

Dedne bulozne epidermolize, oskrba ran in nove možnosti zdravljenja

Epidermolysis bullosa, wound management and new therapeutic approaches

Špela Zemljič-Jokhadar,¹ Vlasta Dragoš,² Mirjana Liovic³

Izveček

Bulozna epidermoliza (EB) je dedna bolezen krhkosti kože, povezana z mutacijami 18 različnih genov, ki se izražajo v koži. Zaradi raznovrstnosti simptomov se razvršča v 4 osnovne tipe s 30 različnimi podtipi. Osnovni tipi EB so razdeljeni glede na plast kože, ki je z mutacijo prizadeta: EB simpleks, ki je vezana na epidermis, junkcijska EB, ki je vezana na bazalno membrano, ter distrofična EB, ki je vezana na dermis. Poznamo še Kindlerjev sindrom, ki je izredno redka oblika te bolezni. Pri vseh primerih je koža bolnikov zelo krhka, zato so osnovni simptomi mehurji in odprte rane, ki se težko celijo. Bolezen prizadene bolnike telesno in duševno, kronični vnetni procesi pa pogosto povzročijo nastanek agresivnih oblik ploščatoceličnega karcinoma kože. Gre za skupino redkih bolezni z incidenco okoli 1 : 40.000. V Sloveniji imamo 60 bolnikov z EB. V članku predstavljamo trenutno uveljavljen način oskrbe kroničnih ran bolnikov z EB in pregled najnovejših in najsodobnejših genetskih, regenerativnih in farmakoloških pristopov za razvoj načina zdravljenja te še vedno neozdravljive bolezni.

Abstract

Epidermolysis bullosa is a hereditary skin fragility disorder, which is linked to mutations in 18 genes that are expressed in the skin. Today we distinguish 4 main EB types, which include about 30 different disease subtypes with a variety of clinical symptoms. The main types are classified according to the skin layer that is affected: EB simplex linked to the epidermis; junctional EB linked to the basal membrane, and dystrophic EB linked to the dermis. Kindler syndrome is the fourth and very rare type of EB. In all cases, the patient's skin is very fragile, so the basic clinical symptoms are skin blisters and wounds that heal with difficulty. EB affects patients both physically and psychologically, and the chronic inflammation accompanying the disease often leads to aggressive forms of squamous cell carcinoma. This is a group of rare genetic diseases with an incidence of 1:40000. In Slovenia there are 60 patients with EB. Hereby we present the current standard of care of patients with this still incurable disorder, as well as the newest experimental methodologies aiming at the development of possible genetic, regenerative and pharmacological treatments of EB.

Citirajte kot/Cite as: Špela Zemljič-Jokhadar, Vlasta Dragoš, Mirjana Liovic. [Epidermolysis bullosa, wound management and new therapeutic approaches]. *Zdrav Vestn.* 2020;89(1–2):107–17.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2937

¹ Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

³ Medicinski center za molekularno biologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Mirjana Liovic, e: mirjana.liovic@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

bulozna epidermoliza; mutacija; zdravljenje

Key words:

epidermolysis bullosa; mutation; therapy

Prispelo: 12. 3. 2019

Sprejeto: 5. 8. 2019

1 Uvod

Bulozna epidermoliza (*epidermolysis bullosa* – EB) je dedna bolezen kože, za katero so značilni pojav mehurjev, erozij in ran, ki nastanejo po blažjem mehanskem draženju kože (Slika 1). Bolniki z EB imajo pogosto številne pridružene zaplete, ki so odvisni od vrste bulozne epidermolize, kot so dehidracija, sekundarne okužbe ran, pojav granulacijskega tkiva, atrofičnih brazgotin, povnetnih pigmentacij, pojavijo se lahko poikiloderma, hipertrofične brazgotine, milije, palmoplantarne keratodermije, aplazija kože. Pozne posledice osnovne bolezni so karcinomi na koži, tako bazalocelični (BCC) kot ploščatocelični karcinomi (SCC) (1). Na kožnih priveskih se lahko pojavijo distrofije ali popolna izguba nohtov, brazgotinska in univerzalna alopecija ali hipotrihoze. Bolniki lahko imajo v področju ustne sluznice mikrostomijo, obliteracijo vestibuloma, hipoplazijo sklenine, številne primere

zobne gnilobe, pomanjkljivo zobovje in peridontitise. Na očeh se lahko pojavijo erozije na roženici, vnetja vek, brazgotine na roženici, zlepljenost veznice na zrklu in vekah (simpblefaron), povešanje spodnje veke (ektropion), vnetje roženice in motnje vida s slepoto ter granulacije na veznici. V področju zunanjega ušesa se pojavlja zožitev zunanjega ušesnega kanala, prevodna naglušnost ter v področju nosu zožitev nosnic zaradi granulacij.

