

Протеомные технологии в изучении патогенеза псориаза

Л.Ф. Знаменская

Proteome technologies in studying the pathogenesis of psoriasis

L.F. ZNAMENSKAYA

об авторах: ▶

Л.Ф. Знаменская — заведующая отделом дерматологии ФГУ «ГНЦДК Минздравсоцразвития России», г. Москва, к.м.н.

Псориаз является одним из наиболее распространенных воспалительных дерматозов, однако патогенез этого заболевания до конца не изучен. В настоящее время перспективным методом исследования биологических механизмов развития различных заболеваний является протеомное профилирование. Протеомные технологии позволяют обнаружить изменения в белковом профиле кожи больных псориазом и идентифицировать выявленные белки. Такие белки служат потенциальными мишенями для воздействия лекарственных средств либо биомаркерами для оценки индивидуального ответа пациента на лекарственные препараты. В статье приведены основные достижения в изучении патогенеза псориаза с применением протеомных технологий (двухмерного электрофореза и масс-спектрометрии), изложенные в современной литературе, а также приведен анализ результатов собственных исследований, направленных на выявление белков — маркеров ответа пациентов на терапию препаратом инфликсимаб.

Ключевые слова: псориаз, инфликсимаб, протеомный анализ, двухмерный электрофорез, масс-спектрометрия, MALDI-TOF, SELDI-TOF.

Psoriasis is one of the most prevalent inflammatory dermatoses. At the same time, its pathogenesis has not been studied in full. Proteome profiling is currently a promising method to study the biological mechanisms of developing different diseases. Proteome technologies make it possible to detect changes in the skin protein profile in psoriatic patients and identify the revealed proteins. The proteins serve as potential targets for drugs or biomarkers for assessing the patient's individual drug response. The article describes the key achievements in the field of studying the pathogenesis of psoriasis using proteome technologies (two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry) set out in the latest literature sources, and also analyzes the results of the author's studies aimed at detecting proteins being markers of the patients' response to the infliximab therapy.

Key words: psoriasis, infliximab, proteome analysis, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, MALDI-TOF, SELDI-TOF.

■ Псориаз является одним из наиболее распространенных хронических воспалительных дерматозов. В мире этим заболеванием страдают около 125 млн человек [1]. Псориаз в значительной степени снижает качество жизни пациента, что сравнимо с такими тяжелыми системными заболеваниями, как рак, ревматоидный артрит, гипертоническая болезнь, сахарный диабет или депрессия [2, 3]. Более чем у половины больных заболевание появляется в возрасте до 21 года, сопровождая человека на протяжении всей его жизни и требуя постоянного лечения, особенно при развитии тяжелых форм заболевания [4], что

делает проблему псориаза не только медицинской, но и социальной.

Согласно современным представлениям псориаз — генетически обусловленное заболевание, в основе развития которого лежат иммунные механизмы (активация кератиноцитов, Т-лимфоцитов, запуск каскада провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины (IL)=1 β , -8, -12, фактор некроза опухоли (TNF- α), интерферон γ (IFN- γ) и др.), а также избыточная пролиферация и нарушение дифференцировки кератиноцитов [5–7]. Прорыв в понимании биологических механизмов развития многих заболеваний был

достигнут благодаря применению биоаналитических методов исследования генома, транскриптома и протеома. Изучением протеома занимается протеомика, в задачи которой входит анализ белка: структуры, последовательности, соотнесение с банком данных, выяснение механизмов белок-белковых взаимодействий [8]. Большую роль в функционировании белков играют их посттрансляционные модифицированные формы, которые как раз являются потенциальными мишенями для лекарственных препаратов. Белки, модифицированные или меняющие концентрацию при болезни, можно выявить методами протеомного анализа [9].

