

## ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ ХРОНИЧЕСКИХ ДЕРМАТОЗОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

Е.В. БРАТЦЕВА, С.А. МОШКОВСКИЙ, Л.Ф. ЗНАМЕНСКАЯ, А.А. КУБАНОВА, А.А. КУБАНОВ

### Search for potential biomarkers of inveterate dermatoses by means of proteomic analysis

YE. V. BRATSEVA, S. A. MOSHKOVSKY, L. F. ZNAMENSKAYA, A. A. KUBANOVA, A. A. KUBANOV

Об авторах:

Е.В. Братцева — аспирантка ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

С.А. Мошковский — зав. отделом протеомных исследований Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, г. Москва

Л.Ф. Знаменская — заведующая отделом дерматологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, к.м.н.

А.А. Кубанова — директор ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, академик РАН, д.м.н., профессор

А.А. Кубанов — заместитель директора по научной работе, ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., профессор

В обзоре освещены основные достижения протеомных исследований с применением методов масс-спектрометрии и двумерного электрофореза в области дерматологии. Рассматриваются работы по изучению наиболее распространенных хронических дерматозов, таких как псориаз, атопический дерматит, вульгарные угри и грибовидный микоз. На сегодняшний день протеомный анализ в дерматологии является перспективным направлением, так как позволяет расширить знания о молекулярных механизмах патогенеза хронических заболеваний кожи. Кроме того, протеомные технологии направлены на поиск потенциальных биомаркеров заболеваний и мишеней для воздействия лекарственных средств.

*Ключевые слова:* псориаз, атопический дерматит, акне, грибовидный микоз, протеомный анализ, масс-спектрометрия, 2D-электрофорез.

The review covers the key achievements of proteome studies using mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis methods in the field of dermatology. Works studying the most prevalent chronic dermatoses such as psoriasis, atopic dermatitis, acne vulgaris and mycosis fungoidea are examined. Proteome analysis in dermatology is a promising technique today because it makes it possible to study molecular pathogenic mechanisms of skin chronic diseases in a greater detail. In addition, proteome technologies are aimed at searching for potential disease biomarkers and targets for drugs.

*Key words:* psoriasis, atopic dermatitis, acne, mycosis fungoidea, proteome analysis, mass spectrometry, 2D electrophoresis.

Кожа является самым большим по площади органом человеческого организма, выполняющим множество важных функций. Так, она формирует естественный барьер для внешних стрессорных факторов (например, УФ-излучение, микроорганизмы), является органом иммуногенеза, участвует в терморегуляции и обмене. Такое разнообразие функций обуславливает сложность биохимических процессов, происходящих в коже. Любое воздействие на кожу вызывает системные изменения экспрессии многих генов как на уровне РНК, так и на белковом уровне. Высокопроизводительный анализ изменения экспрессии генов при различных биологических состояниях включает в себя такие постгеномные технологии, как транскриптомика и протеомика. Под транскриптомикой понимают одновременный анализ уровня большинства РНК-транскриптов, зачастую в масштабе целого генома. Протеомика же

объединяет высокопроизводительный качественный и количественный анализ белков в биоматериале [37].

В то время как геномика (и генетика) изучают нечто более или менее постоянное, задачи протеомики сложны из-за ситуационного характера совокупности белков (протеома). Действительно, каждый считываемый с мРНК белковый продукт может подвергаться посттрансляционным изменениям (фосфорилированию, гликозилированию, метилированию и др.), существовать в альтернативных вариантах за счет альтернативного сплайсинга и расщепления протеазами, а также взаимодействовать с другими белками (функциональная протеомика). Что касается кожи человека, то ее протеомный профиль и белок-белковые взаимодействия в ней настолько разнообразны, что некоторые авторы предлагают ввести термин «скиномика» (skinomics) для области протеомики, изучающей биомолекулы кожи и их взаимодействия [4].

Протеомика кожи человека находится, по существу, в начальной стадии своего развития. В част-

ности, методами протеомики исследован белковый профиль кожи при различных стрессовых воздействиях (бактериальной или вирусной инвазии, воздействии УФ-излучения, химических раздражителей и т. д.) [12, 13]. Протеомные методы широко используются для поиска биомаркеров злокачественных новообразований. Существующие в данной области разработки применяли для исследования хронических дерматозов и аутоиммунных заболеваний кожи с целью осуществления подходов к ранней диагностике, разработке прогностических моделей, а также для поиска новых мишеней лекарственных препаратов и контроля их терапевтической эффективности (табл. 1, 2).

