

# Сравнение спонтанного и керамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи больных атопическим дерматитом, экземой и псориазом

Кандалова О.В.<sup>1</sup>, Таратутина Н.В.<sup>1</sup>, Мартынова Е.А.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, кафедра кожных и венерических болезней, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; e-mail: e.a.martinova@gmail.com

<sup>3</sup> ГОУ ДПО РМАПО МЗСР РФ, Москва

*Работа посвящена определению уровня спонтанного и керамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи, полученных у больных атопическим дерматитом, экземой и псориазом. Для проведения исследования был использован простой и дешевый метод, основанный на определении флуоресценции пропидиума иодида в фиксированных клетках соскоба кожи с помощью проточной цитометрии. Показано, что процент спонтанного апоптоза повышен при всех заболеваниях кожи по сравнению с образцами доноров. Максимальный уровень индукции апоптоза в клетках соскоба кожи обнаружен при добавлении бактериальной сфингомиелиназы в образцы клеток больных экземой, этот эффект носит дозо-зависимый характер. При псориазе действие сфингомиелиназы на клетки кожи менее выражено по сравнению с экземой. При экземе дозо-зависимо повышен процент C2-керамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи по сравнению с донорами и больными атопическим дерматитом и псориазом. Определение апоптоза методом проточной цитометрии можно использовать для прогноза течения заболевания и назначения патогенетической терапии заболеваний кожи.*

**Ключевые слова:** апоптоз, керамид, атопический дерматит, экзема, псориаз

**Список сокращений:** АД — атопический дерматит; APRIL — лиганд семейства TNF- $\alpha$ , индуцирующий пролиферацию; BAFF — фактор семейства TNF- $\alpha$ , активирующий В-лимфоциты; C2-керамид — клеточно-проникающий керамид; CD — международное обозначение рецепторов; DR — рецепторы апоптоза; Fas-R/CD95/APO-1 — рецептор апоптоза; FSC/SSC — прямое и боковое рассеяние лазера; IFN- $\gamma$  — гамма-интерферон; IL — интерлейкины; JNK — c-Jun ядерная киназа; p75NTR — рецептор нейротрофина; PBS — фосфатный буфер; PI — пропидиум иодид; PKC — протеинкиназа C; SM — сфингомиелин; SMase — сфингомиелиназа; SPC — сфингозин-фосфорилхолин; SPT — серин-пальмитоил-трансфераза; TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухолей альфа; TRAIL — лиганд семейства TNF- $\alpha$ , индуцирующий апоптоз; TWEAK — TNF- $\alpha$ -подобный фактор, индуцирующий слабый сигнал апоптоза; ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка

## Введение

В основе патогенеза хронических заболеваний кожи, таких, как псориаз, экзема, атопический дерматит, лежат нарушения запрограммированной гибели (апоптоза) кератиноцитов, что клинически сопровождается повреждением эпидермиса. Апоптоз необходим для поддержания гомеостаза кожи: активация или ослабление апоптоза приводят к развитию заболеваний, что проявляется в виде потери ткани или утолщения кожи.

Различают несколько типов апоптоза, из которых наиболее значимыми при заболеваниях кожи являются активационно-индуцированный, Fas-индуцированный, инициируемый фактором некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) или интерфероном гамма (IFN- $\gamma$ ). Местом инициации апоптоза могут быть митохондрии, лизосомы, плазматическая мембрана, ядро, эндоплазматический ретикулум, что определяет различия в сигнальных путях апоптоза [1].

В апоптозе клеток кожи важную роль играют цитокины семейства TNF- $\alpha$ , в частности, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) — лиганд рецепторов апоптоза DR4 и DR5; BAFF (B-cell activating factor of the TNF family), который играет роль в аутоиммунной патологии при кожных заболеваниях; APRIL (a proliferation-inducing ligand), TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis),

p75NTR (p75 neurotrophin receptor) [6, 18, 19]. TWEAK повышает экспрессию TNF- $\alpha$  в кератиноцитах [19, 29].

TNF- $\alpha$  потенцирует Fas-зависимый апоптоз кератиноцитов [14]. Fas рецептор (Fas-R/CD95) широко распространен на клетках кожи и регулирует апоптоз фибробластов дермы. В келоидных рубцах фибробласты резистентны к Fas-зависимому апоптозу, но при этом чувствительны к экзогенному керамиду [16]. Все перечисленные выше лиганды и рецепторы участвуют в сигнальных путях апоптоза, в которых вторичным мессенджером является керамид.