Протеомные технологии позволяют получать информацию сразу о больших совокупностях белков и сравнивать наборы белков в различных выборках пациентов, например у больных и здоровых. Среди протеомных методов, используемых для непосредственного обнаружения и идентификации белков, существенную роль играет двухмерный электрофорез с последующей идентификацией белков посредством различных методов масс-спектрометрии. Двухмерный электрофорез в полиакриламидном геле позволяет разделять белки в одном направлении методом изоэлектрофокусирования, а в другом — по массе. Для выявления биомаркеров сравнивают интенсивность пятен на геле для различных выборок пациентов [10]. Затем пятна, которые существенно различаются между группами сравнения, вырезают из геля и идентифицируют масс-спектрометрическим методом.

Помимо классического двухмерного электрофореза для разделения белков применяется его усовершенствованный вариант — дифференциальный (разностный) электрофорез в геле (DIGE, Difference gel electrophoresis). При использовании этой методики белковые экстракты из двух образцов (например, больной и здоровой ткани) метят различными флюоресцентными красителями. Чаще всего используется пара цианиновых красителей: Cy3 (обладающий зеленой флюоресценцией) и Cy5 (флюоресцирующий красным светом). Затем проводят двухмерный электрофорез и выполняют анализ полученного геля. Если белки присутствуют в обеих пробах, они оказываются мечеными и Cy3, и Cy5 — при этом наблюдается желтая флюоресценция пятна. Если белок присутствует только в одной пробе, то пятно будет либо зеленым, либо красным. Такой подход позволяет достичь полной идентичности условий проведения электрофореза и за счет этого повысить воспроизводимость результатов [11, 12].

Вместе с тем двухмерный электрофорез имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, он является трудоемким и плохо воспроизводимым. Во-вторых, обладает низкой разрешающей способностью для низкомолекулярных белков (до 15 000 Д), тогда как именно эта фракция белков представляет интерес в плане поиска биомаркеров.

Другим распространенным методом разделения белков является жидкостная хроматография, в частности высокоаффинная жидкостная хроматография [8].

Идентификацию выбранных белков проводят при помощи масс-спектрометрии. Одной из наиболее распространенных технологий является матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF — Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight) [13]. В биомедицинских исследованиях также популярной оказалась технологическая платформа SELDI-TOF — времяпролетная масс-спектрометрия с активированной поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization time-of-flight). Метод SELDI-TOF позволяет проводить экспресс-фракционирование биологических образцов на чипах с различными типами хроматографической поверхности перед снятием масс-спектров. Белковый чип представляет собой пластину с пятнами хроматографической поверхности, на которую наносят образцы исследуемой жидкости перед анализом. Используют чипы с различной хроматографической поверхностью: гидрофильной, гидрофобной, а также анионообменные, катионообменные или металлоаффинные [8]. В зависимости от выбранного чипа и типа буфера с активной поверхностью связывается разный набор белков. Чип помещают в вакуумную камеру и пятна облучают лазером. Ионизированные за счет энергии лазера белки отрываются от поверхности чипа, по вакуумной трубке летят к противоположному заряженному электроду и там детектируются [14].

Существуют масс-спектрометры, сопряженные с жидкостной хроматографией (LC-MS), а также имеющие функцию физической фрагментации введенных в них соединений и регистрирующие массу этих фрагментов (тандемная масс-спектрометрия, MS/MS) [8].

Число исследований с применением методов протеомики у больных псориазом ограничено. С целью идентификации белков, вовлеченных в патогенез псориаза, было проведено несколько пилотных протеомных исследований [15—18].

Первые исследования в этой области проводились методом двухмерного электрофореза без последующей идентификации белков. В работе J. Celis и соавт. использовали белковый экстракт из некультивированных кератиноцитов больных псориазом и кожи здоровых людей. В пораженной коже, а также свободной от высыпаний коже больных псориазом было выявлено увеличение экспрессии 6 белков в 5 раз и более по сравнению с нормой [19, 20]. В дальнейшем методом секвенирования эти белки были идентифицированы как псориазин, калгранулин В (MRP 14), калпротектин (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) [21].