### Методы протеомики

Общая техническая схема протеомного анализа состоит из двух последовательных этапов: разделения белков протеома и их идентификации в основном посредством различных методов масс-спектрометрии. После экстракции белков из биоматериала происходит их разделение различными методами. Распространенным методом исследова-

ния протеома кожи является двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (2-dimensional gel electrophoresis; 2DE). Двумерный электрофорез является методом разделения смеси белков на основании их заряда и массы. Так, в первом направлении белки перемещаются в геле в зависимости от значения своих изоэлектрических точек. На втором этапе электрофоретическое разделение происходит по молекулярной массе белков за счет их солиubilизации додецилсульфатом натрия. Этот метод позволяет провести разделение тысяч белков, которые на конечном этапе имеют вид окрашенных пятен на геле [14]. Другим распространенным вариантом разделения является жидкостная хроматография (liquid chromatography; LC), в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC). В связи с тем что HPLC плохо совместима с высокомолекулярными соединениями, белки протеома перед нанесением на хроматографическую колонку обычно расщепляют на пептиды протеазой, в частности трипсином.

Идентификацию белков проводят при помощи масс-спектрометрии (MS). Цитируя нобелевского

Таблица 1

Методы и биоматериал, применяющиеся в исследовании протеома при хронических дерматозах

Заболевание	Биоматериал	Метод исследования	Источник литературы
Псориаз	Сыворотка крови	Нано-LC-MS/MS + ИФА	[28]
		SELDI-TOF	[9]
	Кератиноциты	2-DE	[6, 7, 20]
	Биоптаты кожи	2-DE + MALDI-TOF MS	[5]
Атопический дерматит	Первичная культура фибробластов кожи из очагов атопического дерматита	2-DE + MALDI-TOF MS/LC-MS + ПЦП в реальном времени	[24–26]
	Эозинофилы периферической крови	2-DE + MALDI-TOF MS	[34]
	Мононуклеарные клетки периферической крови	2-DE + MALDI-TOF MS, ПЦП в реальном времени, иммуноблоттинг	[17]
Акне	Система тканевой камеры на животной модели, культура <i>P. asnes</i> , клетки сальных желез человека	Изотопные метки белков (isotope-coded protein label) + нано-LC-MS	[21]
Грибовидный микоз	Сыворотка крови	SELDI-TOF MS	[9]

Таблица 2

Цели исследования протеома при хронических дерматозах

Цель исследования	Псориаз	Атопический дерматит	Грибовидный микоз	Акне
Обнаружение биомаркеров	L. Carlen и соавт. [5]		E. Cowen и соавт. [9]	
Исследование патогенеза заболевания	J. Celis и соавт. [6,7], и P. Madsen и соавт. [20], T. Plavina и соавт. [28]	Y. Park и соавт. [23–25], S. Yoon и соавт. [34], W. Kim и соавт. [17]		T. Nakatsuji и соавт. [21]

лауреата Джона Фенна, можно сказать, что «масс-спектрометрия — это искусство измерения атомов для определения их молекулярной массы».

Данные масс-спектра пептидов белка возможно биоинформационными методами сравнить с теоретической информацией о последовательностях белков, предсказанных из генома. Физические и биоинформационные основы идентификации белков посредством масс-спектрометрии не являются предметом настоящего обзора и подробно описаны в других источниках [1, 2]. Кратко сообщим, что в сочетании с 2DE часто используют метод MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight — времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация) масс-спектрометрии [19]. Для анализа пептидной смеси часто используют также сопряжение жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). Многие масс-спектрометры предоставляют функцию физической фрагментации введенных в них соединений и регистрируют также массу их фрагментов (так называемая тандемная масс-спектрометрия — tandem mass spectrometry; MS/MS).

Отдельным вариантом исследования протеома является SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization time-of-flight — времяпролетная поверхностно-активированная лазерная десорбция / ионизация) масс-спектрометрия, которая представляет собой модификацию MALDI-TOF MS. Особенности данного метода состоят в упрощенной стадии разделения белков. Хроматографическая фаза для этого по методу SELDI находится непосредственно на мишени (чипе) MALDI-TOF-масс-спектрометра. Часть белков биоматериала (сыворотка, плазма крови, другие биологические жидкости, тканевые и клеточные экстракты) связывается с хроматографическим носителем, в то время как остальные удаляются путем промывки. Затем чип помещается в масс-спектрометр, и очищенные и обессоленные белки биоматериала регистрируются, как правило, без идентификации [15], что является недостатком метода. Преимуществом SELDI-TOF масс-спектрометра является ее высокая производительность, т. е. способность обработки сотен образцов и более за короткое время (см. рисунок).

