболевание, в патогенезе которого определенную роль играет стресс, обуславливающий изменения метаболизма клеток иммунной системы [1]. Нейтрофилы являются клетками природного иммунитета, которые при адаптивном иммунитете выполняют эффекторную функцию в межклеточном взаимодействии. Из кровяного русла нейтрофилы мигрируют в ткани в очаги инфекции, где при распознавании инфекционного агента реагируют выбросом реактивных метаболитов кислорода за счёт активации NADPH оксидазы, так называемым «кислородным взрывом». При этом изменяется объем нейтрофилов, а также физико-химические свойства их плазматической мембраны, что связано с действием реактивных метаболитов кислорода на мембранные липиды. Активность NADPH оксидазы, локализованной в плазматической мембране нейтрофилов, может регулироваться локальным изменением pH: оптимальным для стимуляции NADPH является pH 7,0 [2].

Форболмиристатацетат (PMA) — это фармакологический активатор NADPH оксидазы [3]. Контакт нейтрофилов с PMA приводит к фосфорилированию митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) p38 и киназы, отвечающей на экстраклеточные стимулы (ERK), что является предшествующими событиями при активации NADPH оксидазы и генерации супероксидного аниона, продукция которого стимулирует ответ клетки на стресс [4].

Рецептор-зависимым стимулом для генерации супероксида нейтрофилами является N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). Действие fMLP на нейтрофилы зависит от концентрации, он стимулирует выход катепсина G, катализирует фосфорилирование киназы Lyn семейства Src киназ, далее сигнальный путь включает переключение адаптера Tec из цитозоля ко внутренней поверхности плазматической мембраны, далее фосфорилируют-

ся киназы АКТ, p38 МАРК, фосфолипаза C γ 2 (PLC γ 2), протеинкиназа C (PKC) и мембранно-локализованная субъединица p47phox NADPH оксидазы, что приводит к активации фермента [5].

Имеется определенная кинетика выброса супероксида нейтрофилами: в течение первой минуты происходит экспоненциальное повышение генерации супероксида, через 30–40 минут уровень генерации выходит на плато. При определенных условиях продукция супероксида нейтрофилами может продолжаться несколько часов [6].

У больных АД повышена экспрессия генов, кодирующих хемоаттрактанты для нейтрофилов [7]. Однако, по другим данным, при атопическом дерматите ослаблен приток нейтрофилов в ткани [8]. Нарушение функциональной активности нейтрофилов обнаружено у трети больных атопическим дерматитом, нарушение хемотаксиса — у 16,6%, изменение продукции супероксида — у 6%, нарушение бактерицидной активности — у 24,5% больных. Нарушение продукции супероксида коррелировало с наличием абсцессов и инфекцией ЦНС [9]. У больных атопическим дерматитом средней степени тяжести и тяжелого течения показано существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также ослабление хемотаксической активности в ответ на зимозан [10]. Показано снижение фагоцитарной активности клеток больных атопическим дерматитом в отношении *Klebsiella pneumoniae*, при этом авторы отмечают повышение экспрессии рецепторов CD11b, CD66b, TLR2, TLR4, TLR5 по сравнению со здоровыми лицами [11]. По другим данным у больных атопическим дерматитом функциональная активность нейтрофилов в отношении ответа на рецептор-зависимые стимулы, в том числе fMLP, сопоставима с данными здоровых людей [12].

В связи с неоднозначностью данных литературы об активности нейтрофилов периферической крови больных

АД, целью данной работы было изучение эффектов двух стимуляторов NADPH оксидазы — fMLP и PMA, на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами. Для сравнения функциональной активности нейтрофилов доноров и больных АД в физиологических условиях проведено определение динамики генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови после приема пищи.

Методы

Доноры и пациенты

Для данного исследования отбирались мужчины в возрасте от 18 до 20, больные АД, женщин исключали в связи с возможным влиянием гормональных колебаний на показатели активности нейтрофилов. У всех больных АД с раннего детства, длительность заболевания от 12 до 14 лет. Всем больным проведены биохимические исследования, показатели внутри групп имели минимальный разброс. В первую группу ($n = 16$) вошли больные АД в стадии ремиссии, которые обращались к врачу для проведения аллергопроб. Во вторую группу ($n = 36$) вошли больные, обратившиеся по поводу обострения АД, тяжесть состояния больных оценивали по индексу SCORAD.