L. Carlen и соавт. проводили сравнение протеомных профилей пораженной и видимо здоровой кожи, образцы которых были получены от больных различными типами псориаза: вульгарным и каплевидным, ассоциированным со стрептококковой инфекцией верхних дыхательных путей [22]. В качестве контроля использовали биоптат кожи, полученный из области экспериментально вызванного контактного дерматита у добровольцев, и образцы кожи здоровых доноров. Разделение белков проводили методом двумерного электрофореза, затем методом MALDI-TOF масс-спектрометрии был идентифицирован 21 белок, экспрессия которых была выше в области псориатических высыпаний по сравнению со здоровой кожей. Независимо от типа псориаза в коже больных отмечалась гиперэкспрессия цитокератинов 10 и 17, а также белка SCCA-2. Эти данные подтверждаются результатами других работ, в которых было показано увеличение уровня белка SCCA-2 в сыворотке крови больных псориазом и его корреляция с тяжестью заболевания [23]. При кластерном анализе данных протеомного исследования отмечалось четкое разделение групп больных вульгарным и каплевидным псориазом. При этом последний по белковому профилю оказался ближе к группе контактного дерматита. Авторы высказывают предположение, что близость этих групп при кластеризации объясняется остротой и выраженностью воспалительного ответа при каплевидном псориазе и контактном дерматите, тогда как при хронической форме вульгарного псориаза воспалительный ответ выражен в меньшей степени.

N. Macdonald и соавт. методами протеомного профилирования исследовали жидкость из экспериментально вызванного пузыря на коже больного псориазом, свободной от высыпаний, и здорового индивидуума. В пузырьной жидкости было обнаружено 670 белков, различия в концентрациях были выявлены только для 9 белков, однако полученные в работе данные статистически незначимы [17].

В нескольких работах исследователи в качестве субстрата использовали не образцы кожи, а сыворотку крови больных псориазом. E. Cowen и соавт. провели масс-спектрометрическое профилирование сыворотки крови больных псориазом, грибковидным микозом и здоровых доноров. Показано, что на основе масс-спектрометрических профилей можно с довольно высокой точностью различить эти состояния [16]. T. Plavina и соавт. использовали плазму крови для поиска биомаркеров псориаза. Идентификацию потенциальных биомаркеров проводили путем наножидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией. В результате удалось найти 11 белков, различающихся по концентрации в плазме здоровых и больных псориазом людей. Выявленные

белки — талин, винкулин, паксиллин, филамин, стимулируемый вазодилатацией фосфопротеин (VASP) — принадлежат к классу структурных белков цитоскелета, они вовлечены в процессы межклеточной адгезии и пролиферации, которые имеют патогенетическое значение в развитии псориаза. Еще несколько выявленных белков — кальгранулины А и В — являются Ca²⁺-связывающими белками [18].

Нами была обнаружена только одна отечественная работа по исследованию псориаза с применением протеомных технологий. С.А. Брускин и соавт. провели исследование образцов пораженной и визуально неизменной кожи, полученных от 3 больных псориазом методом электрофореза. После окрашивания геля было выявлено 10 новых пятен, которые не встречались (или их интенсивность была существенно ниже) в непораженной коже, но обнаруживались в пораженной коже. Идентификацию белков проводили при помощи метода MALDI-TOF масс-спектрометрии и метода nano-LC-MS/MS. Были идентифицированы следующие белки: кератины 14, 16 и 17, S100A7, S100A9, енолаза 1, SOD2, Gal7, SCCA1 и SCCA2 [24].

Таким образом, протеомные технологии позволяют осуществлять поиск новых диагностических маркеров и патогенетически значимых белков в различных субстратах (ткани и крови). Новым направлением в применении протеомных методов является поиск маркеров, которые позволяют объяснить различную эффективность лекарственных средств, оценить индивидуальную чувствительность пациента к действию препарата, а также объяснить фармакологический эффект препаратов на биомолекулярном уровне. В настоящее время опубликованы результаты единственного протеомного исследования с применением автоматизированной технологии MELC (multi-epitope ligand cartography), где продемонстрирована разница в концентрациях ряда белков в коже больных псориазом до и после лечения препаратом эфализумаб, а также у резистентного к терапии эфализумабом индивидуума [25]. В работе были продемонстрированы различия в концентрации ряда белков до и после лечения данным препаратом, а также у резистентного к терапии эфализумабом больного.

