

КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДЕРМАТОЗОВ

© АКСЕНЕНКО М.Б., РУКША Т.Г., 2016
УДК 616.5:575.113.08

Аксененко М.Б., Рукша Т.Г.

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ
В ДЕРМАТОЛОГИИ**

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск, Россия

Обзор литературы посвящен применению методов секвенирования (метода исследования генома) при различных дерматологических заболеваниях. В статье описаны технологии, позволяющие установить нуклеотидную последовательность ДНК. Рассмотрен способ автоматизированного секвенирования по Сенгеру, а также секвенирование нового поколения (Next-Generation Sequencing). Приведены примеры генов и мутаций, которые были обнаружены при помощи секвенирования. В частности, описано клиническое значение мутаций в генах BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11, каждая из которых играет решающую роль в патогенезе отдельных клинико-морфологических форм меланомы кожи. Показано, что выявление подтипов опухоли обеспечивает селективный подход в терапии меланомы кожи, что, в свою очередь, может быть применено при различных принципах лечения и дает возможность для прогнозирования развития химиорезистентности. Кроме того, представлены данные о других генах, играющих роль в патогенезе отдельных дерматологических заболеваний как опухолевого, так и неопухолевого генеза.

Ключевые слова: секвенирование по Сенгеру; секвенирование нового поколения – next-generation sequencing; мутация.

Для цитирования: Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Применение методов секвенирования в дерматологии. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2016; 19(1): 7-12. DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-7-12

Aksenenko M.B., Ruksha T.G.

SEQUENCING METHODS IN DERMATOLOGY

Krasnoyarsk State Medical University, 660022, Krasnoyarsk, Russia

Review of the literature devoted to the application of sequencing methods (genome research method) at various dermatological diseases. DNA sequencing technology is described in the article. Sanger Sequencing Method and Next-Generation Sequencing are discussed. Examples of genes and mutations found by sequencing methods are presented. Clinical meaning of mutations in BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 genes that play an important role in the pathogenesis of different clinical pathological forms of melanoma is described. Revealing tumor subtypes provides a selective approach in treatment of cutaneous melanoma, that can be useful in different therapeutic methods and makes it possible to predict the development of chemoresistance. Furthermore, data about another genes, that play an important role in pathogenesis of different dermatological diseases with tumor and non-tumor genesis are presented.

Key words: Sanger Sequencing; Next-Generation Sequencing; mutation.

For citation: Aksenenko M.B., Ruksha T.G. Sequencing methods in dermatology. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venereicheskikh Boleznei).* 2016; 19(1): 7-12. (in Russian). DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-7-12

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 22 December 2015

Accepted 20 January 2016

Метод полногеномного секвенирования открыл большие возможности для ученых, занимающихся фундаментальными аспектами медицины. Полногеномное секвенирование (whole genome sequencing) позволяет получать информацию о всей ДНК, находящейся в клетках человека [1]. Первым из предложенных методов секвенирования стал способ автоматизированного секвенирования по Сенгеру [2], применявшийся на протяжении нескольких десятков лет и с помощью которого был реализован проект геном человека [3].

Но данный подход в секвенировании имел ряд недостатков, поскольку был непригоден для быстрого рутинного исследования геномов человека в клинической практике. Сегодня для реализации задач полногеномного секвенирования предложены «методы нового поколения» секвенирования (Next-Generation Sequencing, NGS), в основу которых положены разнообразные подходы с применением специальных комбинаций приготовления ДНК-матриц, секвенирования, визуализации и, в конеч-

Для корреспонденции:

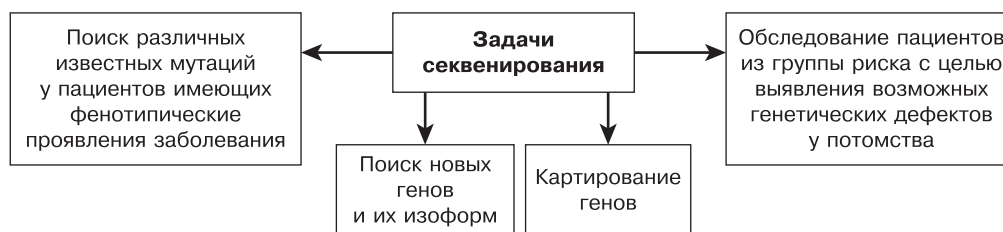
Аксененко Мария Борисовна, кандидат мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск, Россия. E-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

For correspondence:

Aksenenko Maria B., Candidate of Medical Sciences, Docent, Department of Pathophysiology with a Course of a Clinical Pathophysiology, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation. E-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

Information about authors:

Aksenenko M.B., <http://orcid.org/0000-0001-7660-700X>. Ruksha T.G., <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>.