### Акне

Акне (обыкновенные угри, *Acne vulgaris*) — хроническое воспалительное заболевание сальных желез и волосяных фолликулов. Акне является самым распространенным заболеванием кожи, оно поражает до 75% молодых людей, не достигших 20-летнего возраста. Однако угревая сыпь наблюдается и после 40 лет у 26% женщин и 12% мужчин [8]. Высыпания локализуются преимущественно на коже лица, груди и спины, т. е. на участках тела с повышенной секрецией кожного сала. Для акне характерен полиморфизм высыпаний, которые представлены закры-

тыми и открытыми комедонами, папулами, пустулами. В тяжелых случаях наблюдаются индуративные и узловато-кистозные элементы, которые могут привести к образованию выраженных рубцовых изменений [27]. В патогенезе угрей основную роль играет гиперпродукция кожного сала в сочетании с нарушением пролиферации эпителия выводного протока сальных желез, приводящая к закупорке фолликула. Обтурация выводного протока сальной железы приводит к формированию первичного элемента акне — комедона, в котором создаются анаэробные условия для роста *Propionibacterium acnes*. Бактерии вырабатывают множество ферментов и медиаторов воспаления, стимулирующих миграцию в очаг иммунных клеток хозяина (полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов), что приводит к формированию воспалительных элементов на коже [30, 32].

Иммунопатогенез вульгарных угрей до конца не исследован. Так, степень колонизации фолликулов *P. acnes* не всегда совпадает с тяжестью клинических проявлений. Дело в том, что создание экспериментальной модели акне vulgaris затруднено, что объясняется недостаточной для колонизации *P. acnes* продукцией триглицеридов в волосяных фолликулах животных. Интересное исследование было проведено Т. Nakatsuji и соавт. [21], которые использовали достижения биоинженерии для создания модели микроокружения сальной железы при акне *in vivo*. Система тканевой камеры (tissue chamber) создается при подшивании тефлонового цилиндра с микроотверстиями подкожно в переднюю брюшную стенку мыши. Через несколько дней камера полностью покрывается соединительной тканью, после чего в нее вводятся клетки сальных желез человека, встроенные в дерму (dermis-based cell-trapped system), а также культура *P. acnes* для индукции иммунного ответа хозяина. Клетки инфильтрата, полученного из тканевой жидкости данной камеры, представлены нейтрофилами и макрофагами.

Для протеомного анализа тканевой жидкости из камеры авторы использовали изотопные метки белков (isotope-coded protein label) в сочетании с хромато-масс-спектрометрией (нано-LC-MS). С помощью этих методов в тканевой жидкости было идентифицировано 11 белков, продуцируемых клетками мыши и человека, и 2 белка бактериального происхождения. Авторы подчеркивают, что на настоящий момент невозможно четко разграничить белки мышинового и человеческого происхождения. Однако было показано, что при колонизации *P. acnes* происходит изменение продукции четырех белков: фибриногена,  $\alpha$ -полипептида,  $\beta$ -цепи фибриногена, белка S100A9 и ингибитора сериновой протеиназы АЗК. Например, количество белка S100A9 значительно возросло после инъекции *P. acnes*. Авторы считают, что этот белок имеет про-

исхождение из клеток хозяина, так как он обычно входит в состав гетеродимера S100A8/A9, антимикробного агента нейтрофилов, ответственного также за рекрутирование лейкоцитов к месту воспаления. Продукция ингибитора сериновой протеиназы АЗК, наоборот, снизилась после инъекции *P. acnes*.

Ранее сообщалось, что в области высыпаний под влиянием *P. acnes* увеличивается продукция провоспалительных цитокинов [16, 36]. Однако в данной работе не было зафиксировано присутствия цитокинов в тканевой жидкости. Авторы объясняют это недостаточной чувствительностью хромато-масс-спектрометрии (нано-LC-MS), так как при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) в ответ на инъекцию *P. acnes* было зафиксировано увеличение уровня одного из цитокинов — макрофагально-воспалительного белка 2 (MIP-2) [21].