Целью исследования явился поиск биомаркеров различного клинического ответа больных псориазом на терапию препаратом инфликсимаб с применением протеомных технологий.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 20 пациентов (12 мужчин и 8 женщин) с диагнозом псориаза тяжелой или средней степени тяжести. Возраст пациентов варьировал от 19 до 56 лет. Оценка степени тяжести кожного процесса проводилась на основании определения индекса распространенности и тяжести псориаза PASI.

Инфликсимаб назначали согласно инструкции по медицинскому применению препарата: внутривенно капельно в течение не менее 2 ч. со скоростью не более 2 мл/мин. с использованием инфузионной системы со встроенным стерильным апиrogenным фильтром. Доза определялась в зависимости от массы тела пациента из расчета 5 мг на 1 кг массы тела. Пациентам было проведено по 4 инфузии инфликсимаба в течение 14 нед.

Эффективность терапии инфликсимабом (Δ PASI) оценивали на основании динамики индекса PASI до и после лечения, которую вычисляли по формуле:

$$\Delta \text{PASI} = \frac{[\text{PASI}_{\text{ДО ЛЕЧЕНИЯ}} - \text{PASI}_{\text{ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ}}]}{\text{PASI}_{\text{ДО ЛЕЧЕНИЯ}}} \times 100\%.$$

При значениях Δ PASI $\geq 75\%$ у больных констатировали выраженный терапевтический эффект, при значениях Δ PASI $< 75\%$ терапевтический эффект рассматривали как недостаточный или частичный.

Объектом исследования служили биоптаты кожи пациентов.

Биопсию кожи из очага поражения проводили до начала лечения инфликсимабом. Биологический материал хранили при температуре -70 – -80 °C.

Протеомный профиль биоптатов кожи определяли с помощью жидкостной хроматографии с последующей идентификацией белков с применением tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS).

Подбор оптимальной методики проведения исследования был разработан ранее [26]. Биоптаты кожи обрабатывали гипотоническим раствором (5 мМ трисHCl pH 7,4), который добавляли в количестве, превышающем в 10 раз массу образцов. Затем образцы инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре и производили отделение раствора. Из биоптата белки экстрагировали смесью хлороформа и метанола, восстанавливали 0,02 М дитиотриетолом в 6 М гуанидинхлориде pH 6,8 (1 ч., 37 °C), далее проводили карбоксиметилирование SH-групп 0,17 М йодацетамидом (1 ч., 37 °C). Снова экстрагировали смесью хлороформа и метанола, белковый осадок растворяли в 50 мМ гидрокарбонате аммония и помещали на 15 мин. в ультразвуковую баню при 4 °C. Потом проводили трипсинолиз (1 мкг трипсина на 100 мкг белка, 37 °C в течение 1 ч.; затем 2 мкг на 100 мкг белка, 37 °C в течение 12 ч.). Для остановки трипсинолиза добавляли муравьиную кислоту до концентрации 0,1%. Пробы упаривали на вакуумном концентраторе и растворяли в 0,1% муравьиной кислоте для нанесения на хроматографическую колонку.

Полученную смесь 2 мкл анализировали жидкостной хроматографией, совмещенной с ионной ловушкой, с использованием Agilent 1100 нанопроточной HPLC-Chip Cube системы, совмещенной с ловушкой Agilent 1100 XCT Ultra Series MSD Trap (Agilent). Каж-

дый образец наносили на хроматографическую колонку в трех повторениях и проводили tandemную масс-спектрометрию с идентификацией белков.

Обработку масс-спектрометрических данных осуществляли с использованием программы SpectrumMill. Достоверно идентифицированными считали только те белки, которые определялись в трех повторных экспериментах.

Для установления связи протеомного состава кожи с результатами терапии больных проводили корреляционный анализ посредством вычисления гамма-коэффициента. Для расчета корреляции прибегали к биаризации индекса PASI.

Значения Δ PASI $\geq 75\%$ (выраженный клинический ответ на лечение инфликсимабом) принимали за 0, тогда как значение Δ PASI $< 75\%$ — за 1.