Drugi možni zapleti na ostalih organskih sistemih pri nekaterih oblikah buloznih epidermoliz so v področju prebavil: zapora (atrezija) pilorusa želodca, stenoze požiralnika, kronično zaprtje, gastroezofagealni refluks, analne fisure, enteropatije zaradi izgube beljakovin, kolitisi. V področju sečil in spolovil se lahko pojavijo zožitve sečnice, malfomacije sečil in rodil, vezikoureterne obstrukcije in stenoze, brazgotinenje v področju vulve, odpoved ledvic. V področju zgornjih

Tabela 1: Glavni tipi in podtipi dednih buloznih epidermoliz. DDBE – Dominantna distrofična bulozna epidermoliza; DBE – distrofična bulozna epidermoliza, BE bulozna epidermoliza; SBE – simpleksna bulozna epidermoliza, JBE – junkcijska bulozna epidermoliza; RDBE – recesivna distrofična bulozna epidermoliza. Prevedeno po (14).

Raven razcepa	Glavni tipi BE	Glavni podtipi BE	Tarčne beljakovina/e
Intraepidermal	SBE	Suprabazalna SBE	transglutaminaza 5; plakofilin 1; desmoplakin; plakoglobin
		Bazalna SBE	keratin 5 in 14; plektin; eksofilin 5 (Slac2-b); antigen buloznega pemfigoida 1 (angl. bullous pemphigoid antigen 1)
Intralamina lucida	JBE	JBE, generalizirana	laminin-332, kolagen XVII; $\alpha 6\beta 4$ integrin; $\alpha 3$ integrin
		JBE, lokalizirana	kolagen XVII; laminin-332; $\alpha 6\beta 4$ integrin
Sublamina densa	DBE	DDBE	kolagen VII
		RDBE	kolagen VII
Mešana	Kindlerjev sindrom	—	homolog 1 družine fermitin (kindlin-1)



Slika 1: Nekateri klinični simptomi EB. a) aplasia cutis congenita; b) mehurji, izpoljnjeni s krvavkasto vsebino; c) erozije.

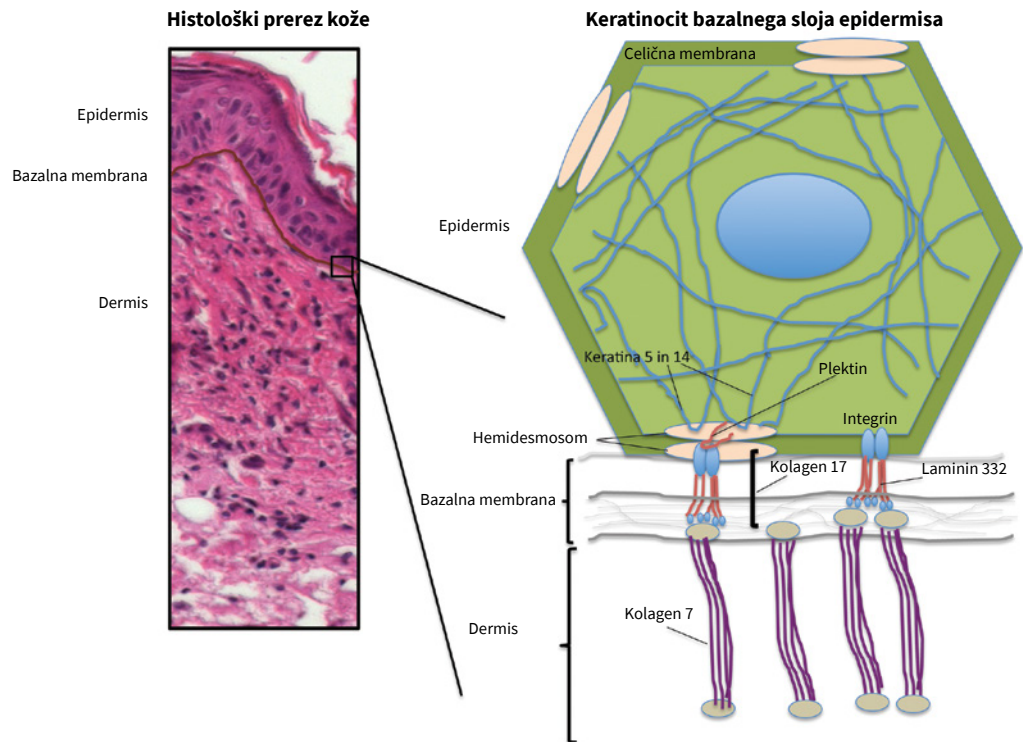
dihal se pojavljajo traheolaringealne stenoze. Na mišično-skeletnem sistemu se pojavlja osteopenija, osteoporoza, fleksijske kontrakture udov, kontrakture prstov in zlitje prstov (pseudosindaktilija), zraščanje prstov rok in nog v obliko rokavic, mišična atrofija. Bolnike lahko spremljajo anemije zaradi različnih vzrokov, največkrat zaradi pomanjkanja železa. Pojavlja se tudi dilatacijska kardiomiopatija. V področju endokrinih motenj se lahko pojavi zakasnitev v razvoju pubertete in amenoreja. Drugi sistemski zapleti so še pojavljanje sepse, zaostanek v rasti in razvoju ter zaradi številnih možnih doslej opisanih pridruženih stanj še invalidnost (2).

Vzrok za nastanek bolezni krhkosti kože in epitelnih tkiv je v mutaciji enega od 18 različnih genov, ki kodirajo 18 strukturnih in adhezivnih proteinov ce-

lic in zunajceličnega matriksa. Izražajo se v delu kože, debeline le nekaj sto mikrometrov (Slika 2).