Церамиды кожи представлены тремя классами — это сфингозины, фитосфингозины и 6-ОН-сфингозины. К сфингозинам относятся Церамид-1 (EOS), Церамид-2 (NS) и Церамид-5 (AS). К фитосфингозинам относятся Церамид-9 (EOP), Церамид-3 (NP) и Церамид-6 (AP). К 6-ОН-сфингозинам относятся Церамид-4 (EON), Церамид-8 (NH) и Церамид-7 (AH). Кроме барьерной функции кожи, керамиды всех трех классов участвуют в сигнальных путях дифференцировки клеток эпидермиса. Церамид, образованный путем гидролиза сфингомиелина в плазматической мембране клеток, является вторичным мессенджером (или посредником) в проведении сигналов апоптоза.

*Атопический дерматит* — это хроническое заболевание кожи, обусловленное сочетанием генетических нарушений, иммунодефицита и дисфункции эпидермиса за счет изменения липидного состава кожи [4]. При атопическом дерматите наблюдается трансэпидермальная потеря воды, дегидратация кожи и изменение состава липидов внутри рогового слоя эпидермиса. Этиологическим фактором атопического дерматита является дефицит керамидов в роговом слое эпидермиса, что обуславливает изменение гидратационных свойств кожи, сухость и снижение её барьерной функции [23]. При атопическом дерматите обнаружено изменение уровня церамида-1 и церамида-3 [13]. Втирание в кожу больных атопическим дерматитом церамида-1 и церамида-3 в течение 4 недель значительно повышало влажность кожи, улучшало её гидратацию и снижало трансэпидермальную потерю воды [12].

Атопический дерматит сопровождается повышением уровня апоптоза кератиноцитов. При сравнении первичных кератиноцитов, изолированных от доноров, с кератиноцитами, полученными от больных атопическим дерматитом, было показано, что в последних наблюдается IFN- $\gamma$ -индуцированный апоптоз. В кератиноцитах больных атопическим дерматитом IFN- $\gamma$  вызывает повышение экспрессии проапоптотических генов *NOD2*, *DUSP1*, *ADM*, а также генов, регулирующих развитие воспаления (*CCDC109B*, *CCL5*, *CCL8*, *IFI35*, *LYN*, *RAB31*, *IFITM1*, *IFITM2*) [20].

В патогенезе атопического дерматита играет роль бактериальная инфекция, в частности, *S.aureus* [9]. Синтезируемая бактериями сфингомиелиназа катализирует распад сфингомиелина плазматической мембраны клеток с образованием церамида, который далее метаболизируется до сфингозина. Повышение уровня сфингозина в роговом слое изменяет соотношение липидов с жирными кислотами различной длины, что способствует снижению барьерной функции кожи [7].

При атопическом дерматите в коже возрастает концентрация сфингозинфосфорилхолина (SPC), который образуется из сфингомиелина под действием сфингомиелин-деацилазы. SPC повышает уровень кальция в кератиноцитах и продукцию ими лейкотриена B<sub>4</sub> [2]. SPC входит в состав липопротеидов плазмы крови, его концентрация существенно повышается при ряде заболеваний. SPC инициирует сигнальные каскады при связывании с высокоаффинными рецепторами при контакте липопротеидов с клетками эндотелия сосудов, кожи, мозга. SPC действует как митоген и как медиатор воспаления [17].

При экземе апоптоз кератиноцитов наблюдается в супрабазальных эпидермальных слоях кожи и индуцируется активированными Т-лимфоцитами через Fas (CD95/APO-1) рецептор [3]. В поврежденных участках кожи при экземе снижена экспрессия цитокина APRIL и повышена экспрессия цитокина BAFF [6]. В острой фазе обнаружено отсутствие экспрессии субъединицы IL-27, регулируемой геном EBV-3. Апликация IL-27 или его добавление в культуру кератиноцитов способствовали продукции хемокина CXCL10 и повышению экспрессии молекул гистосовместимости I класса. Сигналы от IL-27 предшествуют сигналам от TNF- $\alpha$  [28].

Псориаз — это хроническое воспалительное заболевание кожи, сопровождающееся повышенной пролиферацией кератиноцитов и сосудов кожи, в основе его лежит

аутоиммунная патология. Основными клетками — мишенями при псориазе являются кератиноциты, для которых характерно повышение пролиферативной активности, нарушения дифференцировки, что приводит к постоянному слущиванию эпидермиса и истончению кожи. Нарушения сигнальных путей апоптоза являются неотъемлемой составляющей патогенеза псориаза и в настоящее время считаются основными факторами клинического проявления этого заболевания [27]. Протеомный анализ тканей из псориазных бляшек позволили идентифицировать изменение экспрессии генов, в том числе 11 генов, регулирующих апоптоз [22].