Результаты исследования

В результате масс-спектрометрического исследования биоптатов кожи больных псориазом было идентифицировано 369 белков. Наибольшее число из них было представлено структурными белками кожи (коллагенами и кератинами) и мажорными белками крови (альбумин, гемоглобин). Однако чувствительность метода позволила выявить также белки, присутствовавшие в небольших количествах, например различные ферменты, транскрипционные факторы и рецепторы.

При статистической обработке данных была выявлена корреляция экспрессии 9 белков с ответом на терапию инфликсимабом (см. таблицу, рисунок). Гамма-коэффициент достигал значения 0,47, что соответствовало корреляционной связи средней силы. Указанный коэффициент принимал ограниченное число дискретных значений в связи с относительно малым объемом выборки пациентов. Положительные значения гамма-коэффициента характеризовали корреляцию недостаточного или частичного терапевтического ответа на введение препарата (гамма-коэффициент 0,47) у следующих белков: кератин II типа цитоскелетный 5, кератин II типа цитоскелетный 80, гистон H1.3, аполипопротеин A-I, пироксиредоксин-2, АТФ-зависимая ДНК-хеликаза 2 (субъединица 1) и один неохарактеризованный белок S170f68. Выраженный терапевтический эффект инфликсимаба коррелирует с наличием в протеоме кожи белков S100-A8 и глутатион-S-трансферазы P (гамма-коэффициент $-0,47$).

Обсуждение

При изучении протеома кожи больных псориазом было идентифицировано 369 белков. Установлена ассоциация 7 из этих белков с ослабленным ответом на лечение препаратом инфликсимаб и корреляция экспрессии 2 белков с выраженным клиническим эффектом от лечения.

По полученным данным, наличие в протеоме кожи белка S100A8 коррелировало со значительным улуч-

ТАБЛИЦА

Список белков протеома кожи, характеризующихся корреляцией средней степени с ответом на инфликсимаб

№ п/п	Инвентарный номер UniProt	Белок	Гамма-коэффициент корреляции
1	P05109	Белок S100-A8	-0,47
2	P09211	Глутатион-S-трансфераза P	-0,47
3	P13647	Кератин II типа цитоскелетный 5	0,47
4	Q6KB66	Кератин II типа цитоскелетный 80	0,47
5	P16402	Гистон H1.3	0,47
6	P02647	Аполипопротеин A-I	0,47
7	P32119	Пероксиредоксин-2	0,47
8	P12956	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза 2, субъединица 1	0,47
9	Q2NJK3	Неохарактеризованный белок C17orf68	0,47