Prizadeti sloj zajema bazalni del epidermisa, bazalno membrano in delno dermis. Mutacije v tarčnih genih najpogosteje povzročijo zamenjavo le ene aminokisliline (*angl.* missense) ali predčasno zaključevanje prepisovanja gena (*angl.* premature termination), kar povzroči nepravilno zvijanje proteina in zaradi tega njegovo nepravilno delovanje, ali pa pomanjkanje proteina (3). Mutacije v teh proteinih tako pripeljejo do nepravilnosti, ki posegajo v funkcionalno in strukturno celovitost epidermisa, bazalne membrane ali dermisa.

Fenotipi EB se izražajo v širokem spektru simptomov (4). Razlikujemo 4 osnovne tipe EB: EB simpleks (EBS), junkcijska EB (EBJ), distrofična EB (DEB) in Kindlerjev sindrom (Tabela 1). Razdelitev temelji na tem, v kateri plasti se pojavi razcep kožnega tkiva. V sklopu osnovnih tipov poznamo vsaj 30 klinično različnih podtipov EB, ki se med seboj razlikujejo glede na obseg in resnost sprememb kože in mukoznih membran, umestitev ter prizadetost notranjih organov in tkiv (2). Dedovanje bolezni je lahko dominantno ali recesivno. Za EBS je značilno dominantno dedovanje, čeprav pa poznamo na svetu 18 družin, ki ima recesivno obliko bolezni (5-13). Večinoma je vezana na mutacije v genih za keratina 5 ali 14. EBJ na drugi strani je izključno recesivne narave in je vezana na mutacije v genih za $\alpha 6\beta 4$ integrin, kolagen 17 ali laminin 5. Za razliko od teh se DEB deduje tako po dominantni kot recesivni poti in je vezana na mutacije v genu, ki kodira kolagen 7. Kindlerjev sindrom je izredno redka oblika bolezni, ki je vezana na mutacije v genu *KIND1* (oz. *FERMT1*), ki kodira protein kindlin. Kindlin igra posebno vlogo pri pove-



Slika 2: Shematski prikaz predela kože (okvirček) z izraženo EB. Gre za tanko plast, ki zajema spodnji del epidermisa, bazalno membrano in površinski del dermisa, v kateri se izraža 18 proteinov – možnih povzročiteljev dedne EB. Nekateri od najbolj pogostih so označeni na shemi.

zovanju aktinskih filamentov z zunaj-celičnim matriksom. Bolezen se deduje recesivno.

Ocenjena razširjenost EB v ZDA (Nacionalni register EB – NEBR, ki je zbiral podatke 16 let) je približno 11 primerov na milijon in pogostost približno 20 primerov na milijon živorojenih (15). V Sloveniji je razširjenost približno 30 primerov na milijon. Ocenjujejo, da je trenutno na svetu okoli 500.000 bolnikov z EB.

Leta 2014 so oblikovali nov klasifikacijski sistem za diagnosticiranje EB, ki zajema tip EB, način dedovanja, fenotipske značilnosti (razsežnost ran in različne zunajkožne simptome), odkritja pri mapiranju imunofluorescentno označenih antigenov in mutacije, ki so prisotne pri posameznem bolniku (14).

2 Diagnosticiranje EB

Prvi korak pri postavitvi diagnoze tipa EB pri bolniku je določanje ravni mesta nastanka mehurjev v koži, običajno z imunofluorescentnim mapiranjem antigenov in/ali s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (1). Uporaba monoklonskih protiteles, usmerjenih proti komponentam kožne bazalne membrane in epidermalnim antigenom, lahko dodatno olajšajo razvrščanje (subklasifikacijo) (14).

Na osnovi ravni razcepa kože razvrstimo bolnike v eno od štirih EB skupin. Pri nadaljnjem diagnosticiranju je potrebno opraviti gensko analizo mutacije, ker le-ta omogoča najbolj natančno razvrščanje bolezni in nadaljnje genetsko svetovanje (14). V primeru, da gen-

ske analize niso na voljo, razvrstijo EB na podlagi fenotipskih lastnosti, kot so razporeditev (lokalizirana ali splošna), resnost in prisotnost zunajkožnih zapletov. Iz družinske zgodovine bolnika lahko sklepamo na način dedovanja (1).

3 Oskrba ran

Pope in sodelavci (16) so razvili postopek za oskrbo ran pri EB, ki obsega štiri korake:

1. Tip EB, spremljajoče bolezni, starost, prehranski status, pridružene sistemske prizadetosti drugih organskih sistemov.
2. Skrb se osredinja na bolnika, ki mu lajšamo bolečino, srbež, dnevne življenjske aktivnosti in svetovanje v zvezi z zdravljenjem.
3. Lokalna oskrba rane: ugotovitev mesta in značilnosti ran, redno nežno čiščenje, odstranjevanje nekrotičnega tkiva, da se rana hitreje zaceli, obravnava kolonizacije/vnetja/okužbe, izbira ustrezne lokalne terapije in povojev, ocenjevanje celjenja.
4. Pri ranah, ki se slabo ali ne celijo, opravimo biopsijo in histološko preverjanje ob sumu na kožni karcinom.

