

<https://doi.org/10.25208/vdv16249>



# Эффективность живого эквивалента кожи в терапии врожденного буллезного эпидермолиза

© Карамова А.Э.<sup>1\*</sup>, Кубанов А.А.<sup>1</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>2</sup>, Роговая О.С.<sup>2</sup>, Чикин В.В.<sup>1</sup>, Нефедова М.А.<sup>1</sup>, Мончаковская Е.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

**Обоснование.** Врожденный буллезный эпидермолиз — группа наследственных заболеваний кожи, обусловленных мутациями в генах структурных белков эпидермиса и дермо-эпидермального соединения. Основным клиническим признаком врожденного буллезного эпидермолиза является образование пузырей и/или эрозий на коже и слизистых оболочках в ответ на незначительную механическую травму. Использование эквивалентов кожи, содержащих аллогенные клетки кожи человека, рассматривается как потенциально эффективное патогенетическое средство терапии, способное обеспечить заживление эрозивно-язвенных дефектов.

**Цель исследования.** Оценить эффективность и безопасность терапии больных врожденным буллезным эпидермолизом с применением живого эквивалента кожи.

**Методы.** В исследование было включено 7 больных (5 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 20 до 55 лет с диагнозом «врожденный буллезный эпидермолиз» с различными клиническими подтипами заболевания: 3 пациента — с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом средней тяжести; 2 пациента — с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом тяжелой степени; 1 пациент — с доминантным дистрофическим буллезным эпидермолизом и 1 пациент — с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом. Проведена трансплантация комбинированного аллогенного живого эквивалента кожи, состоящего из гелевого матрикса на основе коллагена I типа в низкой концентрации (5 мг/мл) и содержащего аллогенные кератиноциты и фибробласты. Эквивалент кожи получен в лаборатории Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Всего оценено 19 эрозивно-язвенных дефектов размерами от 0,4 до 120 см<sup>2</sup>. Оценка клинической эффективности терапии проводилась на 14-й день. Оценивался уровень экспрессии коллагена методом иммунофлюоресцентного антигенного картирования.

**Результаты.** На 14-й день 10 эрозий (53%) полностью эпителизировались, площадь 4 (21%) эрозий сократилась более чем на 75%. В 1 (5%) случае наблюдалось уменьшение площади в диапазоне 25–75%, отсутствие положительного эффекта — в 4 (21%) случаях. Клиническая эффективность сопровождалась повышением экспрессии коллагена VII типа в сравнении с исходным уровнем.

**Заключение.** Полученные результаты продемонстрировали клиническую эффективность наружной терапии с применением живого эквивалента кожи, однако статистически значимых различий по сравнению с применением современных атравматичных неадгезивных перевязочных средств достигнуто не было.

**Ключевые слова:** врожденный буллезный эпидермолиз; пограничный буллезный эпидермолиз; рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз; эрозии; заживление; наружная терапия

**Конфликт интересов:** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования:** рукопись подготовлена и опубликована в рамках выполнения государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России № 056-00116-21-00 в рамках выполнения государственного задания ИБР РАН № 088-2021-0016.

**Для цитирования:** Карамова А.Э., Кубанов А.А., Воротеляк Е.А., Роговая О.С., Чикин В.В., Нефедова М.А., Мончаковская Е.С. Эффективность живого эквивалента кожи в терапии врожденного буллезного эпидермолиза. Вестник дерматологии и венерологии. 2023;99(6):29–36. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv16249>



<https://doi.org/10.25208/vdv16249>

# Efficacy of human living skin equivalent in the treatment of inherited epidermolysis bullosa

© Arfenya E. Karamova<sup>1\*</sup>, Alexey A. Kubanov<sup>1</sup>, Ekaterina A. Vorotelyak<sup>2</sup>, Olga S. Rogovaya<sup>2</sup>, Vadim V. Chikin<sup>1</sup>, Mariya A. Nefedova<sup>1</sup>, Ekaterina S. Monchakovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Background.** Inherited epidermolysis bullosa is a group of genetic skin disorders caused by mutations in genes encoding structural proteins of epidermis and dermo-epidermal junction. Clinical manifestations are characterized by spontaneous or trauma-induced skin and/or mucosal blistering, and extensive wounds. The use of tissue-engineered skin substitutes composed of allogeneic human skin cells is considered to be a perspective therapeutic approach in improving wound healing process.