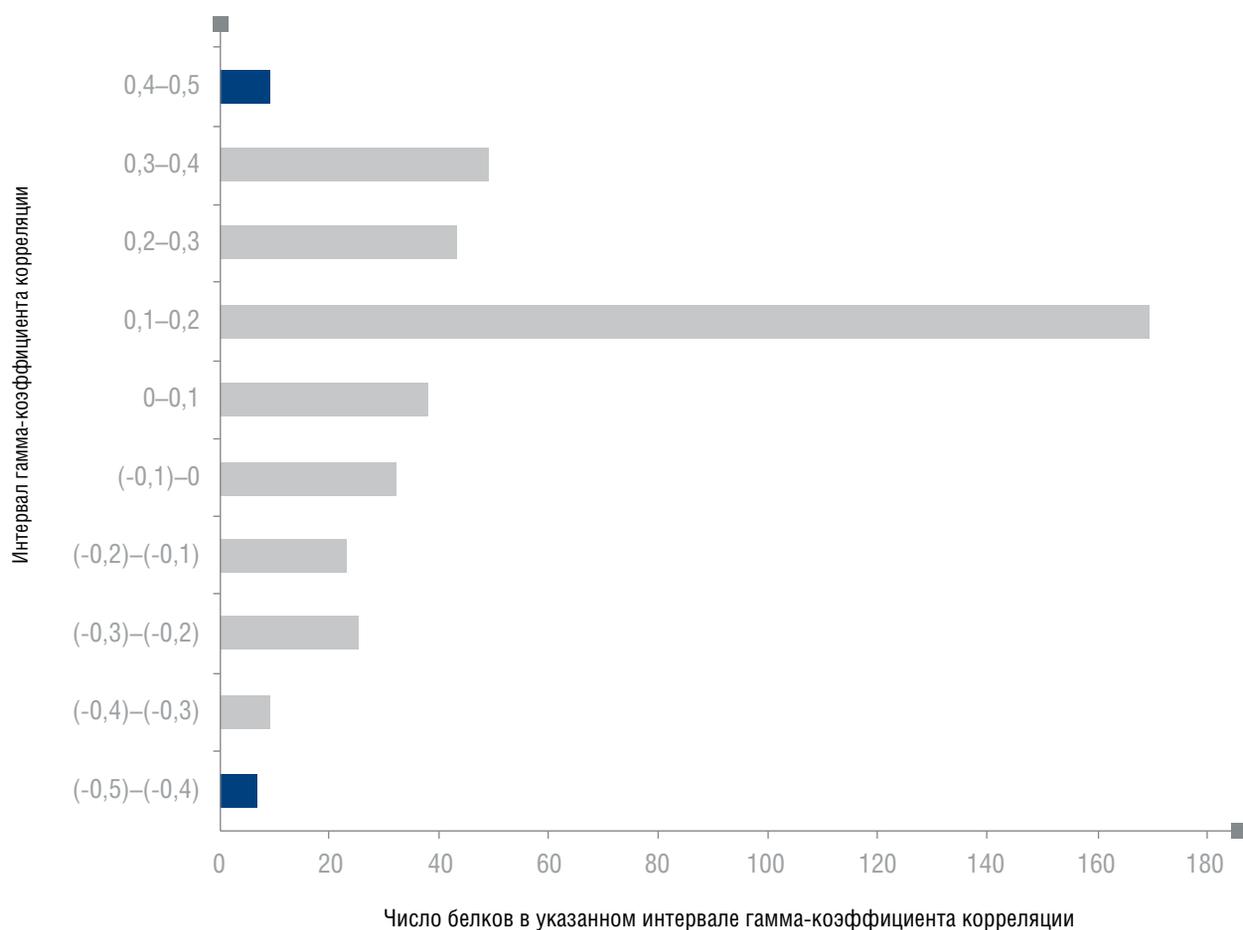


Рисунок. Распределение идентифицированных белков по интервалам значения гамма-коэффициента корреляции

шением состояния пациентов (Δ PASI \geq 75%) после лечения препаратом инфликсимаб. Белок S100A8, известный также как кальгранулин А, является внутриклеточным кальцийсвязывающим белком, который продуцируется миелоидными клетками. В его функции входит привлечение иммунных клеток в очаг воспаления [27]. Этот белок рассматривается как маркер воспаления при ряде заболеваний [28]. Участие S100A8 в молекулярных механизмах развития псориаза подтверждается тем, что кодирующий данный белок ген расположен в сопряженном с псориазом участке PSORS4 [27]. Предполагаемый механизм индукции воспаления заключается в активации экспрессии интегринов (например, CD11b/CD18) белками S100A8/S100A9, а также в привлечении клеток в очаг воспаления путем активации экспрессии IL-8 и ICAM-1 (молекула клеточной адгезии) [27]. В ряде исследований показано увеличение экспрессии белков S100A8/S100A9 в эпидермисе при заболеваниях кожи, сопряженных с гиперпролиферацией эпидермиса, в число которых входит псориаз [29, 30]. Кроме того, показано повышение уровня этих белков в сыворотке крови больных псориазом [31], в том числе методами масс-спектрометрии [18]. Другой белок, наличие которого коррелировало с выраженной положительной динамикой заболевания, глутатион-S-трансфераза Р, относится к семейству метаболических ферментов клетки, участвующих в антиоксидантных процессах и детоксикации ксенобиотиков [32]. Мутации гена глутатион-S-трансферазы класса Р сопряжены с онкогенезом и формированием резистентности к химиотерапии [33]. Имеются данные об участии этой группы ферментов в воспалительных реакциях [34, 35], а также показано присутствие глутатион-S-трансферазы Р в кератиноцитах при псориазе [36].