Pomembna je podpora različnih izvajalcev v zdravstvu, kot so specializirane medicinske sestre ali sodelovanje s kliniki različnih strok pri obravnavi bolnikov.

Lokalna obravnava ran je odvisna od tipa rane, s katero se ukvarjamo. Na trgu so številne obloge za rane, ki jih delimo v tri skupine: neokluzivne, delno okluzivne, okluzivne in aktivne ali biološke obloge (16,17). Izbira ustrezne obloge je odvisna od stopnje celjenja rane. Nekrotično rano je potrebno oskrbeti s povojem s hidrogelom v kombinaciji s poliuretanskim filmom ali alginatom. V fazi vnetja rane bo alginatni povoj omogočil ustrezne pogoje za celjenje ran. V

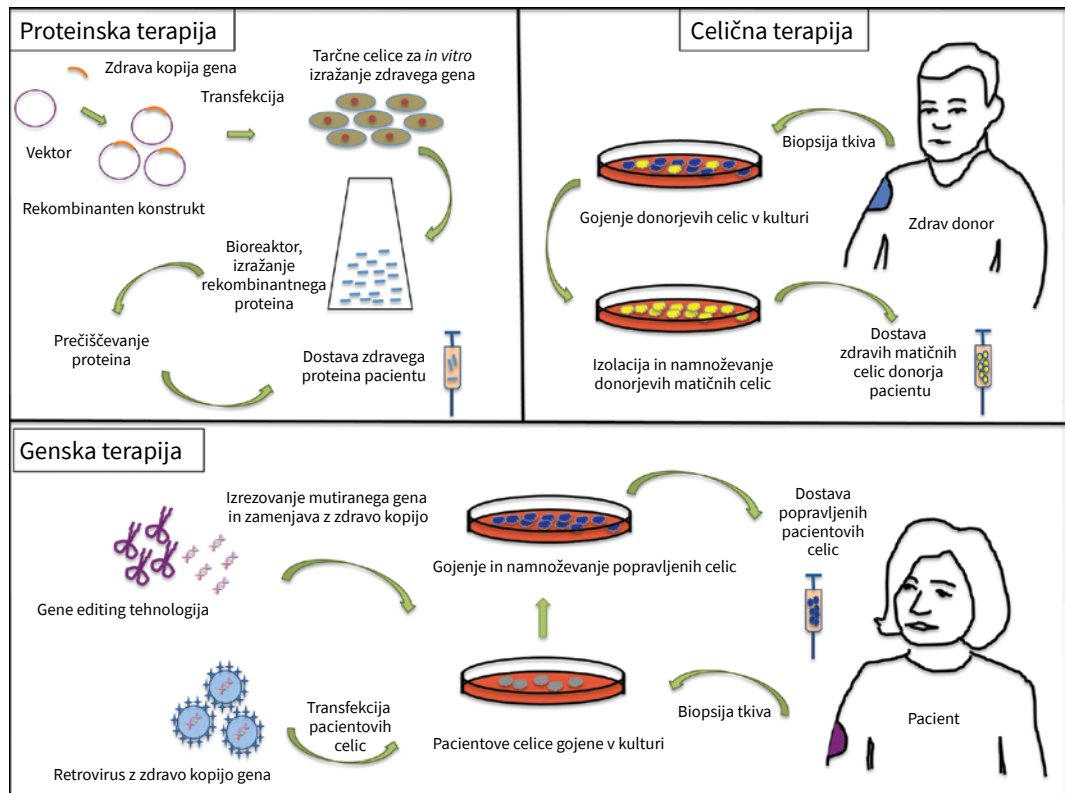
proliferativni fazi in fazi dozorevanja rane je potrebna obloga, ki uravnava vlago, s tem da vpija odvečen izcedek (poliuretanske in silikonske pene in drugo). Pri okuženi rani je potrebno uporabiti topikalna antimikrobna sredstva in antimikrobne povoje (s srebrom, medom, ogljem, poliaminopropil biguanidom, dialkilkarbamoil kloridom) (16,17). Za varovanje pred nastankom novih mehurjev se pogosto uporabljajo obloge s silikonom (16).

4 Oskrba bolnikov v Sloveniji

Redkost EB in različna vpletenost številnih drugih organov in sistemov (ne samo kože) so poseben izziv za ustrezno obravnavo teh bolnikov (2). V Sloveniji se je v zadnjih desetletjih razvila interdisciplinarna obravnava bolnikov, v kateri so v skupini poleg dermatologov vključeni še drugi specialisti medicinskih področij. V obravnavo so vključeni neonatologi, pediatri in internisti, patolog, medicinski genetik, otorinolaringolog, oftalmolog, kirurg plastik, ortoped, pediater gastroenterolog, hematolog, stomatolog, anesteziolog, endokrinolog, nevrolog, radiolog, kardiolog, nefrolog, specialist fizikalne medicine. V obravnavo tudi zgodaj vključimo patronažno službo in dietetika. Glavna skrb skupine je redno spremljanje kože in ran, zgodnje diagnosticiranje karcinomov kože, redno spremljanje zapletov na drugih organskih sistemih, odprava srbenja in preprečevanje bolečin.