Основные задачи методики секвенирования генов.

ном итоге, составления непосредственно последовательностей ДНК «сиквенсов» [4].

Применение данного метода достаточно многогранно и может быть использовано для решения следующих задач (см. рисунок):

– Поиск мутаций, ассоциированных с различными заболеваниями, а также генов, ассоциированных с различными фенотипическими признаками. Например, определение типа заболевания у больного буллезным эпидермолизом.

– Проведение обследования пациентов из группы риска с целью выявления возможных генетических дефектов у потомства, а также пренатальная диагностика плода, когда секвенированию подвергается ДНК будущего ребенка. Данный метод актуален в семьях, имеющих детей с разными генодерматозами.

– Картирование генов, представляющее собой поиск места расположения в геноме гена либо генетического маркера, а также определение расстояния между ними [5]. Так, ученым удалось определить с помощью картирования гена *LIPH* в локусе 3q27 генетически обусловленную природу гипотрихоза 1-го типа [6].

– Поиск новых генов и их изоформ [7].

Применение NGS-секвенирования в дерматоонкологии

Использование методов автоматизированного секвенирования по Сенгеру и секвенирования нового поколения (NGS) нашло широкое применение в онкологии, в частности в дерматоонкологии, для определения спектра мутаций у больных меланомой кожи.

Проведение анализа генома из образцов *меланомы* является довольно трудной задачей, что связано с большим количеством мутаций – «пассажилов», которые возникают под влиянием мутагенного воздействия ультрафиолетового облучения (УФО), нестабильности генома или просто большого количества делений клеток. Данные мутации являются отражением мутационного фенотипа опухоли, но могут не иметь важного значения в патогенезе новообразования [8]. Известно, что меланома является опухолью с одним из наиболее высоких уровней мутаций, преобладающее число которых обусловлено эффектами УФО в коже, например, транзиции цитозина на тимин (C>T) [9]. Секвенирование нового поколения является важным инструментом для изучения геномики меланомы и выявления прогностических биомаркеров, в том числе с использованием формалинфиксированной первичной опухоли, заключенной в парафин.

Драйверные мутации присутствуют в опухолевых клетках организма и отсутствуют в других (неопухолевых) клетках. Данный вид мутаций является триггером (т.е. главным пусковым фактором) в опухолевой трансформации нормальных клеток и образовании первичного опухолевого клона. Драйверные мутации создают генетическую нестабильность и приводят к появлению вторичных мутаций, под влиянием которых могут появляться уже новые субклоны опухолевых клеток, которые будут устойчивы к химиотерапии. Таким образом, драйверная мутация создает идеальную мишень для таргет-

ных («целевых») препаратов, поскольку установлено, что жизнеспособность опухолевой клетки зависит от наличия драйверных мутаций, которые «блокируют» другие механизмы биологической регуляции в клетках.

При меланоме обнаруживают пять драйверных мутаций. Мутации в гене *BRAF* затрагивают, как правило, 15-й экзон, при этом 80% всех мутаций в данном гене приходится на 600-й кодон. В 90% случаев здесь происходит замена глутаминовой кислоты на валин BRAFV600E: нуклеотид в 1799-м положении заменяется с тимина на аденин (GTG>GAG) [10]. Второй по частоте является мутация BRAFV600K, представляющая собой замену лизина на валин (GTG>AAG) и встречающаяся в 5–6% случаев. Более редкими разновидностями мутаций в данном гене является BRAFV600R (GTG>AGG), где происходит замена глутаминовой кислоты на лизин, и BRAFV600D (GTG>GAT) с заменой глутаминовой на аспарагиновую кислоту. В двух последних видах мутаций происходит замена уже не одного, а двух нуклеотидов в кодоне [11].

NRAS кодирует белок семейства RAS, участвуя в передаче пролиферативных сигналов от тирозинкиназных рецепторов ядру. NRAS имеет «встроенную» ГТФ-активность (проявляющую гидролитическую активность в отношении гуанозинтрифосфата), которая осуществляет негативную ауторегуляцию гена. В случае образования комплекса с ГТФ NRAS способен передавать сигналы следующему участнику каскада – белку BRAF [12]. Мутации в гене *NRAS* наиболее часто встречаются в кодонах 12, 13 и 61 [13].