### Атопический дерматит

Атопический дерматит является одним из самых распространенных хронических воспалительных дерматозов. Заболеваемость среди населения развитых стран составляет около 20%. Локализация и морфологические особенности высыпаний зависят от возраста пациентов. Так, в детском возрасте преобладают экссудативные проявления с гиперемией, отеком, образованием корок, высыпания локализуются на лице и конечностях. С возрастом лихеноидный компонент начинает преобладать над экссудативным, характерно появление папул, инфильтрации на лице, шее, верхних конечностях. На основании наличия или отсутствия аллергии у пациента принято разделение атопического дерматита на «внутренний» (intrinsic) и «внешний» (extrinsic) типы. У 15—45% пациентов, страдающих атопическим дерматитом, в крови определяется повышенный уровень общего и аллергенспецифических IgE, а также положительные кожные аллергические пробы. Этот тип атопического дерматита определяют как «внутренний» (intrinsic). Напротив, атопический дерматит, при котором отсутствует сенсibilизация к пищевым или аэроаллергенам, определяют как «внешний» тип [23].

В исследовании Y. Park и соавт. была сделана попытка обнаружить различия между двумя типами атопического дерматита на уровне протеома. Субстратом для исследования являлась первичная культура фибробластов, полученных из очагов поражения у больных «внешним» и «внутренним» типами атопического дерматита. В качестве контроля использовали культуру фибробластов, полученную при биопсии кожи здоровых доноров. Методом двумерного электрофореза в культуре фибробластов из очагов атопического дерматита был выделен 31 белок, экспрессия 18 из которых была увеличена по сравнению с контролем, экспрессия 8 белков была снижена и в 5 белках были обнаружены посттрансляционные модификации. Идентификация белков

проводилась методом MALDI-TOF. Кроме того, методом полуквантитативно-полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени определяли количество мРНК четырех из идентифицированных белков с повышенной экспрессией (белка 4, связывающего FK-506, опгтейрина, аннексина А5, PGM 3) и четырех белков с посттрансляционными модификациями. Авторы отводят важную роль в патогенезе атопического дерматита дефекту в процессе посттрансляционной модификации белков, таких как виментин, промежуточная АТФаза (transitional-ER ATPase), архаин и NCC27, а также увеличению экспрессии белков PGM3, OPTIN и промежуточной АТФазы по сравнению с нормальной кожей. Кроме того, большое значение имеет фактор некроза опухоли  $\alpha$ , экспрессия которого увеличена в макрофагах больных «внешним» типом атопического дерматита [24].

В другой работе эта же группа исследователей в первичной культуре фибробластов из очагов атопического дерматита методом 2D-электрофореза с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией выявили ряд белков, ассоциированных с атопическим дерматитом. Так, при атопическом дерматите было обнаружено увеличение экспрессии убиквитин-специфичной протеиназы 14, тогда как экспрессия цитовиллина-1, изоформы С глутаминазы, изоформы 5 кальдесмона 1, нуклеофосмина-1, chloride intracellular channel 4 и эстеразы D была снижена. Изменение экспрессии последних четырех белков было обнаружено на уровне как транскрипции, так и трансляции (что подтверждено методом ПЦР в реальном времени), поэтому они могут играть важную роль в патогенезе атопического дерматита. Данные белки в коже участвуют в адгезии клеток (цитовиллин), входят в состав цитоскелета (chloride intracellular channel 4) и внеклеточного матрикса, они участвуют в регуляции апоптоза кератиноцитов и Т-лимфоцитов, поэтому могут играть роль в цитокиноопосредованном воспалении [25]. Кроме того, последние исследования показывают, что важную роль в патогенезе атопического дерматита могут играть ферменты [26]. В первую очередь это ацетальдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1), экспрессия которой при атопическом дерматите «внешнего» и «внутреннего» типов снижена на уровне как мРНК, так и белковых продуктов.

Как известно, атопический дерматит, в частности «внешний» его тип, часто сопровождается эозинофилией, в основе которой лежит увеличение продолжительности жизни эозинофилов или уменьшение апоптоза этих клеток [10]. Для выявления белков, вовлеченных в анти-апоптотический процесс, S. Yoop и соавт. исследовали протеомный профиль эозинофилов больных атопическим дерматитом с эозинофилией и здоровых доноров [34]. При исследовании методом 2D-электрофореза образцов от больных атопическим дерматитом ав-