При псориазе в сигнальных путях апоптоза кератиноцитов существенную роль играют белки семейства TNF- $\alpha$  — это TRAIL, BAFF, APRIL, p75NTR и TWEAK. Экспрессия TRAIL и его рецепторов — DR4 и DR5, значительно повышена в псориазных бляшках и в нормальных участках кожи больных псориазом по сравнению со здоровыми донорами. В поврежденных участках также значительно повышена экспрессия рецепторов апоптоза DR5 [18]. Постоянная экспрессия TWEAK наблюдается при патологической пролиферации кератиноцитов, сопровождающей воспалительный процесс в коже при псориазе [19]. Экспрессия p75NTR существенно ниже в кератиноцитах больных псориазом по сравнению с нормальной кожей [24].

Экспрессия серин-пальмитойл-трансферазы (SPT) — основного фермента начала синтеза сфинголипидов *de novo*, значительно снижена в коже больного псориазом по сравнению со здоровой кожей. Чем ниже экспрессия SPT, тем более выражена тяжесть клинических проявлений псориаза [11]. При псориазе в клетках соскобов кожи, полученных из поврежденных и внешне нормальных участков кожи, уровень общих керамидов существенно снижен, что ассоциировано со снижением функциональной активности PKC- $\alpha$  и JNK киназы (обе киназы регулируют сигналы апоптоза). Сниженный уровень церамида — это фактор нарушения процессов апоптоза в кератиноцитах, что приводит к повышению их пролиферации [15]. Степень снижения содержания керамидов в коже соответствует тяжести развития заболевания.

При псориазе изменяется метаболизм керамидов, ковалентно связанных с кератиноцитами ( $\omega$ -гидроксиацил-сфингозины и  $\omega$ -гидроксиацил-6-гидрокси-сфингозины). Эти керамиды содержат основания от C12 до C22, остатки жирных кислот от C28 до C36 [10].

Роль керамидов в патогенезе заболеваний кожи не ограничивается нарушением сигнальной и барьерной функций. Изменения метаболизма сфинголипидов в клетках кожи определяют ответ на проведение лекарственной терапии, как системной, так и локальной. Даже в период ремиссии реакция клеток кожи на неспецифические раздражители, такие, как загрязнители окружающей среды, ультрафиолет и т.д., отличается от ответа клеток кожи здорового человека, что проявляется в покраснении, повышенной дегидратации, слущивании эпидермиса. Церамид играет ведущую роль в этих событиях, что позволяет использовать его как прогностический маркер, позволяющий оценить ответ кожи на лекарственную терапию и длительность периода ремиссии.



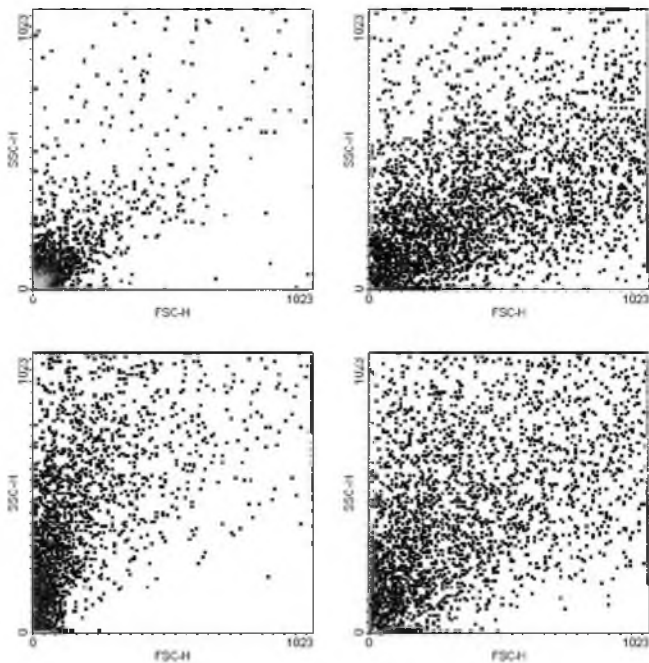


Рис. 1. Пример анализа клеток соскоба кожи на каналах FSC/SSC (прямое и боковое рассеяние лазера соответственно)

Целью данной работы было изучение особенностей спонтанного апоптоза и апоптоза, индуцированного церамидом, в клетках кожи больных.