5 Razvoj novih terapevtskih pristopov

Osnovni vzrok za nastanek EB so genske spremembe ključnih strukturnih genov, ki kodirajo različne strukturne proteine, ki med seboj povezujejo tri pla-



Slika 3: Osnovna načela nekaterih novih terapevtskih pristopov za EB.

sti kože. Za popolno ozdravitev bi bilo potrebno popraviti mutacijo. Koža je po velikosti naš največji organ. Terapevtski pristop, ki bi pozdravil to bolezen, bi moral popraviti prav vse celice, ki tvorijo okvarjene proteine. Za razliko od drugih organov, kot so pljuča, srce, jetra, itd., je koža lahko dostopna. Zato bi za zdravljenje dednih bolezni kože lahko potencialno uporabili pristop, ki bi omilil bolezenske znake. V zadnjih desetih letih smo doživeli velik preboj na tem področju, čeprav še nobeden od številnih obetavnih in že preizkušenih pristopov ni odkril možnosti za rutinsko zdravljenje EB. Poleg dolgotrajnega postopka uvažanja novih zdravil in kliničnih študij je eden glavnih razlogov verjetno visoka cena, ki znaša za gensko zdravljenje: tudi do 6 milijonov evrov za enega bolnika.

Doslej testirani novi terapevtski pristopi se lahko razdelijo na: celično terapijo, gensko terapijo, proteinsko terapijo

in sistemske terapije (Slika 3). V nadaljevanju članka bomo predstavili le nekaj najzanimivejših pristopov.

5.1 Celične terapije

Celične terapije vključujejo dosedanje poskuse z alogenimi fibroblasti, mezenhimijskimi matičnimi celicami, matičnimi celicami iz popkovine in presaditev kostnega mozga. Kern in sodelavci (18) so leta 2009 v več kot 50 miši z recesivno distrofično EB v ločenih poskusih podkožno vbrizgali zdrave mišje fibroblaste in fibroblaste človeka. Ugotovili so, da je poseg varen (pojavo se je rahlo prehodno vnetje). Raven kolagena 7 (nanj je vezana distrofična oblika EB) se je na dermo-epidermalni povezavi zvišala za 3,5- do 4,7-krat. Zanimivo je, da so vbrizgane celice zdrav kolagen 7 proizvajale en mesec, medtem ko je bil protein stabilen dlje časa. Koža mišk je zato zadrž

žala izboljššan fenotip več kot 100 dni po posegu. Vbrizgane celice so ostale na mestu injiciranja, niso se delile, tvorile tumorjev ali fibroznega tkiva. Leta 2010 so objavili študijo (19), v kateri so dvema bolnikoma z RDEB okoli ran subkutano vbrizgali alogene mezenhimske matične celice, izolirane iz kostnega mozga. Celice so čez nekaj časa sicer izginile, njihov učinek pa je bil viden že po enem tednu (dermo-epidermalna pregrada se je ponovno vzpostavila) in je trajal do 4 mesece. Leta 2013 je bila objavljena študija (20), v kateri so pristop, podoben prejšnjemu na miškah, testirali tudi na bolnikih z RDEB. Alogene fibroblaste so prav tako vbrizgali v kožo okoli ran. Celice so preživele nekaj tednov v tkivu, nato pa izginile, medtem ko je njihov pozitiven učinek trajal do 28 dni po posegu. Leta 2015 so Petrof in sodelavci (21) objavili novo študijo na desetih bolnikih z RDEB. Z infuzijo so jim dostavili alogene mezenhimske matične celice iz kostnega mozga. Učinek je bil ob večkratni ponovitvi posega viden v dveh mesecih. Površina prizadete kože se je pospešeno zaraščala, vnetje kože pa se je bistveno zmanjšalo. Bolniki so povedali, da je bil pozitiven učinek prisoten 4–6 mesecev. El-Darouti in sodelavci (22) pa so leta 2016 objavili študijo, v kateri so opravili celično infuzijo nehematopoetskih celic kostnega mozga, za katere je dokazano, da se lahko diferencirajo v fibroblaste. Imeli so dve skupini bolnikov z RDEB: v prvi so prejeli infuzijo matičnih celic z dodatkom ciklosporina, v drugi skupini pa matične celice brez ciklosporina. V obeh skupinah je bil učinek zelo podoben (med njima ni bilo statistično značilnih razlik): zdravstveno stanje bolnikov se je očitno izboljšalo, rane so se pospešeno zaraščale in leto po opravljenem testiranju ni bilo večjih negativnih posledic. Pri posegih, ki zajemajo mezenhimske matične celice, so ugotovili,

da se le-te po presaditvi ne delijo ali diferencirajo v zdrave celice, temveč delujejo posredno z izločanjem številnih rastnih faktorjev in citokinov, ki delujejo na okolno tkivo in s tem sprožijo pospešeno zaraščanje ran in zmanjšanje vnetja. Žal je bil njihov učinek, čeprav zelo dober, spet le prehodni in ne dolgotrajen. Radi bi omenili tudi izjemen poskus, pri katerem so presadili kostni mozeg izbrani skupini otrok z RDEB (23). Med sedmimi bolniki je eden umrl že pred samo presaditvijo zaradi izredno agresivnega zdravljenja (imunomieloablativna terapija), ki je potrebno pred samo presaditvijo. Po presaditvi kostnega mozga je umrl še en bolnik zaradi posledic zavrnitve presadka in okužbe. Pri ostalih 5 bolnikih pa so v roku pol leta po posegu ugotovili znatno izboljšanje stanja, ki je bilo posledica kopičenja zdravega kolagena 7 v predelu bazalne membrane. Dve leti po posegu so še vedno ugotavljali prisotnost tujih celic v koži (kimerizem) ter izboljšano zdravstveno stanje.