Донорами были молодые здоровые мужчины в возрасте 18–20 лет ($n = 22$), проходившие обследование для зачисления на службу, все участвовали в проведении данного эксперимента добровольно. Доноры и пациенты подписывали документ об информированном согласии. Критериями исключения из данного эксперимента были: наличие острых вирусных или бактериальных инфекций, наличии системных аллергических, воспалительных или онкологических заболеваний, а также соматической патологии, которая могла бы повлиять на полученные результаты.

У всех обследованных лиц кровь брали натощак, затем все получали стандартный завтрак (200 мл молока 3,2% жирности, 50 г хлеба «Бородинский» и 1 вареное куриное яйцо стандартного размера). После завтрака кровь брали трижды с интервалов в 1 час. Таким образом, забор крови осуществлён четыре раза у каждого больного и донора.

Выделение нейтрофилов

Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натощак из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Чистую популяцию нейтрофилов периферической крови человека выделяли на градиенте плотности Перколла (Percoll, Sigma-Aldrich, USA). Для приготовления градиента использовали фосфатный буфер без кальция и магния (PBS ϕ), чтобы избежать образования конгломератов клеток, а также для исключения влияния кальция на генерацию супероксидного аниона клетками. Для приготовления 10-кратного буфера на 1 литр H₂O добавляли NaCl 77,5 г; KН₂РO₄ 2,0 г; K₂НРO₄ 15,0 г. Далее разведением готовили однократный буфер (1 x PBS ϕ), растворы доводили до pH 7,0 и фильтровали через одноразовые фильтры ($d = 22$ микрона) в стерильные колбы.

Изотонический 90% раствор Перколла получали из 27 мл исходного Перколла и 3 мл 10-кратного PBS ϕ , его использовали для получения остальных ступеней градиента. Градиенты готовили ex tempore, последовательно наслаивая 90%, 81%, 70% и 60% растворы Перколла, по-

верх наслаивали 5 мл крови, полученную в день исследования утром натощак в вакутейнере с ЭДТА и разведенную 1:1 стерильным физиологическим раствором. Градиенты центрифугировали 20 минут при $t^{\circ} +22^{\circ}\text{C}$ при ускорении 500g. После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты. Нейтрофилы выделяли в интерфазе между слоями 81% и 70%; Перколла, лимфоциты концентрировались между 70% и 60% слоями Перколла, на поверхности первого слоя градиента выделялись тромбоциты с чистотой ~100%. Полученные популяции клеток отмывали дважды в 1 x PBS ϕ центрифугированием по 10 минут при $t^{\circ} +22^{\circ}\text{C}$ и ускорении 200g. Контроль выделения клеток проводили как морфологически (по окраске гематоксилин-эозином с последующим анализом в световом микроскопе), так и методом проточной цитометрии (по чистоте гейта соответствующей популяции клеток). Чистота выделенных популяций клеток составляла $94 \pm 3\%$, выход нейтрофилов из 1 мл крови — $1,5 - 5,2 \times 10^6$ клеток.

Измерение уровня супероксидного аниона

Для количественного измерения кислородного взрыва нейтрофилами крови их дважды отмывали PBS ϕ , довели концентрацию клеток до 1×10^6 / мл. По 1 мл взвеси клеток помещали в термостатируемую при $+37^{\circ}\text{C}$ кювету спектрофотометра UV-3000 (Shimadzu Corp., Japan) с программным управлением. Через 5 минут вносили 2 мкл [0,54 мг/мл] цитохрома с (Sigma). Через 10 секунд вносили 10 мкл PMA [0,1 мкМ] или fMLP [5 мкМ] (Sigma) и в течение 30 минут измеряли генерацию супероксидного аниона в режиме реального времени при двух длинах волн — 549 нм и 492 нм. Программа компьютера определяла концентрацию наномолей супероксидного аниона, высвобождаемого в среду одним миллионом клеток в минуту [13]. Для каждого больного ставили подряд три повтора.

Статистический анализ

Результаты экспериментов анализировали по программе ANOVA, данные представлены как $M \pm m$. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса, $P \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты

Все участники данного эксперимента находились в клинике в течение трех часов после приема стандартного завтрака. В нейтрофилах крови, взятой натощак у больных АД в стадии ремиссии, генерация супероксидного аниона под действием fMLP практически не отличалась от показателей доноров ($0,75 \pm 0,14$ vs $0,76 \pm 0,09$ нМ/мл/ 10^6 клеток). Для больных АД в стадии обострения обнаружено статистически достоверное различие ($P < 0,05$) по уровню генерации супероксидного аниона fMLP-стимулированными нейтрофилами по сравнению с донорами (рис. 1).