В задачи исследования входила оценки апоптоза клеток кожи, полученных при соскобе кожи, с помощью окраски пропидиумом иодидом и дальнейшего анализа на проточном цитометре, а также использование этого метода для сравнение апоптоза в клетках кожи больных атопическим дерматитом, псориазом и экземой.

## Материалы и методы

### Пациенты

Работа основана на результатах обследования 43 больных экземой, 48 больных псориазом и 46 больных атопическим дерматитом, наблюдавшихся на кафедре кожных и венерических болезней МГМСУ (руководитель — профессор Перламуртов Ю.Н.) в течение 2010—2012 гг. Больные были обследованы до назначения специфической терапии. Донорами были мужчины и женщины в возрасте 18—46 лет ( $n = 19$ ), не имеющие кожных заболеваний. Мы оценили уровень апоптоза и число делящихся клеток методом проточной цитометрии в соскобах кожи доноров и больных до лечения.

### Получение клеток кожи

Для изучения механизмов апоптоза клеток кожи мы разработали метод, основанный на получении соскоба кожи, выделении изолированных клеток, их окраски пропидиумом иодидом и последующего анализа на проточном цитометре. Соскобы получали в месте неповрежденной кожи, клетки сразу переносили в фосфатный буфер (PBS) (Sigma-Aldrich Co., LLC, UK), отмывали центрифугированием 10 мин при 200 g, клетки переносили в среду 199 (ПанЭко, Москва) с 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), гомогенизировали, фильтровали и отмывали центрифугированием.

Для измерения спонтанного апоптоза клетки фиксировали 4% параформальдегидом на PBS и окрашивали пропидиумом иодидом (PI) (Sigma) в гипотоническом буфере (PI + цитрат натрия 0,1% + Тритон X-100 (0,01%) на дистиллированной воде ( $H_2O$  dest)), что позволяет красителю проникать в живые и апоптозные клетки.

Для определения уровня индуцированного апоптоза клетки переносили в среду 199 с 10% ЭТС в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл, добавляли С2-церамид (Avanti Polar Lipids Co., Ltd) (проникающий через неповрежденную мембрану клеток) в концентрации 0,1 или 1 мМ, через 2 часа клетки отмывали, фиксировали в 4% параформальдегиде. Этот же метод использовали для индукции апоптоза бактериальной сфингомиелиназой (Sigma) в концентрации 0,1 или 1 МЕ/мл. Перед исследованием на проточном цитометре клетки окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере.

### Проточная цитометрия

Клетки отмывали и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson Co., Ltd, USA) по программе SimulSet.

### Статистика

Результаты обработаны по программе ANOVA и представлены как  $M \pm m$ . Сравнение между двумя группами дано по критерию Стьюдента. Анализ малой выборки для нескольких групп проводили методом множественного сравнения по критерию Ньюмана—Кейлса,  $p \leq 0,05$  дается как статистически значимое различие между группами.

## Результаты

### Соотношение делящихся и гибнущих клеток в соскобах кожи

Для проведения данной работы были использованы клетки кожи, полученные методом соскоба, которые были немедленно зафиксированы в 4% параформальдегиде. Это позволяет исследовать то состояние ДНК клетки, которое было на момент забора образца. Далее клетки были окрашены пропидиумом иодидом, который имеет флуоресценцию в красной зоне спектра, связывает концы

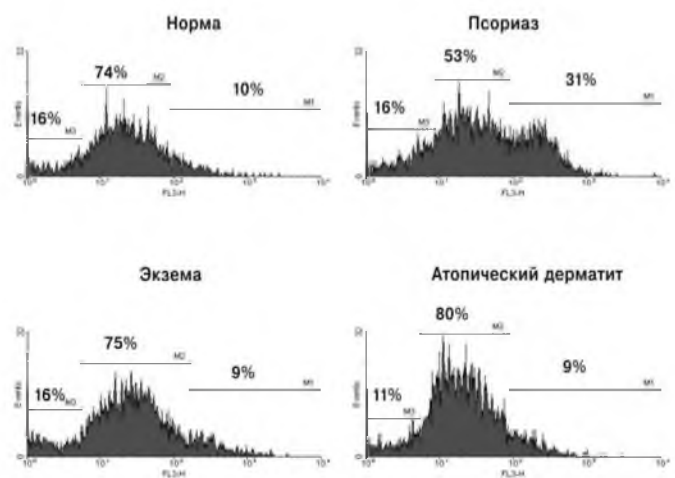


Рис. 2. Пример анализа клеток соскоба кожи, где курсор M2 показывает процент клеток в апоптозе, M3 указывает на делящиеся клетки, а курсор M1 показывает число нормальных клеток