5.2 Genske terapije

Poskusi genskih terapij zajemajo: dostavo zdrave kopije gena z virusom v *ex vivo* pogojih, retrovirusne in lentivirusne vektorje (24–28) ter nevirusne poskuse. Med slednje spadajo: RNA interferenca oz. utišanje okvarjenega gena (29), uporaba AON (*angl.* antisense oligoribonucleotides) za preskakovanje mutiranih eksonov gena pri prepisovanju RNA v protein, aminoglikozide za preskok predčasnih stop kodonov (30) kot tudi uporaba različnih proteinov, ki režejo DNA na specifičnih zaporedjih (*angl.* gene editing), kot so ZFN-ji (*angl.* zinc finger nucleases), Taleni, Crispr/Cas9 (31).

Pri *ex vivo* genski terapiji bolniku odvzamejo celice z biopsijo kože in jih nato gojijo v *in vitro* pogojih. Popravilo

mutiranega gena v celicah se prav tako opravi *in vitro* v kulturi. Nato se popravljene celice vstavijo nazaj bolniku. Vsi ti pristopi so popisani v preglednih člankih (32-34), medtem ko bomo več povedali o nedavno objavljenem prvem uspešnem postopku genske terapije, ki je zajel skoraj celotno površino kože bolnika (80 %) z EB, vezano na mutacije v genu za laminin 332 (LAMB3) (35). Avtorji so po biopsiji kože, osamitvi bolnikovih keratinocitov, gojenju celic ter *in vitro* popravilu okvarjenega gena z dostavo kopije zdravega gena z lentivirusnim vektorjem, naredili še klonsko selekcijo (*angl.* clonal tracing) avtolognih popravljenih celic. Dokazano je namreč, da se epidermis pri človeku obnavlja zahvaljujoč skupini progenitorskih celic, ki se imenujejo holokloni. To so dolgotrajno živeče matične celice epidermisa kože, ki jih lahko *in vivo* in *in vitro* uspešno namočimo. Te diferencirajo v druge skupine progenitorskih celic, ki se nato na koncu diferencirajo v keratinocite epidermisa. Po selekciji so jih zato uporabili kot osnovo za gojenje epidermalnih "plaht" zdravih, avtolognih celic bolnika, ki so mu jih nato presadili na najbolj okvarjene predele kože. Osemletnemu dečku so s tem postopkom zamenjali (presadili) 80 % kože, ki sedaj, razen na območjih, ki niso bila zajeta s transplantacijo, nima več težav. Dosežek je izjemen, saj je bil deček v zelo slabem zdravstvenem stanju, in zdaj že nekaj let po zadnjem posegu normalno živi. Kljub temu, da je študija izjemna in izredno uspešna, so možnosti uporabe podobnega pristopa za druge bolnike z EB zaenkrat majhne. Poleg zelo visokih stroškov tovrstne obravnave obstaja še vedno skrb glede možnih stranskih učinkov same virusne dostave zdravega gena, saj bi ta lahko povzročila maligne spremembe tudi pozneje v življenju, kar odpira vrsto novih

etičnih vprašanj glede uporabe takega zdravljenja EB.

5.3 Proteinske terapije

Proteinska terapija zajema intradermalno ali intravensko dostavo *ex vivo* in v *in vitro* pogojih rekombinantno pridobljenega zdravega proteina (36,37). Zdravi kolagen 7 so običajno poskusili dostaviti topično, kar je dalo dobre rezultate (38). Vse tovrstne študije so do sedaj izvedli na ravni predkliničnih študij in na mišjih modelih, vendar so kljub pozitivnim učinkom še vedno le eksperimentalnega značaja.

5.4 Sistemske terapije

Sistemska terapija zajema uporabo že obstoječih zdravil za zdravljenje drugih zdravstvenih težav z namenom, da se nekateri njihovi učinki izkoristijo za izboljšanje zdravstvenega stanja pri bolnikih z EB. Gre predvsem za zmanjševanje vnetnega odgovora, zmanjševanja brazgotinjenja ran, hitrejšega zaraščanja ran itd. Do sedaj so testirali že učinek minociklina (39,40), ki ima protikolagenazno delovanje, a žal povzroči tudi težave s hiperpigmentacijo kože. Ciklosporin (41) ima protivnetno delovanje, povzroči pa lahko tudi raka kože. Etanercept (42), ki inhibira TNFalpha (protivnetno delovanje), ter Losartan (43), ki inhibira TGFbeta (zmanjšuje brazgotinjenje), lahko delujeta na vse procese, vezane na te faktorje v telesu. Poskusili so tudi s stimulacijo kostnega mozga bolnikov s proteinom HMG (44), da bi povečali število matičnih celic v koži in izboljšali zaraščanje ran, saj menijo, da se pri bolnikih z EB zaradi konstantnega aktiviranja procesa zaraščanja ran število matičnih celic v koži v življenju zmanjšuje.