торы обнаружили больше белковых пятен ( $1310 \pm 58$ ), чем в образцах от здоровых доноров ( $1121 \pm 40$ ). Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было идентифицировано 70 белков, 51 из которых имели различия в уровне экспрессии между исследуемыми группами. При эозинофилии было выявлено увеличение экспрессии 46 белков, 19 из которых задействованы в передаче сигнала (signalling), 8 в регуляции метаболизма, 4 в запуске апоптоза и 3 участвуют в воспалении. Наиболее выраженное увеличение экспрессии наблюдалось для циклина A2, voltage-dependent anion channel protein 2 и белка 8, связывающего FK506 (38 кД). Действительно, циклин A2 и белок, связывающий FK506, могут быть вовлечены в анти-апоптотический механизм в эозинофилах, так как эти белки ассоциированы с клеточным циклом и принимают участие в клеточной пролиферации [33]. Экспрессия 5 белков у больных atopическим дерматитом была снижена по сравнению с контрольной группой. Среди этих белков один полностью отсутствовал в эозинофилах больных atopическим дерматитом. С помощью иммунопреципитации и иммуноблоттинга исследователи определили, что этот белок является тирозинфосфорилированной формой Grb7 adaptor protein. Авторы предполагают, что уменьшение экспрессии фосфорилированной формы этого белка, а также регулирующего его белка focal adhesion kinase (FAK) в группе больных atopическим дерматитом может быть связано с антиапоптотическим процессом при эозинофилии, например путем ингибирования Ras-сигнального пути [34].

W. Kim и соавт. провели протеомный анализ мононуклеарных клеток из периферической крови пациентов, страдающих atopическим дерматитом, и здоровых доноров. В исследовании применяли метод 2D-электрофореза с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией, затем результаты эксперимента были подтверждены с использованием методов real-time ПЦР и иммуноблоттинга. Значительные различия между этими группами отмечались в экспрессии 14 белков. У больных atopическим дерматитом отмечалось увеличение экспрессии белка PTPNB, а также двукратное снижение экспрессии белка  $\alpha$ -SNAB, который участвует в трансмембранном транспорте. Последние исследования показали, что этот белок может использоваться в качестве терапевтической мишени при сахарном диабете, раке и некоторых неврологических заболеваниях [3]. Экспрессия белков цитоскелета винкулина и FLNA также снижена в мононуклеарах периферической крови больных atopическим дерматитом. Увеличена экспрессия белка PTPNB [17].

### Псориаз

Псориаз является одним из самых распространенных хронических дерматозов, им страдает около

2% населения развитых стран [30]. Заболевание характеризуется появлением на коже розово-красных папул, склонных к слиянию в бляшки, которые могут занимать обширные участки тела, вплоть до эритродермии. В развитии заболевания лежат активация в коже Т-лимфоцитов (преимущественно Т1-хелперов), а также гиперпролиферация кератиноцитов [18, 22].

С целью идентификации белков, вовлеченных в патогенез псориаза, проводились исследования белковых паттернов кератиноцитов методом 2D-электрофореза. Например, J. Celis и соавт. проводили сравнение белкового профиля кератиноцитов из псориазных очагов и кератиноцитов из кожи здоровых доноров. Авторы выявили 6 белков, продукция которых при псориазе была повышена в 5 раз и более по сравнению с кожей здоровых доноров и свободной от высыпаний кожей больных псориазом. Кажущиеся молекулярные массы этих белков составляли 40,3, 12,4, 11,9, 11,6, 11,6 и 10,1 кДа. Однако в этой ранней работе идентификацию белков не проводили [6, 7]. В исследовании P. Madsen и соавт. также методом 2D-электрофореза осуществляли сравнение кератиноцитов из очагов псориаза и из кожи здоровых доноров [20]. В результате были выявлены низкомолекулярные белки, экспрессия которых значительно увеличена при псориазе: псориазин, калгранулин В (также известный как MRP 14), калпроктин (L1), калгранулин А (MRP 8) и цистатин А. Кроме того, авторами был идентифицирован новый ассоциированный с псориазом белок, связывающий жирные кислоты (psoriasis-associated fatty acid-binding protein, PA-FABP).

T. Plavina и соавт. методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии выявили значительное увеличение концентрации белков цитоскелета и их фрагментов в крови больных псориазом. Эти белки играют роль в межклеточной адгезии, взаимодействии клетки с внеклеточным матриксом, ее пролиферации и миграции, формировании межклеточных синапсов, т. е. в механизмах, которые и являются ключевыми в патогенезе псориаза. Это такие белки, как талин, винкулин, паксиллин, филламин и стимулируемый вазодилатацией фосфопротеин (VASP). Концентрация кальгранулинов А и В, которые являются  $Ca^{2+}$ -связывающими белками, также увеличена в крови больных псориазом. Авторы предполагают, что гиперпродукция кальгранулинов ведет к нарушению гомеостаза  $Ca^{2+}$  в эпидермисе и повреждению внутри- и внеклеточных структур цитоскелета, запускает их протеолиз, что вызывает увеличение концентрации белков цитоскелета в сыворотке крови. По другой гипотезе, увеличение концентрации циркулирующих белков цитоскелета и их фрагментов приводит к аутоиммунному ответу на них. Кроме того, авторы обнаружили, что у больных псориазом снижен протеолиз фибриногена, что

выражалось в уменьшении числа и концентрации его фрагментов в сыворотке крови. Возможно, что нарушения протеолиза фибриногена у лиц, страдающих псориазом, имеют связь с повышенным риском развития у них сердечно-сосудистых заболеваний [28].