**Анализ пролиферации и спонтанного апоптоза клеток соскоба кожи больных и доноров  
(по данным проточной цитометрии)**

	% апоптоза (спонтанного)	Интенсивность флуоресценции пропидиума иодида ( <i>meal</i> , у.е.)		% делящихся клеток
		Диплоидные клетки	Делящиеся клетки	
Норма	16,2±2,8%	54±7	344±23	6,8±0,9%
АД*	18,5±1,9%	181±18	1230±49	5,1±0,6%
Псориаз	17,1±1,4%	130±14	875±31	6,6±0,5%
Экзема	21,2±1,6%	100±11	814±29	4,8±0,5%

Примечание. \* АД — атопический дерматит

ДНК и (при окраске в гипотоническом буфере) идентифицирует популяции живых клеток, апоптозных и некротических клеток. Этот очень простой, дешевый и стандартизированный метод дает количественный анализ, результаты которого приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, процент пролиферирующих клеток снижен при экземе и при этом достоверно повышается процент гибнущих клеток кожи. При атопическом дерматите эти изменения можно назвать тенденцией к снижению пролиферации и к повышению гибели клеток кожи. Процент гибнущих клеток в данном рисунке представлен суммарным числом клеток в апоптозе и некрозе. Для более детального исследования мы проанализировали отдельно процент клеток в апоптозе, процент диплоидных клеток и делящихся клеток в соскобах кожи, результаты приведены в табл. 1.

Процент спонтанного апоптоза достоверно повышен в соскобах клеток кожи больных экземой, у них же достоверно снижен процент пролиферирующих клеток (табл. 1). При всех видах патологии процент спонтанного апоптоза выше нормы. Обращает на себя внимание тот факт, что во всех образцах клеток больных существенно повышена интенсивность флуоресценции пропидиума иодида, что отражает уровень ДНК в клетке. Это может указывать на процессы репарации, для которых характерно повышение числа олигонуклеосомальных фрагментов ДНК. Состояние клеток кожи при АД лучше, чем при псориазе, так как интенсивность свечения, т.е. содержание ДНК, в них выше.

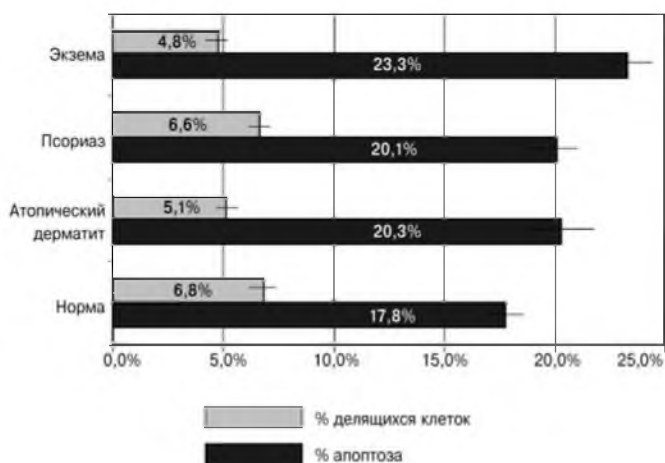


Рис. 3. Соотношение делящихся и гибнущих клеток в соскобах кожи доноров и больных (по данным проточной цитометрии)

#### Определение лимфоцитов в соскобах кожи

Поскольку лимфоциты играют роль в патогенезе заболеваний кожи, мы определили процент лимфоцитов в соскобах кожи, полученных от больных и доноров. Результаты представлены на рис. 4.

Процент лимфоцитов определяли по гейту, соответствующему лимфоцитам, на каналах FSC/SSC при проточной цитометрии. В предварительных экспериментах эти клетки окрашивали моноклональными антителами (CD3 к Т-лимфоцитам и CD19 к В-лимфоцитам) для подтверждения локализации лимфоцитов в этом гейте. Процент лимфоцитов в соскобах кожи повышен у больных псориазом (рис. 4), что отражает негативную роль лимфоцитов в патогенезе данного заболевания. При атопическом дерматите имеется тенденция к снижению процента лимфоцитов, однако, эти показатели не являются статистически достоверными. При экземе процент лимфоцитов повышен, что также указывает на их участие в процессах, сопровождающих изменения кожи при данном заболевании (рис. 4).