Онкоген *KIT* – мембранный тирозинкиназный рецептор, принимающий участие в дифференцировке клеток меланоцитарного ряда [14]. Ген *c-KIT* играет важную роль в патогенезе меланом участка кожи, подверженных хронической инсоляции, акральной меланомы, а также меланомы слизистых оболочек. Наиболее распространенными мутациями в данном гене являются мутации KITL576P в 11-м экзоне, а также мутация KITK642E в 13-м экзоне. Кроме того, у отдельных пациентов описаны случаи возникновения мутаций в данном гене в других участках генома [15] (табл. 1).

Мутация в гене *GNAQ* определяется в 5-м экзоне и встречается у 2% больных меланомой [16]. При этом меланомы, не содержащие ни одной из перечисленных мутаций, принято считать паннегативными [17]. Благодаря NGS-секвенированию было обнаружено, что и в паннегативных меланомах обнаруживаются редкие мутации, в том числе мутации в гене *GNAO1* [16]. Также было выявлено 12 генов, мутации в которых выявляются в паннегативных меланомах: *ALK*, *STK31*, *DGKI*, *RAC1*, *EPHA4*, *ADAMTS18*, *EPHA7*, *ERBB4*, *TAFIL*, *NF1*, *SYK*, *KDR*, включая 5 генов *RAC1*, *ADAMTS18*, *EPHA7*, *TAFIL* [17].

Открытие драйверных мутаций при меланоме кожи привело к активизации во всем мире попыток целенаправленного воздействия на данную мутацию. Наиболее распространенной мутацией у больных меланомой была мутация *BRAF*, она и стала первой мишенью для воздействия [18]. Первым неселективным ингибитором *BRAF* был сорафениб, изначально он был разработан как C-RAF-

Таблица 1

Основные мутантные гены характерные для меланомы кожи [15]

Ген	Сигнальный путь	Вид абберации	В каких типах опухолей обнаруживаются	Число больных	Наличие таргетной терапии
BRAF	MAPK	Точечные мутации/слияние генов (Gene fusion)	NRAS-негативные опухоли	У 50–60%	BRAF-ингибиторы + MEK-ингибиторы; BRAF-ингибиторы + EGFR-ингибиторы+ АКТ-ингибиторы
NRAS	MAPK, PI3K, RALGDS	Точечные мутации, амплификации	BRAF-негативные опухоли	У 20–25%	MEK-ингибиторы + CDK-ингибиторы
KIT	MAPK, PI3K	Точечные мутации, амплификации	BRAF- и NRAS-негативные опухоли	1% от всех меланом; 10% меланомы слизистых оболочек; 10% меланомы акральной локализации	Сунитиниб, нилотиниб, иматиниб
GNAQ/GNA11	Ген <i>GNAQ</i> и его гомолог <i>GNA11</i> кодируют α -субъединицу гетеротримерного G-белка с активностью ГТФазы, активируют MAPK-митогенный путь	Точечные мутации	BRAF и NRAS-негативные меланомы	1% от всех меланом и 40–50% из увеальных меланом	MEK-ингибиторы + PI3K-ингибиторы, энзастаурин

Примечание. Gene fusion – процесс слияния двух смежных генов в один при транскрипции, через делецию или мутацию трансляционного стоп-кодона, при котором используется сигнал терминации транскрипции в расположенном гене; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецепторы эпидермального фактора роста; АКТ (AC-alpha serine/threonine-protein kinase) (серинтреониновой протеинкиназы), имеются данные литературы о том, что данный путь активируется по мере увеличения стадии заболевания. Таблица частично заимствована [15].

ингибитор. Сорафениб модулирует активность фактора роста сосудистого эндотелия и рецептора тромбоцитарного фактора роста. Результаты его применения были не очень успешными как в составе моно-, так и полихимиотерапии [19]. Потребовалось несколько лет, чтобы разработать селективный BRAF-ингибитор. Одним из первых селективных BRAF-ингибиторов являлся PLX4032/RG7204. Препарат показывал хорошие клинические результаты с регрессией опухоли у больных меланомой кожи [20]. Главной же проблемой BRAF-ингибиторов стало развитие резистентности к ним, в основе которой лежит реактивация сигнального каскада RAF-MEK и активация других механизмов передачи сигнала, которые, в свою очередь, также могут приводить к нерегулируемому увеличению пролиферации меланоцитов [21]. В последние годы был зарегистрирован новый таргетный препарат дабрафениб для лечения больных меланомой, положительной по

BRAFV600E [22]. В отличие от PLX4032/RG7204 (вемурафениба), дабрафениб действует не только при мутации V600E, но и при мутации V600K в гене *BRAF*.

Таким образом, при помощи секвенирования был изучен мутационный состав меланомы кожи и выделены основные мутации, которые встречаются при меланоме наиболее часто (табл. 2). Были сформулированы основные клинические характеристики данной группы больных.