6 Raziskave v Sloveniji

Z raziskavami EB na genetski, proteinski in celični ravni se že skoraj 20 let ukvarjamo na Medicinskem centru za molekularno biologijo (Inštitut za biokemijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani). Sodelujemo z Dermatovenerološko kliniko UKC Ljubljana in številnimi mednarodnimi raziskovalnimi in zdravstvenimi centri (Guy's Hospital, King's College London, Velika Britanija; Miller School of Medicine, University of Miami, ZDA; Institute of Medical Biology, AStar, Singapur; Department of Medical Sciences, Uppsala University, Švedska, itd.). V zadnjih letih smo se v svojih raziskavah usmerili v preučevanje mehanizma razvoja bolezni in novih dostavnih sistemov, ki bi bili uporabni predvsem za dostavo terapevtskih molekul v kožo (45-48). Posebno pomemben dosežek je preboj na področje regenerativne medicine in priprava prve inducirane pluripotentne matične celične linije (iPSC) EBS s pomočjo reprogramiranja (dediferenciacije) keratinocitov bolnika z EBS (49). To celično linijo bomo v nadaljnjih raziskavah uporabili kot celični model in osnovo za *in vitro* pripravo tkivnega ekvivalenta EBS kože. Te bomo nato uporabili za presejalne teste številnih učinkovin, ki bi lahko prispevale k pospešenemu zaraščanju ran, ali pa k odpravljanju nekaterih kliničnih simptomov EB (npr. vnetje).

Literatura

1. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr.* 2008;152(2):276-80.
2. El Hachem M, Zambruno G, Bourdon-Lanoy E, Ciasulli A, Buisson C, Hadj-Rabia S, et al. Multicentre consensus recommendations for skin care in inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9(1):76.
3. Has C, Fischer J. Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostics and new clinical phenotypes. *Exp Dermatol.* 2018;28(1146):52.
4. Fine JD, Mellerio JE. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part II. Other organs. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(3):387-402.
5. Corden LD, Mellerio JE, Gratian MJ, Eady RA, Harper JI, Lacour M, et al. Homozygous nonsense mutation in helix 2 of K14 causes severe recessive epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat.* 1998;11(4):279-85.

7 Zaključek

V zadnjem desetletju je prišlo do izjemnega preboja pri raziskovanju mehanizmov EB, razumevanju same bolezni in razvoju številnih strategij za poskusne pristope zdravljenja, ki so imeli večinoma pozitivne učinke. Prav tako se je zelo spremenila klinična obravnava teh bolnikov, kar kljub izredno težki bolezni prispeva k njihovi boljši kakovosti življenja. Poseben poudarek imajo tudi podporne skupine, med katerimi ima vodilno vlogo krovna organizacija *DEBRA International (dystrophic epidermolysis bullosa research association)*, <http://www.debra-international.org/about-debra.html>, v več kot 50 državah pa že obstajajo lokalne organizacije DEBRA, med njimi tudi v Sloveniji (Debra Slovenia, <http://www.debra-slovenia.si/>).

8 Zahvala

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (program P1-0390), Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije in razpisu EraCoSysMed (projekt 4D-HEALING), Razvojnemu skladu Univerze v Ljubljani in ustanovi CELSA Alliance (projekt "Molecular basis of keratinopathies") za izkazano podporo in financiranje naših raziskav.