На рис. 1 приведен сравнительный анализ показателей больных АД в стадии обострения в зависимости от тяжести заболевания. В начальном периоде обострения АД при ин-

декс SCORAD < 20 активность нейтрофилов повышается (концентрация супероксида $0,92 \pm 0,11$ нМ/мл/ 10^6 клеток). При обострении АД и распространенном процессе (индекс SCORAD 30–40) нейтрофилы генерируют супероксидный анион в концентрации, достоверно меньшей по сравнению с донорами и с АД легкой степени ($0,61 \pm 0,10$ нМ/мл/ 10^6 клеток, $P < 0,05$).

Активация NADPH оксидазы нейтрофилов наступает при связывании рецепторов, в том числе для fMLP, или при активации цитозольных сигнальных путей, например, при контакте с PMA. У больных АД уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции PMA значительно выше, чем под действием fMLP, однако имеется та же тенденция, то есть наблюдается повышение концентрации супероксида при легкой степени течения АД (индекс SCORAD < 20) и снижение его уровня при более тяжелом течении (индекс SCORAD 30–40) (таблица).

Большинство работ, касающихся исследования функциональной активности нейтрофилов, проведено на крови, взятой натощак. Однако функционирование клеток происходит при разных физиологических состояниях, в том числе после приема пищи. В этом случае нейтрофилы подвергаются дополнительному воздействию липопротеидов и макронутриентов. Для сравнения динамики активности нейтрофилов крови доноров и больных АД был проведен эксперимент с приемом стандартного завтрака, после которого трижды осуществлен забор крови.

На рис. 2 представлены результаты доноров по генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови, взятой натощак и после приема стандартного завтрака в течение трех часов. Несмотря на однородность группы доноров по возрасту, полу и биохимическим показателям, среди них четко выделялись две подгруппы. В одной из них ($n = 10$) пик активности нейтрофилов приходился на первый час после приема завтрака, другая подгруппа доноров ($n = 12$) реагировала с замедлением пика активности до второго часа после завтрака. У всех обследованных доноров концентрация высвобождаемого супероксидного аниона приходила к первоначальному уровню через 3 часа после завтрака.

По сравнению с донорами больные АД в стадии ремиссии отвечали более однородно (рис. 3), пик активности приходился на первый час после завтрака, однако часть больных ($n = 9$) имела достоверно более высокие значения концентрации супероксида в этот период ($P < 0,05$). В этой подгруппе больных АД было более существенное снижение концентрации выделяемого супероксида через 3 часа после завтрака, то есть в тот период, когда у доноров происходило восстановление показателей.

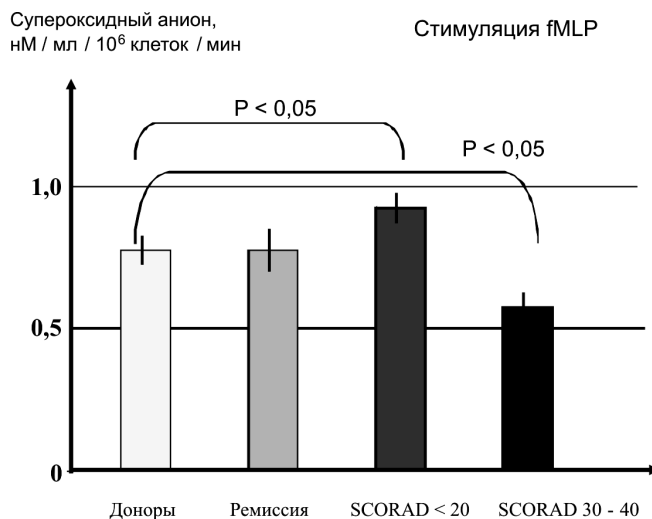


Рис. 1. Стимулированная fMLP продукция супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови здоровых доноров и больных atopическим дерматитом в стадиях ремиссии и обострения.