Среди белков, сопряженных с ослабленным ответом на терапию инфликсимабом, были представлены кератины (кератин II типа цитоскелетный 5, кератин II типа цитоскелетный 80). Роль различных типов кератинов в патогенезе псориаза остается не до конца

изученной. Выявлено также, что с ослабленным терапевтическим ответом на инфликсимаб была связана экспрессия гистона H1.3, ядерного белка, формирующего нуклеосомы, и ДНК-хеликазы-2. Возможно, эти белки участвуют в формировании псориазического процесса, участвуя в альтернативных TNF- α процессах воспаления. Большие надежды в настоящее время возлагаются на препараты — ингибиторы гистоновых ацетилаз, потенциально эффективных при онкологических и аутоиммунных воспалительных заболеваниях, в том числе при псориазе [37].

Белок кератиноцитов пероксиредоксин-2 может являться потенциальным аутоантигеном и мишенью для Т-лимфоцитов при псориазе в результате формирования аутоиммунного ответа после перенесенной стрептококковой инфекции [38].

Аполипопротеин А-1 входит в состав липопротеидов высокой плотности, участвуя в метаболизме холестерина, и является маркером сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе у предрасположенных к ним пациентов с псориазом. В некоторых исследованиях показано участие холестерина в поддержании или формировании воспаления в коже, тогда как аполипопротеин-А косвенно играет противовоспалительную роль [39]. Остается неясной корреляция экспрессии этих белков с выраженностью ответа на терапию инфликсимабом, что требует дальнейших исследований.

Таким образом, впервые проведено исследование протеомного профиля кожи больных псориазом с целью обнаружения белков — маркеров эффективности терапии препаратом инфликсимаб. Данные, полученные в исследовании, открывают новые возможности в персонализированном подходе к выбору адекватных методов терапии больных псориазом.

Выражаю глубокую признательность за помощь в проведении исследований С.А. Мошковскому, кандидату биологических наук, заведующему отделом протеомных исследований ГУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН». ■

Литература

1. Griffiths C.E., Barker J.N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370: 263—271.
2. de Korte J., Sprangers M.A., Mombers F.M. et al. Quality of life in patients with psoriasis: a systematic literature review. *J invest Derm Symp Proc* 2004; 9: 140—147.
3. Rapp S.R., Feldman S.R., Exum M.L. et al. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Amer acad Derm* 1999; 41: 401—407.
4. Mrowietz U., Reich K. Psoriasis — new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 11—18, quiz 19.
5. Gaspari A.A. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Amer acad Derm* 2006; 54: S67—80.
6. Tschachler E. Psoriasis: the epidermal component. *Clin Derm* 2007; 25: 589—595.
7. Dika E., Bardazzi F., Balestri R., Maibach H.I. Environmental factors and psoriasis. *Curr Probl Dermatol* 2007; 35: 118—135.
8. Говорун В.М., Арчаков А.И. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке. *Биохимия* 2002; 67: 1341—1359.
9. Omenn G.S. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. *Proteomics* 2006; 6: 5662—5673.
10. Huang C.M., Elmets C.A., van Kampen K.R. et al. Prospective highlights of functional skin proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 647—660.