1) Мутации в гене *BRAF* встречаются со следующей частотой в различных клинических группах: у 59% больных меланомы располагается на участках кожи не подвергающихся хронической инсоляции; у 11% – на коже, подверженной постоянной инсоляции; у 11% – на слизистых оболочках; 23% таких больных имеют меланому акральной локализации [23].

2) *NRAS*-мутации встречаются примерно в 20% случаев меланомы кожи с локализацией опухоли на участ-

Таблица 2

Формы буллезных дерматозов в зависимости от генетического статуса и типа наследования заболевания

Тип эпидермолиза	Основной подтип	Тип наследования	Гены, в которых произошла мутация
Простой буллезный эпидермолиз	Супрабазальный	Аутосомно-доминантный, возможен аутосомно-рецессивный	<i>PKP11</i> (плакофиллин 1) <i>DSP</i> (десмоплакин)
	Базальный		<i>KRT5</i> (кератин 5) <i>KRT14</i> (кератин 14) <i>PLEC1</i> (плектин) <i>ITGA6</i> , <i>ITGB4</i>
Дистрофический буллезный эпидермолиз	–	Аутосомно-доминантный Аутосомно-рецессивный	<i>COL7A1</i> <i>COL7A1</i>
Пограничный буллезный эпидермолиз	Тип Херлитц Другие типы	Аутосомно-рецессивный	<i>LAMA3</i> , <i>LAMAB3</i> , <i>LAMC2</i> (ламинин 332) <i>LAMA3</i> , <i>LAMAB3</i> , <i>LAMC2</i> (ламинин 332) <i>COL17A1</i> (коллаген 17-го типа) <i>ITGA6</i> , <i>ITGB4</i>
Синдром Киндлера	–	Аутосомно-рецессивный	<i>KIND 1</i> (Киндлин 1)

ках кожи, подверженных регулярной инсоляции; у 10% больных – с меланомой акральной локализации, у 5–13% – с меланомой слизистых оболочек. Причем у больных меланомой слизистых оболочек наиболее часто данная мутация встречается в меланомах синоназальной локализации [24].

3) **c-KIT-мутация.** Активация гена *c-KIT* за счет мутации наблюдается только в 2–6% случаев поверхностной меланомы кожи, но мутации и амплификацию *c-KIT* выявляют с частотой 23–36% при акральной меланоме, 15–39% – при меланоме слизистых оболочек, 28% – при меланоме открытых участков тела (связана с инсоляцией) [25]. Мутации в гене *c-KIT* при меланоме слизистых оболочек чаще встречаются при локализации в области гени-талей и аноректальной области [26].

4) **GNAQ/GNA11-мутация** в 5-м экзоне данного гена встречается примерно у 2% больных меланомой кожи. Наиболее часто встречающаяся замена происходит в 209-й позиции и связана она с заменой глутаминовой кислоты на лейцин (CAA>CTA). Кроме того, описаны случаи возникновения меланомы из голубого невуса [15]. У таких пациентов наблюдается мутация, связанная с заменой аденина на тимин в 626-м кодоне. Учитывая данный факт, предполагают, что данный вид мутации ассоциирован с малигнизацией голубого невуса в меланому.

Необходимо отметить, что мутации в генах *BRAF* и *NRAS* встречаются также и при **доброкачественных меланоцитарных новообразованиях кожи**. Они определяются в диспластических невусах, врожденных невусах, а также в невусах, обладающих высокой юнкциональной активностью. Так, самым распространенным видом мутаций в невусах является мутация в гене *BRAFV600E*, встречающаяся в 82% от всех приобретенных в течение жизни невусов. Мутации в генах как *BRAF*, так и *NRAS* обнаруживают почти в 95% врожденных невусов [27]. При этом врожденные невусы имеют повышенный риск озлокачествления в меланому [28]. Высокая распространенность *BRAF*-мутации наблюдается и при диспластическом невусе, который расценивают как меланомоопасный невус, он требует тщательного динамического контроля врача-дерматовенеролога. При этом данный вид невусов может сохраняться у пациентов годами, поэтому переход данного вида невуса в злокачественную меланому, скорее всего, возможен только при наличии дополнительных генетических нарушений.

Большой процент мутаций *BRAF* и *NRAS* в невусах доказывает то, что активация MAPK-киназного сигнального каскада путем возникновения мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* не является достаточной для злокачественной трансформации. *BRAF*-мутации способствуют злокачественной гиперплазии меланоцитов, но без дополнительных мутаций не способны инициировать процесс канцерогенеза. В частности, усиленная экспрессия онкогенов *BRAF* и *NRAS* в нормальных меланоцитах невуса запускает в них процессы апоптоза, тем самым подвывая клетки запрограммированной клеточной гибели, и параллельно с этим ограничивает процессы пролиферации в них.