Рис. 2. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови здоровых доноров. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

У больных АД в стадии обострения кривая динамики генерации супероксидного аниона нейтрофилами существенно отличается от таковой у доноров и больных АД в стадии ремиссии (рис. 4). В этом случае мы также разделили показатели на две подгруппы, поскольку данные этих пациентов существенно различались. У одной подгруппы больных ($n = 8$) не было выраженного пика гене-

Таблица

Генерация супероксидного аниона (нМ/мл/ 10^6 клеток) стимулированными форболовым эфиром (PMA) нейтрофилами периферической крови доноров и больных atopическим дерматитом (натощак)

	Доноры (n = 22)	Больные atopическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Ремиссия (n = 16)	Легкая степень < 20 (n = 15)	Средняя тяжесть 30–40 (n = 21)
Уровень $O_2^{\cdot -}$	$1,21 \pm 0,12$	$1,33 \pm 0,21$	$1,77 \pm 0,17$	$0,93 \pm 0,11$
(+) $P < 0,05$ (по отношению к донорам)			+	+

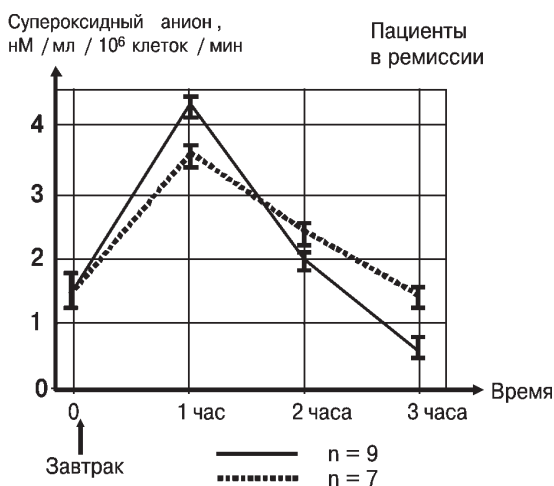


Рис. 3. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных atopическим дерматитом в стадии ремиссии. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

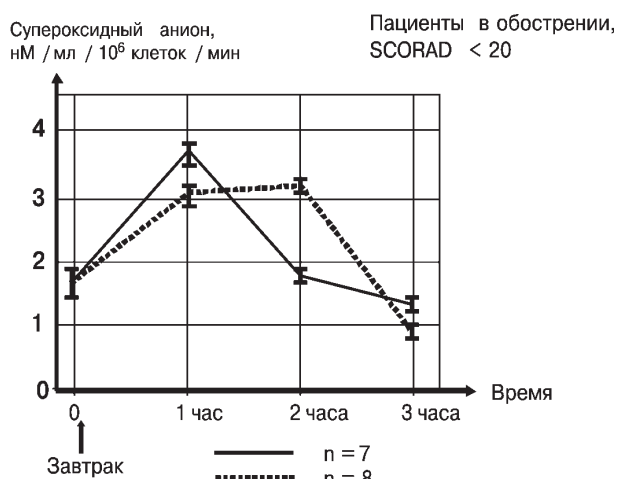


Рис. 4. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных atopическим дерматитом в стадии обострения с легким течением заболевания. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.



Рис. 5. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных тяжелым atopическим дерматитом средней степени тяжести. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

рации супероксида через час после завтрака, возможно, что он приходился на интервал между первым и вторым часом эксперимента, а так как забор крови осуществлялся ежечасно, то мы не получили в этот период искомого результата.

У больных АД со средней степенью тяжести (индекс SCORAD 30–40) (рис. 5) достоверно снижен уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилами, полученными натощак, а также в первый час после приема завтрака, по сравнению со всеми другими группами лиц, участвующих в данном исследовании ($P < 0,05$). Среди этих больных также выделялись две подгруппы на основании пиков генерации супероксидного аниона. Максимальный уровень выброса супероксида в одной подгруппе ($n = 13$) регистрировался в первый час после приема пищи, а во второй ($n = 8$) — через два часа после приема стандартного завтрака.

Таким образом, мы впервые обнаружили различия в функциональной активности нейтрофилов периферической крови, выделенных после приема пищи, между здоровыми молодыми мужчинами и больными atopическим дерматитом.

Уровень генерации супероксидного аниона определяет, в том числе, активацию сигнальных путей апоптоза. Мы измерили уровень спонтанного и индуцированного апоптоза нейтрофилов крови доноров и больных atopическим дерматитом (Елистратова и др., 2016, данные в печати) и показали, что у больных он достоверно выше, чем у здоровых лиц. Этот факт может объяснить низкую активность выделенных от больных АД нейтрофилов активированными в них сигнальными путями апоптоза, что согласуется с данными других авторов [14].

Обсуждение

Исследование выделенной популяции нейтрофилов (с чистотой $> 94\%$ клеток), которые поддерживают в течение нескольких часов оптимальную функциональную активность, позволяет проводить сравнительные исследования влияния разных факторов на одного и того же больного. В данной работе было установлено, что нейтрофилы больных существенно различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор — зависимые стимулы (fMLP) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва — форболмиристатацетат (РМА). Известно, что действие fMLP на нейтрофилы зависит от концентрации, при 1мкМ он индуцирует поляризацию клеток и дегрануляцию с выходом лактоферрина [15]. В нашей работе fMLP оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови.