6. Ciubotaru D, Bergman R, Baty D, Indelman M, Pfendner E, Petronius D, et al. Epidermolysis bullosa simplex in Israel: clinical and genetic features. *Arch Dermatol*. 2003;139(4):498-505.
7. Rugg EL, McLean WH, Lane EB, Pitera R, McMillan JR, Dopping-Hepenstal PJ, et al. A functional "knockout" of human keratin 14. *Genes Dev*. 1994;8(21):2563-73.
8. Jonkman MF, Heeres K, Pas HH, van Luyn MJ, Elema JD, Corden LD, et al. Effects of keratin 14 ablation on the clinical and cellular phenotype in a kindred with recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*. 1996;107(5):764-9.
9. Batta K, Rugg EL, Wilson NJ, West N, Goodyear H, Lane EB, et al. A keratin 14 'knockout' mutation in recessive epidermolysis bullosa simplex resulting in less severe disease. *Br J Dermatol*. 2000;143(3):621-7.
10. Lanschuetzer CM, Klausegger A, Pohla-Gubo G, Hametner R, Richard G, Uitto J, et al. A novel homozygous nonsense deletion/insertion mutation in the keratin 14 gene (Y248X; 744delC/insAG) causes recessive epidermolysis bullosa simplex type Köbner. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(1):77-9.
11. Has C, Chang YR, Volz A, Hoeping D, Kohlhasse J, Bruckner-Tuderman L. Novel keratin 14 mutations in patients with severe recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*. 2006;126(8):1912-4.
12. Yiasemides E, Trisnowati N, Su J, Dang N, Klingberg S, Marr P, et al. Clinical heterogeneity in recessive epidermolysis bullosa due to mutations in the keratin 14 gene, KRT14. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33(6):689-97.
13. García M, Santiago JL, Terrón A, Hernández-Martín A, Vicente A, Fortuny C, et al. Two novel recessive mutations in KRT14 identified in a cohort of 21 Spanish families with epidermolysis bullosa simplex. *Br J Dermatol*. 2011;165(3):683-92.
14. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1103-26.
15. Fine JD. Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry. *JAMA Dermatol*. 2016;152(11):1231-8.
16. Pope E, Lara-Corrales I, Mellerio J, Martinez A, Schultz G, Burrell R, et al. A consensus approach to wound care in epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(5):904-17.
17. Denyer J, Pillay E, Clapham J. International Consensus Best Practice Guidelines for Skin and Wound Care in Epidermolysis Bullosa. London: Wounds International; 2017.
18. Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, Hausser I, Roth W, Magin TM, et al. Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. *Mol Ther*. 2009;17(9):1605-15.
19. Conget P, Rodriguez F, Kramer S, Allers C, Simon V, Palisson F, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12(3):429-31.
20. Petrof G, Martinez-Queipo M, Mellerio JE, Kemp P, McGrath JA. Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: results of a randomized, vehicle-controlled trial. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1025-33.
21. Petrof G, Lwin SM, Martinez-Queipo M, Abdul-Wahab A, Tso S, Mellerio JE, et al. Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol*. 2015;135(9):2319-21.
22. El-Darouti M, Fawzy M, Amin I, Abdel Hay R, Hegazy R, Gabr H, et al. Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with bone marrow non-hematopoietic stem cells: a randomized controlled trial. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2016;29(2):96-100.
23. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med*. 2010;363(7):629-39.
24. Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, et al. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet*. 2002;32(4):670-5.
25. Woodley DT, Krueger GG, Jorgensen CM, Fairley JA, Atha T, Huang Y, et al. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):1021-8.
26. Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif MA, Décha A, Pironon N, Tonasso L, et al. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2010;18(8):1509-18.
27. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nunzio F, Di Iorio E, Recchia A, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med*. 2006;12(12):1397-402.
28. Chen M, O'Toole EA, Muellenhoff M, Medina E, Kasahara N, Woodley DT. Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen "minigene". Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem*. 2000;275(32):24429-35.
29. Morgan CP, Allen DS, Millington-Ward S, O'Dwyer GE, Palfi A, Jane Farrar G. A mutation-independent therapeutic strategy for dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2013;133(12):2793-6.
30. Zingman LV, Park S, Olson TM, Alekseev AE, Terzic A. Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(1):99-103.
31. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.

32. Gorell E, Nguyen N, Lane A, Sibrashvili Z. Gene therapy for skin diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(4):a015149.
33. Abdul-Wahab A, Qasim W, McGrath JA. Gene therapies for inherited skin disorders. *Semin Cutan Med Surg*. 2014;33(2):83-90.
34. Rashidghamat E, McGrath JA. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Intractable Rare Dis Res*. 2017;6(1):6-20.
35. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*. 2017;551(7680):327-32.
36. Hovnanian A. Systemic protein therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: how far are we from clinical translation? *J Invest Dermatol*. 2013;133(7):1719-21.
37. Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, et al. Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2013;133(7):1910-3.
38. Wang X, Ghasri P, Amir M, Hwang B, Hou Y, Khalili M, et al. Topical application of recombinant type VII collagen incorporates into the dermal-epidermal junction and promotes wound closure. *Mol Ther*. 2013;21(7):1335-44.
39. White JE. Minocycline for dystrophic epidermolysis bullosa. *Lancet*. 1989;1(8644):966.
40. Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon J, et al. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontal Res*. 1985;20(1):12-23.
41. del-Río E. Prevention of blisters in dystrophic recessive epidermolysis bullosa with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol*. 1993;29(6):1038-9.
42. Gubinelli E, Angelo C, Pacifico V. A case of dystrophic epidermolysis bullosa improved with etanercept for concomitant psoriatic arthritis. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11:53-4.
43. Fritsch A, Loeckermann S, Kern JS, Braun A, Bösl MR, Bley TA, et al. A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1669-79.
44. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, et al. PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(16):6609-14.
45. Liovic M, Ozir M, Zavec AB, Peternel S, Komel R, Zupancic T. Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells. *Microb Cell Fact*. 2012;11(1):67.
46. Zavec AB, Ota A, Zupancic T, Komel R, Ulrich NP, Liovic M. Archaeosomes can efficiently deliver different types of cargo into epithelial cells grown in vitro. *J Biotechnol*. 2014;192 Pt A:130-5.
47. Zemljič Jokhadar Š, Klančnik U, Grundner M, Švelc Kebe T, Vrhovec Hartman S, Liović M, et al. GPMVs in variable physiological conditions: could they be used for therapy delivery? *BMC Biophys*. 2018;11(1):1.
48. Zupancic T, Sersa G, Törmä H, Lane EB, Herrmann H, Komel R, et al. Keratin gene mutations influence the keratinocyte response to DNA damage and cytokine induced apoptosis. *Arch Dermatol Res*. 2017;309(7):587-93.
49. Kolundzic N, Khurana P, Hobbs C, Rogar M, Ropret S, Törmä H, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an epidermolysis bullosa simplex patient heterozygous for keratin 5 E475G mutation and with the Dowling Meara phenotype. *Stem Cell Res (Amst)*. 2019;37:101424.