Иммунная система поддерживает постоянство внутренней среды организма. При некоторых заболеваниях лимфоциты распознают клетки своего организма как антиген и вызывают в них апоптоз за счет выброса протеаз, синтеза цитокинов или связыванием рецепторов апоптоза на кератиноцитах. При некротических реакциях в коже повышен уровень цитотоксических лимфоцитов [21]. При экземе процент лимфоцитов в соскобе повышен, что указывает на роль иммунной системы в развитии апоптоза клеток. При псориазе лимфоцитов в соскобе больше нормы, но интенсивность апоптоза ниже, чем при экземе. При атопическом дерматите число лимфоцитов меньше нормы, что согласуется с данными литературы, указывающими на резкое снижение уровня регуляторных Т-лимфоцитов в коже больных атопическим дерматитом и нарушении иммунного ответа [26].

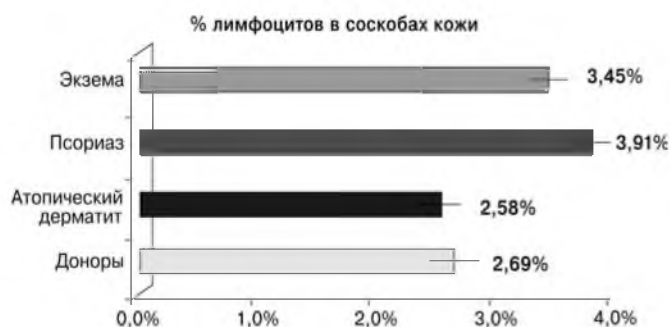


Рис. 4. Процент лимфоцитов в соскобах кожи доноров и больных (по данным проточной цитометрии)

Процент индуцированного апоптоза в клетках соскоба кожи больных и доноров  
(по данным проточной цитометрии)

	Концентрация	Доноры	АД*	Псориаз	Экзема
SMase**	0,1 Ед/мл	45,3±7,1%	54,2±6,9%	35,8±7,7%	67,6±7,4%
	1,0 Ед/мл	70,2±4,4%	72,8±5,1%	58,1±4,9%	91,8±2,5%
C2-церамид	0,1 мМ	18,9±3,8%	29,4±4,8%	25,5±3,2%	31,5±3,5%
	1,0 мМ	36,1±2,5%	46,2±2,1%	42,7±2,9%	54,2±3,6%

Примечание. \* АД — атопический дерматит; \*\* SMase — экзогенная бактериальная сфингомиелиназа

#### Определение уровня индуцированного апоптоза в соскобах кожи

Для определения уровня индуцированного апоптоза в клетках соскоба кожи мы использовали метод, в котором апоптоз был инициирован добавлением клеточно-проникающего C2-церамида в первичную культуру клеток кожи, полученных методом соскоба. Клетки отмывали и переносили в полную среду с сывороткой, куда добавляли 1 мМ C2-церамида на 2 часа, затем клетки отмывали, фиксировали и окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере. Этот же метод использовали для индукции апоптоза под действием экзогенной бактериальной сфингомиелиназы, которая имитирует действие патогенов бактериальной природы в эпидермисе и дерме кожи. Результаты представлены в табл. 2.

Синтезируемая бактериями сфингомиелиназа (SMase) при контакте с кожей инициирует сфингомиелиновый цикл, т.е. распад сфингомиелина (SM) с образованием церамида и далее сфингозина. Повышение уровня сфингозина в роговом слое изменяет соотношение липидов с жирными кислотами различной длины, что способствует снижению барьерной функции кожи [7].

В нашей работе максимальный уровень индукции апоптоза в клетках соскоба кожи обнаружен при добавлении бактериальной SMase в образцы клеток больных экземой (табл. 2), этот эффект носит дозо-зависимый характер. При псориазе действие SMase на клетки кожи менее выражено по сравнению с экземой.

При экземе также повышен процент церамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи по сравнению с донорами и больными атопическим дерматитом и псориазом (табл. 2). Действие клеточно-проникающего C2-церамида также носит дозо-зависимый характер.

Известно, что при контакте с C2-церамидом кератиноциты выходят в апоптоз, тогда как синтетический C18-церамид не проявляет токсических свойств, не вызывает падения митохондриального мембранного потенциала  $\Delta\Psi_m$ , не повышает уровень лактатдегидрогеназы или окраску на дериваты ДНК [25]. Апоптоз фибробластов кожи человека под действием экзогенного C2-церамида может быть заблокирован пептидами эластина, которые активируют протеинкиназу B (PKB)/Akt и ингибируют каспазу-9 [5].