**Aims.** To assess safety and efficacy of human skin equivalent in the treatment of inherited epidermolysis bullosa patients

**Methods.** 7 patients (5 female and 2 male subjects) from the age of 20 to 55 with inherited epidermolysis bullosa with different clinical subtypes were enrolled in the study: 3 patients with intermediate recessive dystrophic epidermolysis bullosa, 2 patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa, 1 patient with dominant dystrophic epidermolysis bullosa and 1 patient with junctional epidermolysis bullosa. Transplantation of composite allogeneic living skin equivalent comprising allogeneic keratinocytes and fibroblasts in low concentration (5 mg/ml) embedded within a type I collagen gel matrix was performed. The living skin equivalent was developed at N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology. 19 erosions and ulcers with a surface area between 0.4 and 120 cm<sup>2</sup> were evaluated. At day 14 clinical assessment was performed. To assess level of expression immunofluorescence antigen mapping was used.

**Results.** At day 14 complete erosion closure was achieved in 10 (53%) erosions. 4 (21%) erosions reduced in size > 75%. Size reduction between 25 and 75% was shown in a single (5%) case, no clinical efficacy was demonstrated in 4 (21%) cases. Collagen VII expression increased comparing to baseline level and accompanied clinical improvement.

**Conclusions.** The obtained data showed clinical efficacy of topical treatment with living skin equivalent, although no statistically significant difference was seen between living skin equivalent and atraumatic non-adhesive dressings.

**Keywords:** inherited epidermolysis bullosa; junctional epidermolysis bullosa; recessive dystrophic epidermolysis bullosa; erosions; healing; topical treatment

**Conflict of interest:** the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Funding source:** the manuscript was prepared and published as part of the fulfillment of the state task of the Federal State Budgetary Institution "GNCDC" of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00116-21-00 as part of the fulfillment of the state task of the IBR RAS No. 088-2021-0016.

**For citation:** Karamova AE, Kubanov AA, Vorotelyak EA, Rogovaya OS, Chikin VV, Nefedova MA, Monchakovskaya ES. Efficacy of human living skin equivalent in the treatment of inherited epidermolysis bullosa. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2023;99(6):29–36. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv16249>



## Обоснование

Врожденный буллезный эпидермолиз (БЭ) — фенотипически и генетически гетерогенная группа генодерматозов, обусловленная дефектом структурных белков зоны базальной мембраны кожи [1]. Известно более 1000 мутаций в 16 генах структурных белков кожи, способных приводить к развитию четырех основных клинических типов врожденного БЭ: простого БЭ, пограничного БЭ, дистрофического БЭ и синдрома Киндлер [2]. Объединяющим признаком различных типов врожденного БЭ является образование пузырей на коже и/или слизистых оболочках после незначительного механического воздействия [3]. Общая цель лечения врожденного БЭ — эпителизация эрозивно-язвенных поражений и предотвращение развития осложнений [4].

Все существующие методы терапии врожденного БЭ являются симптоматическими и включают применение атравматичных неадгезивных перевязочных средств, обработку пузырей антисептиками, терапию, направленную на коррекцию осложнений [5]. В качестве потенциально эффективного патогенетического средства терапии, направленного на восстановление продукции структурных белков эпидермиса и способного обеспечить заживление эрозивно-язвенных дефектов у больных врожденным БЭ, рассматриваются эквиваленты кожи, содержащие клетки кожи [6]. Структурная и функциональная поддержка клеток в эквиваленте кожи достигается применением различных природных и синтетических материалов. Эквивалент кожи представляет собой тканеинженерную конструкцию, состоящую из основы-носителя, коллагенового геля (аналога дермы), дермальных фибробластов и эпителиальных клеток на поверхности [7]. В зависимости от клеточной культуры тканеинженерные эквиваленты кожи классифицируются на эпидермальные (содержащие кератиноциты), дермальные (фибробласты и кератиноциты) и комбинированные/полнослойные (фибробласты) [6].

Использование аллогенных клеток (кератиноцитов и фибробластов) имеет ряд преимуществ, в частности доступность для приготвления, отсутствие необходимости биопсии кожи пациентов с врожденным БЭ, возможность использования в случаях, когда аутологичные клетки недоступны. Необходимый для сборки якорных фибрилл, число и структура которых изменяются при дистрофическом БЭ, коллаген VII типа синтезируется как кератиноцитами, так и фибробластами [8]. Разработанный в Институте биологии развития РАН живой эквивалент кожи (ЖЭК), который содержит аллогенные стромальные и эпителиальные клетки, может быть эффективен в терапии больных врожденным БЭ.