Излюбленными местами локализации высыпаний при вульгарном псориазе является кожа локтей, коленей, волосистой части головы, а также места, подвергающиеся трению и травматизации. Существуют другие клинические проявления псориаза, например, каплевидный псориаз, характеризующийся высыпаниями в виде красных пятен с шелушением на поверхности на коже туловища и конечностей. Этот тип чаще встречается у молодых людей после воздействия провоцирующего фактора (например, стрептококковой инфекции) и может со временем трансформироваться в вульгарный псориаз, что служит доказательством родственности этих заболеваний. Однако некоторые авторы считают эти состояния самостоятельными заболеваниями с различным иммунопатогенезом [11]. С целью идентификации белков, вовлеченных в патогенез этих двух типов псориаза, L. Carlen и соавт. проводили сравнение протеомных профилей кожи из очагов вульгарного и каплевидного псориаза [5]. В качестве контроля использовали кожу больных хронической экземой и здоровых доноров. В исследовании применяли метод 2D-электрофореза, затем выбранные белки были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Авторы идентифицировали 21 белок, экспрессия которых имела значительные различия в псориатической коже (независимо от типа) и здоровой коже. Экспрессия цитокератинов 10 и 17, а также белка SCCA-2 была выше при обоих типах псориаза по сравнению с нормальной кожей. Эти результаты подтверждают данные предыдущих работ, где было показано, что белок SCCA-2 принадлежит к семейству ингибиторов сериновых протеиназ, и его концентрация в сыворотке крови больных псориазом, а также экспрессия в пораженной коже коррелируют с тяжестью заболевания [31]. Экспрессия белка RhoGDI при псориазе, независимо от формы заболевания, была также увеличена по сравнению со здоровой кожей. Этот белок принадлежит к Rho-семейству, вовлеченному в трансформацию и адгезию клеток путем регуляции актинового цитоскелета. При бляшечном псориазе в сравнении со здоровой кожей отмечалось увеличение экспрессии цитокератинов 14 и 17, HSP27 и 14-3-3 $\sigma$ , а снижение экспрессии показано для цитокератинов 10 и 15, а также кальциейрина. Авторы обнаружили значимые различия между каплевидным и вульгарным псориазом при использовании кластерного анализа значений белковой экспрессии. На этом основании они предполагают, что эти два типа псориаза являются различными

по своей природе состояниями. Интересно, что при кластерном анализе каплевидный псориаз оказывается ближе к хронической экземе, чем к вульгарному псориазу, что, возможно, свидетельствует о влиянии длительности воспалительного процесса на кластеризацию.

В пилотном исследовании E. Cowen и соавт. сделали попытку обнаружить белковые маркеры, отличающие хронические заболевания кожи (в данной работе в качестве контрольной группы были выбраны больные псориазом) от опухолевой стадии грибковидного микоза [9]. Это заболевание характеризуется клональной пролиферацией и миграцией в кожу злокачественных Т-лимфоцитов или НК-клеток. Клинические проявления грибковидного микоза могут быть представлены эритематозными пятнами, бляшками и опухолевыми элементами, на последних стадиях в патологический процесс могут вовлекаться внутренние органы. Однако высыпания настолько разнообразны, что часто диагностируются как атопический дерматит, розовый лишай, псориаз и т. д., за что грибковидный микоз называют «великим имитатором» [35]. В исследовании использовали сыворотку крови больных грибковидным микозом, псориазом и здоровых доноров. Для анализа применялся метод SELDI-TOF масс-спектрометрии. Авторы сообщают, что этот метод позволяет дифференцировать опухолевую стадию грибковидного микоза от псориаза, его чувствительность составляет 78,6% (78,6%), специфичность — 86,7% (93,8%) (в зависимости от использовавшейся платформы для масс-спектрометрии). Чувствительность метода при сравнении сыворотки крови больных псориазом и здоровых доноров составляла 86,7% (93,8%), специфичность — 75,0% (76,9%). Сыворотку больных грибковидным микозом возможно отличить от сыворотки здоровых доноров с чувствительностью 62,5% (71,4%) и специфичностью 91,7% (92,9%). Исследователи выделили 11 пиков, имевших значительные статистические различия при сравнении сыворотки больных грибковидным микозом и здоровых лиц, идентификация их в работе проведена не была. Однако авторы обнаружили зависимость между выживаемостью пациентов и интенсивностью данных пиков [9].