При псориазе уровень церамидов снижается, что ослабляет проведение сигналов апоптоза и обуславливает развитие псориазических бляшек [15]. Добавление церамидов в концентрации 0,05% в мультиламеллярные везикулярные эмульсии улучшает эффективность их лечебных свойств при псориазе [8].

Известно, что церамид является вторичным мессенджером всех сигнальных путей апоптоза, сопряженных с

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и рецепторами семейства TNF- $\alpha$ . Определение уровня церамид-индуцированного апоптоза позволяет выявить клетки, которые гибнут в первую очередь при воздействии на кожу неблагоприятных факторов. Используемый нами метод позволяет оценить уровень спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза без существенных затрат в обычных клинических условиях.

#### Выводы

При псориазе, экземе и атопическом дерматите повышается процент спонтанного и индуцированного церамидом апоптоза. Определение апоптоза методом проточной цитометрии можно использовать для прогноза течения заболевания и назначения патогенетической терапии заболеваний кожи.

#### Список литературы

1. Мартынова Е.А. Регуляция активности каспаз в апоптозе // Биоорганическая химия. — 2003. — Т. 29, №5. — С. 518—543.
2. Andoh T., Saito A., Kuraishi Y. Leukotriene B(4) mediates sphingosylphosphorylcholine-induced itch-associated responses in mouse skin // J. Invest. Dermatol. — 2009. — Vol. 129, №12. — P. 2854—2860.
3. Armbruster N., Trautmann A., Brocker E.B. et al. Suprabasal spongiosis in acute eczematous dermatitis: cFLIP maintains resistance of basal keratinocytes to T-cell-mediated apoptosis // J. Invest. Dermatol. — 2009. — Vol. 129, №7. — P. 1696—1702.
4. Bikowski J. Case studies assessing a new skin barrier repair cream for the treatment of atopic dermatitis // J. Drugs Dermatol. — 2009. — Vol. 8, №11. — P. 1037—1041.
5. Catarelli B., Duca L., Blanchevoye C. et al. Elastin peptides antagonize ceramides — induced apoptosis // FEBS Lett. — 2009. — Vol. 583, №14. — P. 2385—2391.
6. Chen Y., Lind Enoksson S., Johansson C. et al. The expression of BAFF, APRIL and TWEAK is altered in eczema skin but not in the circulation of atopic and seborrheic eczema patients // PloS One. — 2011. — Vol. 6, №7. — P. E22202.
7. Di Marzio L., Cinque B., Cupelli F. et al. Increase of skin ceramide levels in aged subjects following a short-term topical application of bacterial sphingomyelinase from *Streptococcus thermophilus* // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. — 2008. — Vol. 21, №1. — P. 137—143.
8. Draelos Z.D. The effect of ceramide-containing skin care products on eczema resolution duration // Cutis. — 2008. — Vol. 81, №1. — P. 87—91.
9. Elias P., Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. — 2009. — Vol. 9(5). — P. 437—446.
10. Farwanah H., Wohlrab J., Neubert R., Raith K. Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS // Anal. Bioanal. Chem. — 2005. — Vol. 383, №4. — P. 632—637.
11. Hong K.K., Cho H.R., Ju W.C. et al. A study on altered expression of serine palmitoyltransferase and ceramidase in psoriatic skin lesion // Korean Med. Sci. — 2007. — Vol. 22, №5. — P. 862—867.