11. Unlu M., Morgan M.E., Minden J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 18: 2071—2077.
12. Zhou G., Li H., DeCamp D. et al. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Molec Cell Proteomics* 2002; 1: 117—124.
13. Lottspeich F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; 38: 2476—2492.
14. Poon T.C. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Exp Rev Proteomics* 2007; 4: 51—65.
15. Bonnekoh B., Bockelmann R., Pommer A.J. et al. The CD11a binding site of efalizumab in psoriatic skin tissue as analyzed by Multi-Epitope Ligand Cartography robot technology. Introduction of a novel biological drug-binding biochip assay. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 96—111.
16. Cowen E.W., Liu C.W., Steinberg S.M. et al. Differentiation of tumour-stage mycosis fungoides, psoriasis vulgaris and normal controls in a pilot study using serum proteomic analysis. *Brit J Derm* 2007; 157: 946—953.
17. Macdonald N., Cumberbatch M., Singh M. et al. Proteomic analysis of suction blister fluid isolated from human skin. *Clin exp Dermatol* 2006; 31: 445—448.
18. Plavina T., Hincapie M., Wakshull E. et al. Increased plasma concentrations of cytoskeletal and Ca²⁺-binding proteins and their peptides in psoriasis patients. *Clin Chem* 2008; 54: 1805—1814.
19. Celis J.E., Cruger D., Kiil J. et al. Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin. *FEBS Lett* 1990; 262: 159—164.
20. Celis J.E., Rasmussen H.H., Olsen E. et al. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database: update 1993. *Electrophoresis* 1993; 14: 1091—1198.
21. Madsen P., Rasmussen H.H., Leffers H. et al. 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 Derm* 1992; 99: 299—305.
22. Carlen L.M., Sanchez F., Bergman A.C. et al. Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *J invest Derm* 2005; 124: 63—69.
23. Takeda A., Higuchi D., Takahashi T. et al. Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin. *J invest Derm* 2002; 118: 147—154.
24. Брускин С.А., Абдеев Р.М., Мошковский С.А. и др. Протеомные исследования псориаза как подход к идентификации потенциальных мишеней фармакотерапии. *Клин. дерматол. и венерол.* 2009; 1: 28—31.
25. Bonnekoh B., Pommer A.J., Bockelmann R. et al. Topo-proteomic in situ analysis of psoriatic plaque under efalizumab treatment. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 237—252.
26. Zgoda V.G., Moshkovskii S.A., Ponomarenko E.A. et al. Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS. *Proteomics* 2009; 9: 4102—4105.
27. Foell D., Wittkowski H., Vogl T. et al. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 28—37.
28. Pouliot P., Plante I., Raquil M.A. et al. Myeloid-related proteins rapidly modulate macrophage nitric oxide production during innate immune response. *J Immunol* 2008; 181: 3595—3601.
29. Nukui T., Ehama R., Sakaguchi M. et al. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2008; 104: 453—464.
30. Park C.C., Kim K.J., Woo S.Y. et al. Comparison of the Expression Profile of JunB, c-Jun, and S100A8 (Calgranulin A) in Psoriasis Vulgaris and Guttate Psoriasis. *Ann Derm* 2009; 21: 35—38.
31. Benoit S., Toksoy A., Ahlmann M. et al. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *Brit J Derm* 2006; 155: 62—66.
32. Eaton D.L., Bammler T.K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 1999; 49: 156—164.
33. Savas B., Arslan G., Gelen T. et al. Multidrug resistant malignant melanoma with intracranial metastasis responding to immunotherapy. *Anticancer Res* 1999; 19: 4413—4420.
34. Luo L., Wang Y., Feng Q. et al. Recombinant protein glutathione S-transferases P1 attenuates inflammation in mice. *Molec Immunol* 2009; 46: 848—857.
35. Zhou J., Wolf C.R., Henderson C.J. et al. Glutathione transferase P1: an endogenous inhibitor of allergic responses in a mouse model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1202—1210.
36. Aceto A., Caccuri A.M., Sacchetta P. et al. Dissociation and unfolding of Pi-class glutathione transferase. Evidence for a monomeric inactive intermediate. *Biochem J* 1992; 285 (Pt 1): 241—245.
37. Shuttleworth S.J., Bailey S.G., Townsend P.A. Histone Deacetylase Inhibitors: New Promise in the Treatment of Immune and Inflammatory Diseases. *Curr Drug Targets* 2010 Nov; 11(11): 1430—8.
38. Besgen P., Trommler P., Vollmer S. Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and heat shock protein 27: potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis. *J Immunol* 2010; 184: 5392—5402.
39. Zabalawi M., Bharadwaj M., Horton H. et al. Inflammation and skin cholesterol in LDLr^{-/-}, apoA-I^{-/-} mice: link between cholesterol homeostasis and self-tolerance? *J Lipid Res* 2007; 48: 52—65.