В заключение следует подчеркнуть, что исследования в области протеомики кожных болезней находятся на ранней стадии развития. На настоящий момент имеется информация лишь об отдельных работах с применением протеомных технологий — двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. Кроме того, усилия в данной области сосредоточены на анализе наиболее распространенных дерматозов — атопического дерматита и псориаза, и имеется всего несколько работ, посвященных другим заболеваниям, например грибковидному микозу или вульгарным угрям. Тем не менее, в дерматологии протеомный анализ представляется перспектив-

ным направлением, так как позволит расширить знания специалистов о молекулярных механизмах патогенеза хронических заболеваний кожи. Возможность идентификации белков — потенциальных биомаркеров заболеваний и мишеней для воздействия лекарственных средств создает предпосылки для развития в дерматологии подходов доказательной молекулярной медицины.

### Литература

- Gygi S. P., Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000. Vol. 4. P. 489—494.
- Nesvizhskii A. I. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching // *Methods. Mol. Biol.* 2007. Vol. 367. P. 87—119.
- Andreeva A. V., Kutuzov M. A., Voyno-Yasenetskaya T. A. A ubiquitous membrane fusion protein alpha SNAP: a potential therapeutic target for cancer, diabetes and neurological disorders? // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2006. Vol. 10. P. 723—733.
- Blumenberg M. Skinomics // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 124. P. viii-x.
- Carlen L. M., Sanchez F., Bergman A. C., Becker S., Hirschberg D., Franzen B., Coffey J., Jornvall H., Auer G., Alaiya A. A., Stahle M. Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 124. P. 63—69.
- Celis J. E., Cruger D., Kiil J., Lauridsen J. B., Ratz G., Basse B., Celis A. Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 262. P. 159—164.
- Celis J. E., Madsen P., Rasmussen H. H., Leffers H., Honore B., Gesser B., Dejgaard K., Olsen E., Magnusson N., Kiil J., et al. A comprehensive two-dimensional gel protein database of noncultured unfractionated normal human epidermal keratinocytes: towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases // *Electrophoresis.* 1991. Vol. 12. P. 802—872.
- Collier C. N., Harper J. C., Cafardi J. A., Cantrell W. C., Wang W., Foster K. W., Elewski B. E. The prevalence of acne in adults 20 years and older // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008. Vol. 58. P. 56—59.
- Cowen E. W., Liu C. W., Steinberg S. M., Kang S., Vonderheid E. C., Kwak H. S., Booher S., Petricoin E. F., Liotta L. A., Whiteley G., Hwang S. T. Differentiation of tumour-stage mycosis fungoides, psoriasis vulgaris and normal controls in a pilot study using serum proteomic analysis // *Br. J. Dermatol.* 2007. Vol. 157. P. 946—953.
- Domae M., Sagara H., Sakaue M., Fukuda T., Kamikawa Y. The antiallergic drug oxatomide promotes human eosinophil apoptosis and suppresses IL-5-induced eosinophil survival // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 111. P. 567—572.
- Guldbakke K. K., Khachemoune A. Guttate psoriasis // *Dermatol. Nurs.* 2006. Vol. 18. P. 369.
- Hensbergen P., Alewijnse A., Kempenaar J., van der Schors R. C., Balog C. A., Deelder A., Beumer G., Ponc M., Tensen C. P. Proteomic profiling identifies an UV-induced activation of cofilin-1 and destrin in human epidermis // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 124. P. 818—824.
- Huang C. M., Elmets C. A., van Kampen K. R., Desilva T. S., Barnes S., Kim H., Tang D. C. Prospective highlights of functional skin proteomics // *Mass Spectrom. Rev.* 2005. Vol. 24. P. 647—660.
- Huang C. M., X. H., Wang C. C., Elmets C. A. Proteomic characterization of skin and epidermis in response to environmental agents // *Expert. Rev. Proteomics.* 2005. Vol. 2. P. 809—820.
- Issaq H. J., Conrads T. P., Prieto D. A., Tirumalai R., Veenstra T. D. SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. P. 148A—155A.