По данным литературы повышение уровня гистамина у больных аллергией ингибирует дегрануляцию нейтрофилов под действием fMLP [15]. Препятствует активации нейтрофилов fMLP и, соответственно, снижает уровень генерации супероксидного аниона, связывание хемотаксическими пептидами G-протеин сопряженных рецепторов, привлекающими нейтрофилы в очаг воспаления [16].

Несмотря на различные сигнальные пути, сопряженные с fMLP и РМА в нейтрофилах человека, их эффекты в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. Так, у больных atopическим дерматитом легкой степени тяжести в начале про-

цесса обострения наблюдается повышение уровня генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами. У больных с более выраженными клиническими признаками заболевания и контаминированных бактериальной инфекцией, генерация супероксидного аниона нейтрофилами была супрессирована и существенно изменена динамика активности клеток в ответ на физиологические воздействия.

Необходимо также учитывать тот факт, что при обострении атопического дерматита больные подвергаются психологическому стрессу, который обуславливает супрессию функциональной активности нейтрофилов [17, 18]. Острый ментальный стресс обуславливает снижение продукции супероксидного аниона нейтрофилами [19].

Заключение

В данной работе впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных атопическим дерматитом в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака. Эти исследования интересны не только с точки зрения сравнения показателей больных и здоровых людей, но также и для понимания естественных процессов, происходящих в организме. Все люди регулярно принимают пищу, макронутриенты и микронутриенты которой оказывают существенное влияние на активность клеток иммунной системы. Проведенными нами исследованиями установлено, что приём пищи оказывает разное действие на активность нейтрофилов больных и здоровых лиц. Следует подчеркнуть, что для этого эксперимента группы больных подбирались не рандомизировано, а только по идентичности таких показателей, как пол, возраст и метаболическая активность, чтобы минимизировать естественные колебания активности нейтрофилов. Даже при такой выборке имелись различия в пике концентрации супероксидного аниона, который у ряда здоровых доноров приходился на первый час после приёма завтрака, а у других лиц — на второй час. То есть у молодых здоровых людей активность нейтрофилов периферической крови достоверно различается.

Ещё в прошлом веке была установлена гетерогенность циркулирующих в кровяном русле нейтрофилов на основании электрического заряда на поверхности клеток и электрофоретической подвижности клеток. Наименее электронегативные клетки генерируют супероксид в 2 раза больше максимально электронегативных клеток [20]. То есть, различные субпопуляции нейтрофилов по-разному активированы у здоровых лиц и больных атопическим дерматитом.

Таким образом, показано изменение уровня генерации супероксидного аниона у больных атопическим дерматитом под действием fMLP и форболового эфира PMA, а также установлена различная динамика выброса супероксида при активации нейтрофилов PMA, что отражает окислительный статус больных.

Выводы

1. Показано, что нейтрофилы больных атопическим дерматитом различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор-зависимую стимуляцию fMLP и в ответ на прямой активатор NADPH оксидазы — форболмиристатацетат (PMA). fMLP оказывал до-

стоверно менее выраженный эффект по сравнению с PAM на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови.

2. Эффекты fMLP и PMA в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. У больных атопическим дерматитом легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных атопическим дерматитом средней тяжести генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0, 05$).

3. Впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных атопическим дерматитом в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака. У больных атопическим дерматитом изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на стимулы при почасовом измерении генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами.