Говоря о дополнительных генетических трансформациях, необходимо сказать об усилении активации протеинкиназы АКТ, что рассматривают как один из дополнительных факторов, способствующих малигнизации доброкачественного невуса. Это связано с тем, что активация данной протеинкиназы способна ингибировать апоптоз как в нормальных меланоцитах, так и в неизмененных фибробластах, имеющих мутацию *BRAFV600E*. Усиление активности АКТ наблюдается в 17% доброкачественных невусов, в 43% диспластических невусов, в 49% случаев первичной меланомы, в 77% – метастатической меланомы [17].

Таким образом, выявление мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* при врожденных и диспластических невусах, а также невусах, проявляющих интенсивную пролиферативную активность за короткий промежуток времени, может быть прогностически значимым, требующим дальнейшего анализа.

В связи с постоянно совершенствующимися знаниями молекулярно-генетической структуры меланомы с помощью NGS-секвенирования усложняются и мультигенетические панели для градации спектра мутаций.

Следует также упомянуть о роли секвенирования при опухолях кожи немеланоцитарного генеза. **Базально-клеточный рак кожи** развивается преимущественно на открытых участках тела, поэтому частой его локализацией является кожа лица (щеки, уши, нос, веки) и шеи. Фактор инсоляции является особенно важным, что подтверждается рядом исследований, в частности у жителей США с более частым выявлением базально-клеточного рака кожи на левой половине лица, в отличие от жителей Великобритании, у которых страдает больше правая половина лица и шеи, что связывают с неравномерной инсоляцией и открыванием окна при вождении автомобиля [29]. Локализацию плоскоклеточного рака кожи также чаще определяют на участках кожи, хронически подвергающихся инсоляции. Риск развития плоскоклеточного рака кожи имеет отчетливую связь с растущими суммарными дозами солнечной экспозиции, независимо от ее типа. Доказано, что под влиянием инсоляции происходит формирование фотодимеров, представляющих собой обрыв цепи ДНК. Помимо этого, под воздействием УФО образуются мутации в гене *p53*. Мутации в данном гене происходят примерно в 50% случаев при плоскоклеточном раке кожи, при актиническом кератозе, который рассматривают в качестве предрака, а также при базально-клеточном раке кожи [30]. Ген *p53* выполняет роль онкосупрессора, представляя собой функцию «сторожа» генетического аппарата клетки, определяя повреждения в клетках, а впоследствии способствует удалению поврежденных клеток, запуская процессы апоптоза. Измененный ген *p53* не способен справляться с данными функциями, из-за чего в клетке происходит дисбаланс между процессами пролиферации и апоптоза и развивается опухоль. Немаловажным является иммунологический аспект в формировании **плоскоклеточного рака кожи**. Так, пациенты, находящиеся на длительной иммуносупрессивной терапии, больше подвержены данному виду рака, что связано со снижением эффективности работы системы иммунобиологического надзора. Кроме того, плоскоклеточный рак кожи ассоциирован с HPV-инфекцией кератиноцитов. Вирус папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35 и 45-го типов вызывает плоскоклеточный рак вульвы, полового члена, заднепроходного отдела и ногтей валиков [31].

Методы секвенирования и заболевания кожи неопухолевого генеза

С помощью NGS были обнаружены различные мутации, играющие важную роль в развитии некоторых **генодерматозов** [32]. В частности, были выявлены мутации в гене *ABCC6* при эластической псевдоксантоме [33], гене стероидной сульфатазы (*STS*) при X-сцепленном ихтиозе, что приводит к нарушению кератинизации и появлению избыточного ороговения кожи [34].

С помощью секвенирования удалось выявить 66 ранее незарегистрированных **штаммов *Propionibacterium acnes***, идентифицировать штаммы максимально вирулентные, а также преимущественно ассоциированные с развитием акне. Также с помощью метода секвенирования были изучены последовательности генома патогенных и

непатогенных вариантов *Propionibacterium acnes*. Выявлено, что один из подтипов содержит нуклеотидную замену G1058C, которая обеспечивает полную резистентность к тетрациклину микроорганизма [35]. Кроме того, были выявлены определенные подтипы *Propionibacterium acnes* (RT4 и RT5), способные вызывать наиболее выраженную иммунологическую реакцию у пациента, что сопряжено с повышенным риском формирования рубцов на коже.