12. Huang H.C., Chang T.M. Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin // *Int. J. Dermatol.* — 2008. — Aug. — Vol. 47(8). — P. 812–819.
13. Jungersted J., Hellgren L., Drachmann T. et al. Validation of cyanoacrylate method for collection of stratum corneum in human skin for lipid analysis // *Skin Pharmacol. Physiol.* — 2010. — Vol. 23(2). — P. 62–67.
14. Kerstan A., Brocker E.B., Trautmann A. Decisive role of tumor necrosis factor- $\alpha$  for spongiosis formation in acute eczematous dermatitis // *Arch. Dermatol. Res.* — 2011. — Vol. 303, №9. — P. 651–658.
15. Lew B.L., Cho Y., Kim J. et al. Ceramides and cell signaling molecules in psoriatic epidermis: reduced levels of ceramides, PKC- $\alpha$ , and JNK // *J. Korean Med. Sci.* — 2006. — Vol. 21, №1. — P. 95–99.
16. Lu F., Gao J., Ogawa R. et al. Fas-mediated apoptotic signal transduction in keloid and hypertrophic scar // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2007. — Vol. 119, №6. — P. 1714–1721.
17. Nixon G.F., Mathieson F.A., Hunter I. The multi-functional role of sphingosylphosphorylcholine // *Prog. Lipid Res.* — 2008. — Jan. — Vol. 47(1). — P. 62–75.
18. Peternel S., Manestar-Blazic T., Brajac I. et al. Expression of TWEAK in normal human skin, dermatitis and epidermal neoplasms: association with proliferation and differentiation of keratinocytes // *J. Cutan. Pathol.* — 2011. — Vol. 38, №10. — P. 780–789.
19. Peternel S., Prcic-Massari L., Manestar-Blazic T. et al. Increased expression of TRAIL and its death receptors DR4 and DR5 in plaque psoriasis // *Arch. Dermatol. Res.* — 2011. — Vol. 303, №6. — P. 389–397.
20. Rebane A., Zimmermann M., Aab A. et al. Mechanisms of IFN- $\gamma$ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2012. — Vol. 129, №5. — P. 1297–1306.
21. Roujeau J., Gelard K., Bensussan A. Epidermal necrolysis: mechanism of keratinocytes apoptosis // *Med. Sci. (Paris).* — 2006. — Vol. 22, №2. — P. 188–191.
22. Ryu J., Park S.G., Park B.C. et al. Proteomic analysis of psoriatic skin tissue for identification of differentially expressed proteins: up-regulation of GSTP1, SFN and PRDX2 in psoriatic skin // *Int. J. Mol. Med.* — 2011. — Vol. 28, №5. — P. 785–792.
23. Shimada K., Yoon J., Yoshihara T. et al. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis // *Vet. Dermatol.* — 2009. — Vol. 20(5-6). — P. 541–546.
24. Truzzi F., Marconi A., Atzei P. et al. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes // *Cell. Death Differ.* — 2011. — Vol. 18, №6. — P. 948–958.
25. Uchida Y., Holleran W. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival // *J. Dermatol. Sci.* — 2008. — Vol. 51, №2. — P. 77–87.
26. Verhagen J., Akdis M., Traidl-Hoffmann C. et al. Absence of T-regulatory cell-expression and function in atopic dermatitis skin // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2006. — Vol. 117, №1. — P. 176–183.
27. Weatherhead S.C., Farr P.M., Jamieson D. et al. Keratinocyte apoptosis in epidermal remodeling and clearance of psoriasis induced by UV radiation // *J. Invest. Dermatol.* — 2011. — Vol. 131, №9. — P. 1916–1926.
28. Wittmann M., Zeitvogel J., Wang D., Werfel T. IL-27 is expressed in chronic human eczematous skin lesions and stimulates human keratinocytes // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2009. — Jul. — Vol. 124(1). — P. 81–89.
29. Zimmermann M., Koreck A., Meyer N. et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF- $\alpha$  cooperate in the induction of keratinocyte apoptosis // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2011. — Vol. 127, №1. — P. 200–207.

## ***Spontaneous and ceramide-induced apoptosis in the skin cells obtained from patients with atopic dermatitis, eczema, and psoriasis, compared with donors***

**Kandalova O.V.<sup>1</sup>, Taratutina N.V.<sup>1</sup>, Martinova E.A.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Department of the skin and venerological diseases, A.I. Evdokimov' Moscow State Medico-Stomatological University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Russian Academy of Medical Sciences, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya str., 8; e-mail: e.a.martinova@gmail.com

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of the Post-Diploma Education (RMAPO), Moscow, Russia

*This work aimed to investigate a level of an apoptosis (spontaneous and ceramide-induced) in the skin cells obtained from patients with atopic dermatitis, eczema, and psoriasis. We used the simple and low-cost laboratory method based on a fluorescence of propidium iodide in the fixed cells obtained by a scrape of skin followed by the flow cytometry analysis. The level of spontaneous apoptosis has been elevated in all samples from patients compared with healthy donors. The highest level of the skin cell apoptosis has been shown after eczema patient cells exposure to the bacterial sphingomyelinase. This effect was a dose-dependent. Psoriasis patient cells have been found to be less sensitive to sphingomyelinase compared with eczema ones. The level of the C2-ceramide — induced apoptosis in skin cells obtained from patients with eczema has been raised compared with atopic dermatitis patients and psoriasis. The apoptosis measured by this method may be used for a prognosis for skin diseases.*

**Key words:** *apoptosis, ceramide, atopic dermatitis, eczema, psoriasis*