Список литературы

1. Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А. Экспрессия рецепторов PAR-2 на нейтрофилах периферической крови больных атопическим дерматитом и их связь с белками теплового шока HSP90, *Росс. Ж. Кож. Вен. Болезней*, 2016, (1): 53–57.
2. Suzuki Y., Lehrer R. NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate, *J. Clin. Invest.*, 1980, 66(6): 1409–1418.
3. Kuwabara W., Zhang L., Schuiki I., Curi R., Volchuk A., Alba-Loureiro T. NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmic reticulum stress in neutrophil-like HL60 cells, *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116410.
4. Keshari R., Verma A., Barthwal M., Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils, *J. Cell. Biochem.*, 2013; 114(3): 532–540.
5. Liao H., Chien C., Chen J., Lee T., Lin S., Tseng C. The anti-inflammatory effect of 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol by targeting Lyn kinase in human neutrophils, *Chem. Biol. Interact.*, 2015, 236: 90–101.
6. Black C., Samuni A., Cook J., Krishna C., Kaufman D., Malech H., Russo A. Kinetics of superoxide production by stimulated neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, 286(1): 126–131.
7. Choy D., Hsu D., Seshasayee D., Fung M., Modrusan Z., Martin F. et al. Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, 130(6): 1335–1343.
8. Dhingra N., Suarez-Farignas M., Fuentes-Duculan J., Gittler J., Shemer A., Raz A. et al. Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pathway differences between these diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, 132(2): 498–501.
9. Wolach B., Gavrieli R., Roos D., Berger-Achitov S. Lessons learned from phagocytic function studies in a large cohort of patients with recurrent infections, *J. Clin. Immunol.*, 2012, 32(3): 454–466.
10. Forte W., Guardian V., Mantovani P., Dionigi P., Menezes M. Evaluation of phagocytes in atopic dermatitis, *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*. 2009; 37(6): 302–308.
11. Fierro M., Banche G., Marengo F., Novelli M., Allizond V., Mandras N. et al. Functional and phenotypical impairment of polymorphonuclear cells in atopic dermatitis: an additional cause for the known susceptibility to infections? *Dermatology*, 2012, 224(4): 323–330.
12. Mrowietz U., Konter U., Traut R., Schroder J., Christophers E. Atopic dermatitis: influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988; 82(6): 1027–1036.
13. Woodman R., Newburger P., Anklesaria P. et al. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells, *Blood*. 1995; 85(1): 231–241.

14. Кандалова О.В., Таратутина Т.В., Мартынова Е.А. Сравнение спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи больных atopическим дерматитом, экземой и псориазом, Патогенез, 2012, 10(4): 60—65.

15. Dib K., Perecko T., Jenei V., McFarlane C., Comer D., Brown V. et al. The histamine H4 receptor is a potent inhibitor of adhesion-dependent degranulation in human neutrophils, J. Leukoc. Biol., 2014; 96(3): 411—418.

16. Karlsson J., Bylund J., Movitz C., Bjorkman L., Forsman H., Dahlgren C. A methodological approach to studies of desensitization of the formyl peptide receptor: Role of the read out system, reactive oxygen species and the specific agonist used to trigger neutrophils, J. Immunol. Methods., 2010; 352(1—2): 45—53.

17. De Benedetto A., Agnihotri R., McGirt L., Bankova L., Beck A. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? J. Invest. Dermatol., 2009, 129(1): 14—30.

18. Sadik C., Sezin T., Kim N. Leukotrienes orchestrating allergic skin inflammation, Exp. Dermatol., 2013, 22(11): 705—709.

19. Khanfer R., Phillips A., Carroll D., Lord J. Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. Psychosom. Med., 2010, 72(7): 636—640.

20. Eggleton P., Fisher D., Crawford N. Heterogeneity in the circulating neutrophil pool: studies on subpopulations separated by continuous flow electrophoresis, J. Leukoc. Biol., 1992; 51(6): 617—625.

Поступила 01.10.2015

Received 01.10.2015

Superoxide anion releasing by neutrophils from young adult atopic dermatitis patients

Elistratova I.V.¹, Tarasova M.V.², Morozov S.G.²

¹ — The main military clinical hospital of internal troops of the MIA Russia, 143930, Balashikha, Nikol'sko-Archangelsky, 101 Sh. Vishnyakovskoe

² — Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya St.

The aim of this work was the investigation of superoxide anion generation by purified blood neutrophils obtained from young adult men with atopic dermatitis. Both, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and receptor independent stimulation by phorbol myristate acetate (PMA) were used for NADPH oxidase stimulation and superoxide anion production. Both, fMLP and PMA have been found to slightly increase the superoxide production by neutrophils at the initial period of atopic dermatitis relapse (if index SCORAD was less than 20 points) compared with healthy donors. The superoxide anion generation by neutrophils have been found to be depressed at the moderate atopic dermatitis compared with donors and the mild atopic dermatitis patients. Also, the dynamic of neutrophil activity has been measured during three hours after breakfast feeding. The curve of this activity was considerably different between healthy donors and atopic dermatitis patients. At the moderate atopic dermatitis, superoxide production has been shown to be significantly suppressed compared with healthy donors and atopic patients with mild case of disease.

Key words: atopic dermatitis, neutrophils, superoxide anion, PMA, fMLP