В исследованиях последних лет большую роль уделяют применению метода секвенирования у больных *буллезными дерматозами*. Были выявлены нарушения в гене десмоглеин 3 (*DSG3*) у больных пузырчаткой [36]. *DSG3* вырабатывается при всех видах пузырчатки во всех слоях эпидермиса, что имеет значение для проведения дифференциальной диагностики с другими дерматозами [37]. Проведение секвенирования у больного буллезным эпидермолизом позволяет выявить тип и локализацию мутации, а также тип наследования заболевания (см. **табл. 2**) [38].

Данная диагностика имеет большое значение не только у больных буллезным эпидермолизом, но и позволяет исследовать мутационный профиль пациента при проведении пренатальной и предимплантационной диагностики, при процедуре экстракорпорального оплодотворения в семьях, имеющих детей с буллезным эпидермолизом. Постановка точного генетического диагноза имеет значение для определения последующей терапии заболевания, в частности проведения генной терапии, при которой вводят ген, кодирующий поврежденный белок. Метод осуществляют путем пересадки участка кожи с исправленным геном. При дистрофическом буллезном эпидермолизе применяют терапию рекомбинантным человеческим коллагеном типа IV [39].

Нейрофиброматоз представляет собой еще одну группу наследственных заболеваний, связанных с поражениями кожи, а также изменениями в нервной системе и других органах. С учетом наличия у ряда пациентов минимальной клинической симптоматики, молекулярная диагностика нейрофиброматоза 1-го типа является актуальной, но чрезвычайно сложной задачей. Последнее связано с большими размерами гена *NF1*, в котором происходит мутация при данном заболевании, а также отсутствием мутаций в «горячих точках», отсутствием кластеризации мутаций [40]. Технология NGS в отличие от секвенирования по Сэнгеру позволяет проводить выявление мультиэкзомных делеций и дупликаций. Благодаря методу NGS была выявлена 21 мутация в данном гене [41], что позволяет рассматривать данный способ секвенирования как эффективный метод, позволяющий улучшить генодиагностику данного заболевания.

Применение метода секвенирования имеет свою актуальность в трихологии. С помощью секвенирования были выявлены мутации в гене *HR* (human hairless homolog), отвечающие за возникновение алопеции у больных папулезной атрихией. Особенностью данного вида мутаций является то, что они разрушают «открытые рамки считывания» (upstream open reading frames, uORF) внутри не-транслируемой области (5'-UTR) гена, кодирующего HR-белок, продукт *HR*-гена. Данный генетический дефект приводит к разрушению регуляции системы экспрессии гена и возникновению данной разновидности алопеции, которая проявляется папулезными повреждениями большого процента поверхности кожи тела и практически полным отсутствием волос [42]. Выявление мутации в гене *HR* позволяет классифицировать врожденные формы атрихии с учетом фенотипических и генотипических признаков заболевания.

Методы генетической диагностики являются важными составляющими в постановке дерматологического

диагноза, а также расширяют возможности для персонализированной терапии больных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

2. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. *NGS: высокопроизводительное секвенирование*. М.: БИНОМ; 2014.
12. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология опухолей кожи. *Практическая онкология*. 2012; 13 (2): 61–8.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Griffith M., Miller C.A., Griffith O.L., Krysiak K., Skidmore Z.L., Ramu A., et al. Optimizing cancer genome sequencing and analysis. *Cell Syst*. 2015; 1(3): 210–33.
2. Rebrikov D.V., Korostin D.O., Shubina E.S., Ilinskiy V.V. *High-speed gene sequencing*. Moscow: BINOM; 2014. (in Russian)
3. Wang Y., Navin N.E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol. Cell*. 2015; 58(4):598–609. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.005.
4. Mardis E.R. Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*. 2013; 6: 287–303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
5. Latta R.G., Gardner K.M., Staples D.A. Quantitative trait locus mapping of genes under selection across multiple years and sites in *Avena barbata*: epistasis, pleiotropy, and genotype-by-environment interactions. *Genetics*. 2010; 185(1): 375–385.
6. Jelani M., Wasif N., Ali G., Chishti M., Ahmad W. A novel deletion mutation in LIPH gene causes autosomal recessive hypotrichosis (LAH2). *Clin. Genet*. 2006; 74(2): 184–8. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01011.
7. Yang Y., Xie B., Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014; 12(5):190–7. doi: 10.1016/j.gpb.2014.09.001.
8. Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V., Arold S.T., Imielinski M., Theurillat J.P., et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012; 150(2): 251–63. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.
9. Laine A., Topisirovic I., Zhai D., Reed J.C., Borden K.L., Ronai Z. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol. Cell Biol*. 2006; 26(23): 8901–13.
10. Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892): 949–54.
11. Riveiro-Falkenbach E., Villanueva C.A., Garrido M.C., Ruano Y., Garcia Martin R.M., Godoy E., et al. Intra- and inter-tumoral homogeneity of BRAF (V600E) mutations in melanoma tumors. *J. Invest. Dermatol*. 2015; 135(12): 3078–85. doi: 10.1038/jid.2015.229.
12. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология of skin tumors. (Практическая онкология). 2012; 13(2): 61–8. (in Russian)
13. Jakob J.A., Bassett R.L.Jr., Ng C.S., Curry J.L., Joseph R.W., Alvarado G.C., et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012; 118 (16): 4014–23. doi: 10.1002/cncr.26724.
14. Monsel G., Ortonne N., Bagot M., Bensussan A., Dumaz N. c-Kit mutants require hypoxia-inducible factor 1alpha to transform melanocytes. *Oncogene*. 2010; 29(2): 227–36.
15. Yilmaz I., Gamsizkan M., Kucukodaci Z., Berber U., Demirel D., Haholu A., et al. BRAF, KIT, NRAS, GNAQ and GNA11 mutation analysis in cutaneous melanomas in Turkish population. *Indian J. Pathol. Microbiol*. 2015; 58(3): 279–84.
16. Garcia-Marcos M., Ghosh P., Farquhar M.G. Molecular basis of a novel oncogenic mutation in GNAO1. *Oncogene*. 2011; 30(23): 2691–6.
17. Xia J., Jia P., Hutchinson K.E., Dahlman K.B., Johnson D., Sosman J., et al. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol. Cancer Ther*. 2014; 13(7): 1918–28.
18. Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 2002; 417(6892): 949–54.
19. Hauschild A., Agarwala S.S., Trefzer U., Hogg D., Robert C., Hersey P., et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol*. 2009; 27(17): 2823–30.
20. Grimaldi A.M., Simeone E., Festino L., Vanella V., Palla M., Ascierto P.A. Novel mechanisms and therapeutic approaches in melanoma: targeting the MAPK pathway. *Discov. Med*. 2015; 19(107): 455–61.
21. Sun C., Wang L., Huang S., Heynen G.J., Prahallad A., Robert C., et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014; 508(7494): 118–22.
22. Hauschild A., Grob J.J., Demidov L.V., Jouary T., Gutzmer R., Millward M., et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multi-centre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012; 380(9839): 358–65. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.
23. Colombino M., Capone M., Lissia A., Cossu A., Rubino C., DeGiorgi V., et al.

- BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(20): 2522–9. doi: 10.1200/JCO.2011.41.2452.
24. Zebary A., Jangard M., Omholt K., Ragnarsson-Olding B., Hansson J. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br. J. Cancer.* 2013; 109(3): 559–64. doi: 10.1038/bjc.2013.373.
 25. Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi F.S., Le C., Warrick A., Patterson J., et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(21): 6821–8. doi: 10.1158/1078-0432.
 26. Curtin J.A., Busam K., Pinkel D., Bastian B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(26): 4340–6.
 27. Poynter J.N., Elder J.T., Fullen D.R., Nair R.P., Soengas M.S., Johnson T.M., et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.* 2006; 16(4): 267–73.
 28. Krishnamurthy S., Gu K., Ali S.M., Parvatappa N.J. Interdiscipl Histopathol. 2014; 2(2): 108–11. doi:10.5455/jihp.20140225013612.
 29. Paulson K.G., Iyer J.G., Nghiem P. Asymmetric lateral distribution of melanoma and Merkel cell carcinoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011; 65(1): 35–9. doi: 10.1016/j.jaad.2010.05.026.
 30. Giglia-Mari G., Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum. Mutat.* 2003; 21(3): 217–28.
 31. Yan W., Wistuba I.I., Emmert-Buck M.R., Erickson H.S. Squamous cell carcinoma – similarities and differences among anatomical sites. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1(3): 275–300.
 32. Griewank K.G., Schadendorf D. Panel sequencing melanomas. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135(2): 335–36. doi: 10.1038/jid.2014.420.
 33. South A.P., Li Q., Uitto J. Next generation sequencing for mutation detection in heritable skin diseases: the paradigm of pseudoanthoma elasticum. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135(4): 937–40. doi: 10.1038/jid.2014.521.
 34. Scott C.A., Plagnol V., Nitoiu D., Bland P.J., Blyden D.C., Chronnell C.M., et al. Targeted sequence capture and high throughput sequencing in the molecular diagnosis of ichthyosis and other skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133(2): 573–6. doi: 10.1038/jid.2012.332.
 35. Fitz-Gibbon S., Tomida S., Chiu B.H., Nguyen L., Du C., Liu M., et al. Propionibacterium acnes strain population in the human skin microbiome associated with acne. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133(9): 2152–60. doi: 10.1038/jid.2013.21.
 36. Capon F., Boulding H., Quaranta M., Mortimer N.J., Setterfield J.F., Black M.M., et al. Genetic analysis of desmoglein 3 (DSG3) sequence variants in patients with pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 2009; 161(6): 1403–5. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09429.x.
 37. Saleh M.A. Pemphigus in the Arab world. *J. Dermatol.* 2015; 42(1): 27–30.
 38. Nagai M., Nagai H., Tominaga C., Sakaguchi Y., Jitsukawa O., Ohgo N., et al. Localised dominant dystrophic epidermolysis bullosa with a novel de novo mutation in COL7A1 Diagnosed by Next-generation Sequencing. *Acta Dermatol. Venereol.* 2015; 95(5): 629–31.
 39. Abe M. Novel gene therapy for epidermolysis bullosa using recombinant human VII type collagen protein. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 2006; 81(3): 245–52.
 40. Pasmant E., Parfait B., Luscan A., Goussard P., Briand-Suleau A., Laurendeau I., et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? *Eur. J. Hum. Genet.* 2015; 23(5): 596–601.
 41. Balla B., Arvai K., Horváth P., Tobiás B., Takács I., Nagy Z., et al. Fast and robust next-generation sequencing technique using ion torrent personal genome machine for the screening of neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *J. Mol. Neurosci.* 2014; 53(2): 204–10.
 42. Ahmed M.S., Rauf S., Naeem M., Khan M.N., Mir A. Identification of novel mutation in the HR gene responsible for atrichia with papular lesions in a Pakistani family. *J. Dermatol.* 2013; 40(11): 927–8.
 43. Stahl J.M., Cheung M., Sharma A., Trivedi N.R., Shanmugam S., Robertson G.P. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2003; 63(11): 2881–90.

Поступила 22.12.15
Принята к печати 20.01.16

© МАХНЕВА Н.В., 2016

УДК 612.579.017.1.014

Махнева Н.В.

КЛЕТОЧНЫЕ И ГУМОРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КОЖИ

Кафедра дерматовенерологии и дерматоонкологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва, Россия

Наряду со слизистыми оболочками, кожа как основной барьер с внешним миром создает систему защиты от любых воздействий окружающего мира. Она является не только местом реализации иммунологических процессов, но и активно участвует в них благодаря наличию собственных элементов иммунной системы, которые способны активно принимать участие в развитии воспалительных реакций и неопластических процессов. Клетки кожи взаимодействуют между собой и с клетками иммунной системы, либо устанавливая прямой контакт, либо секретируя некоторое число растворимых факторов, называемых цитокинами, и другие белковые компоненты, например, белки системы комплемента. В обзоре представлена общая концепция кожно-ассоциированной лимфоидной ткани и иммунной системы кожи с иммунокомпетентными клетками в эпидермисе и дерме, для кооперации которых на разных стадиях иммунного ответа требуется идентичность в отношении антигенов HLA-системы. Так, специфические иммунологические реакции с антителообразованием способствуют освобождению организма от антигена как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Однако при нарушении какого-либо звена иммунологической защиты происходит замедление процесса элиминации антигена, результатом которой является повреждение структуры собственной ткани. Взаимодействие с чужеродными антигенами (физическими, химическими, инфекционными и др.), денатурация собственных белков или вскрытие тканевых структур (антигенов), ранее не контактируемых с иммунокомпетентными клетками, способствуют образованию аутоантигенов и выработку аутоантител против них. Таким образом, кожа представляет собой сложноорганизованную структуру с сетью иммунокомпетентных клеток и растворимых медиаторов. Внедрение молекулярно-биологических методов как инструмента познания, непрерывно расширяет сведения о коже как об органе иммунной системы. Полученные знания, безусловно, будут способствовать разработке новых подходов в терапии кожных болезней.

Ключевые слова: кожа; иммунная система; иммунокомпетентные клетки; иммунные комплексы; элиминация; обзор.

Для цитирования: Махнева Н.В. Клеточные и гуморальные компоненты иммунной системы кожи. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2016; 19(1): 12–17. DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-12-17

Для корреспонденции:

Наталья Викторовна Махнева, доктор мед. наук, профессор кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва, Россия. E-mail: makhneva@mail.ru.