**Цель исследования** — оценить эффективность и безопасность терапии больных врожденным БЭ с применением ЖЭК.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено открытое, нерандомизированное, контролируемое исследование для оценки клинической эффективности и безопасности терапии больных врожденным БЭ с применением ЖЭК.

### Критерии соответствия

В исследование включены пациенты в возрасте от 18 лет с различными клиническими подтипами

врожденного БЭ. Диагноз был установлен клинически и подтвержден методом иммунофлюоресцентного антигенного картирования. В качестве контроля для проведения исследования методом непрямого иммунофлюоресценции использовали биоптат кожи здорового человека. Всем пациентам проводили лабораторное обследование: общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи. Получали биоптат кожи для проведения иммунофлюоресцентного антигенного картирования с использованием антител к кератинам 5-го и 14-го типов, α3-, β3- и γ2-цепям ламинина, α6- и β4-субъединицам интегрин, коллагену XVII и VII типов, плакофилину-1, десмоплакину, плектину и киндлин-1.

Эквивалент кожи, содержащий аллогенные стромальные и эпителиальные клетки, получен в лаборатории ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Для получения ЖЭК готовили коллагеновый гель с использованием коллагена I типа, к которому последовательно добавляли смесь бикарбоната натрия («ПанЭко», Россия) и 0,34N NaOH («Химмед», Россия) (1 часть : 1,9 части), L-глутамин (Invitrogen, США) и концентрированной (×10) среды M199 («ПанЭко», Россия) (1 часть : 25 частей), HEPES (Sigma, США) и ФБС (HyClone, США) (1 часть : 5 частей). В культуральную посуду вносили необходимое количество коллагенового геля, содержащего 150 тыс. фибробластов человека на 1 мл геля. После полимеризации на гель наслаивали культуральную среду, содержащую эпидермальные кератиноциты в концентрации 1 млн клеток на 1 мл среды, в объеме 20 мл (что составляет 250 тыс. кл./см). На 3-и сутки после формирования среду в чашке с ЖЭК меняли на бессывороточную.

### Условия проведения

Исследование проведено совместно ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России и ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

В условиях стерильной операционной (перевязочной) проводилась трансплантация ЖЭК из расчета 1 см<sup>2</sup> трансплантата на 1 см<sup>2</sup> язвы на поверхности эрозий с розовым влажным дном, свободным от гнойных выделений, без признаков вторичного инфицирования и малигнизации, с четкими границами, размерами от 0,5 см в диаметре. Перед трансплантацией ЖЭК эрозии/язвы обрабатывались 0,9% раствором натрия хлорида.

Трансплантация ЖЭК производилась при помощи двух стерильных пинцетов, которыми трансплантат переносился в область дефекта за края губки. Верхняя сторона ЖЭК ориентирована «вверх» от эрозии/язвы. В качестве первичной повязки поверх ЖЭК накладывалась неадгезивная сетчатая повязка (Mepitel, Molnlycke Health Care, Швеция, или Бранолинд, Paul Hartmann AG, Германия, или Воскопран, Биотекфарм, РФ, Силикотюль и др.) с захватыванием не менее 1–2 см неповрежденной кожи от краев раны.

При наложении сетчатой повязки в качестве вторичной повязки применялась стерильная марлевая салфетка, фиксируемая бинтом (Пеха-хафт / Пеха креп, трубчатый бинт, марлевый бинт, Paul Hartmann AG, Германия). В течение не менее 4–5 дней после проведения процедуры исследователем ежедневно проводился осмотр пациента и регистрация симптомов забо-

левания. После снятия вторичной повязки определяли состояние язвенного дефекта (без удаления первичной повязки или после ее удаления). Повязку меняли при сильной экссудации, сильных неприятных субъективных ощущениях, а также в плановом порядке в зависимости от времени, предусмотренного инструкцией к первичной повязке. Первую перевязку осуществляли не ранее 4–5 суток после аппликации.

Признаками присутствия трансплантата на язве считали:

- наличие тонкой корки от серого до коричневого цвета, неплотно спаянной с подлежащими тканями;
- наличие тонкого, нестратифицированного эпителия (по типу эпителия, наблюдаемого при краевой эпителизации на самом краю дефекта кожи).

Признаками лизиса трансплантата считается его видимое отсутствие на ране, а также его разрыхление и приобретение жидкой консистенции.