- Jugeau S., Tenaud I., Knol A. C., Jarrousse V., Quereux G., Khammari A., Dreno B. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes* // *Br. J. Dermatol.* 2005. Vol. 153. P. 1105—1113.
- Kim W. K., Cho H. J., Ryu S. I., Hwang H. R., Kim D. H., Ryu H. Y., Chung J. W., Kim T. Y., Park B. C., Bae K. H., K. Y., Lee S. C. Comparative proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis patients and healthy donors // *BMB Rep.* 2008. Vol. 41. P. 597—603.
- Krueger J. G., Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis // *Ann. Rheum. Dis.* 2005. Vol. 64 Suppl 2. P. ii30—36.
- Lottspeich F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. Vol. 38. P. 2476—2492.
- Madsen P., Rasmussen H. H., Leffers H., Honore B., Celis J. E. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins // *J. Invest. Dermatol.* 1992. Vol. 99. P. 299—305.
- Nakatsuji T., Shi Y., Zhu W., Huang C. P., Chen Y. R., Lee D. Y., Smith J. W., Zouboulis C. C., Gallo R. L., Huang C. M. Bioengineering a humanized acne microenvironment model: proteomics analysis of host responses to *Propionibacterium acnes* infection in vivo // *Proteomics.* 2008. Vol. 8. P. 3406—3415.
- Nickoloff B. J., Nestle F. O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113. P. 1664—1675.
- Park J. H., Choi Y. L., Namkung J. H., Kim W. S., Lee J. H., Park H. J., Lee E. S., Yang J. M. Characteristics of extrinsic vs. intrinsic atopic dermatitis in infancy: correlations with laboratory variables // *Br. J. Dermatol.* 2006. Vol. 155. P. 778—783.
- Park Y. D., Kim S. Y., Jang H. S., Seo E. Y., Namkung J. H., Park H. S., Cho S. Y., Paik Y. K., Yang J. M. Towards a proteomic analysis of atopic dermatitis: a two-dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometric analysis of cultured patient-derived fibroblasts // *Proteomics.* 2004. Vol. 4. P. 3446—3455.
- Park Y. D., Lyou Y. J., Yang J. M. Detection of down-regulated acetaldehyde dehydrogenase 1 in atopic dermatitis patients by two-dimensional electrophoresis // *Exp. Dermatol.* 2007. Vol. 16. P. 130—134.
- Park Y. D., Lyou Y. J., Yang J. M. Two-dimensional electrophoresis analyses of atopic dermatitis and the chances to detect new candidate proteins by the variations in immobilized pH gradient strips // *J. Dermatol. Sci.* 2007. Vol. 47. P. 9—17.
- Pawin H., Chivot M., Beylot C., Faure M., Poli F., Revuz J., Dreno B. Living with acne. A study of adolescents' personal experiences // *Dermatology.* 2007. Vol. 215. P. 308—314.
- Plavina T., Hincapie M., Wakshull E., Subramanyam M., Hancock W. S. Increased plasma concentrations of cytoskeletal and Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and their peptides in psoriasis patients // *Clin. Chem.* 2008. Vol. 54. P. 1805—1814.
- Purdy S., de Berker D. Acne // *Bmj.* 2006. Vol. 333. P. 949—953.
- Rahman P., Elder J. T. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 2005. Vol. 64 Suppl 2. P. ii37—39; discussion ii40—31.
- Takeda A., Higuchi D., Takahashi T., Ogo M., Baciu P., Goetinck P. F., Hibino T. Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin // *J. Invest. Dermatol.* 2002. Vol. 118. P. 147—154.
- Tom W. L., Barrio V. R. New insights into adolescent acne // *Curr. Opin. Pediatr.* 2008. Vol. 20. P. 436—440.
- Tsujimoto Y., Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis // *Biochimie.* 2002. Vol. 84. P. 187—193.
- Yoon S. W., Kim T. Y., Sung M. H., Kim C. J., Poo H. Comparative proteomic analysis of peripheral blood eosinophils from healthy donors and atopic dermatitis patients with eosinophilia // *Proteomics.* 2005. Vol. 5. P. 1987—1995.
- Zackheim H. S., McCalmont T. H. Mycosis fungoides: the great imitator // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002. Vol. 47. P. 914—918.
- Zouboulis C. C. Acne and sebaceous gland function // *Clin. Dermatol.* 2004. Vol. 22. P. 360—366.
- Говорун В. М., Арчаков А. И. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке // *Биохимия.* 2002. Т. 67. С. 1341—1359.