#### *Исходы исследования*

Заживление или уменьшение размеров эрозивно-язвенных дефектов. Изменение уровня экспрессии структурных белков кожи.

#### *Анализ в подгруппах*

Обследовано 7 больных с различными клиническими подтипами: 3 пациента с рецессивным дистрофическим БЭ средней тяжести, 2 пациента с рецессивным дистрофическим БЭ тяжелой степени, 1 пациент с доминантным дистрофическим БЭ и 1 пациент с пограничным БЭ. Для сравнительной оценки эффективности терапии на эрозии без признаков вторичного инфицирования и малигнизации, на которые не проводили трансплантацию ЖЭК, накладывались неадгезивные атравматичные перевязочные средства.

Перевязочные средства накладывали на поверхность эрозивно-язвенных дефектов. Предварительно перед наложением перевязочных средств поверхность эрозий обрабатывали раствором антисептиков и дезинфицирующих средств (0,01% раствор для местного применения бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлорид моногидрат и 0,05% водный раствор хлоргексидина биглюконата).

Наложение повязок осуществлялось по размеру дефекта кожи с захватом 1,0–1,5 см окружающей кожи или в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Выбор перевязочного средства основывался на характеристиках эрозивно-язвенных дефектов кожи (размер, характер экссудата, характеристики дна эрозии/язвы и состояние краев и ткани, окружающей эрозию/язву). Принимались во внимание субъективные ощущения и индивидуальная переносимость пациентов. Для терапии неинфицированных эрозий/язв использовали сетчатые мазевые повязки, пропитанные вазелином, сетчатые силиконовые повязки, губчатые пористые силиконовые повязки, гидрогелевые повязки и сорбирующие повязки с пропиткой натуральным пчелиным воском.

Частота перевязок определялась степенью и скоростью пропитывания повязок экссудатом. Перевязки эрозий с незначительным и умеренным количеством экссудата проводились 1 раз в 2 дня, с обильным экссудатом — ежедневно. Во время каждой перевязки документально фиксировалось изменение площади, количества и характера экссудата эрозивно-язвенных

дефектов. Регистрировали также изменения краев эрозий/язв и субъективных ощущений в области дефекта.

#### *Методы регистрации исходов*

Клиническая оценка эффективности терапии проводилась через 2 недели трансплантации ЖЭК в соответствии со следующими критериями:

- клиническое выздоровление — полное заживление эрозии/язвы;
- значительное улучшение — уменьшение площади эрозии/язвы на 75% по сравнению с исходными данными, уменьшение количества экссудата, наличие грануляций, уменьшение воспалительных явлений, снижение выраженности боли;
- улучшение — уменьшение площади эрозии/язвы на менее 75%, но более 25% по сравнению с исходными данными, уменьшение количества экссудата, наличие грануляций, уменьшение воспалительных явлений, снижение выраженности боли;
- без изменений — уменьшение площади эрозии/язвы менее на 25% или отсутствие изменений по сравнению с исходными данными, незначительное уменьшение количества экссудата, отсутствие грануляций, незначительное уменьшение воспалительных явлений, незначительное снижение выраженности боли;
- ухудшение — увеличение площади и/или глубины эрозии/язвы и количества экссудата, выраженность воспалительных явлений и субъективных ощущений сохраняется на прежнем уровне или увеличивается.

Проведено исследование биоптатов кожи методом иммунофлюоресцентного антигенного картирования с использованием антител к кератинам 5-го и 14-го типов,  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- и  $\gamma$ 2-цепям ламинина,  $\alpha$ 6- и  $\beta$ 4-субъединицам интегрина, коллагену XVII и VII типов, плакофилину-1, десмоплакину, плектину и киндлин-1.

Уровень экспрессии оценивался методом иммунофлюоресцентного антигенного картирования в соответствии со следующими критериями:

- восстановление экспрессии дефицитного белка — формирование сплошной или практически сплошной линии свечения антител к дефицитному белку;
- частичное восстановление экспрессии дефицитного белка — тенденция к формированию линии свечения антител к дефицитному белку;
- отсутствие эффекта — отсутствие тенденции к формированию линии в зоне дермо-эпидермального соединения.

#### *Этическая экспертиза*

Все пациенты, включенные в исследование, подписали информированное добровольное согласие, форма которого прошла одобрение и была утверждена локальным этическим комитетом ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России (протокол № 1 от 29 января 2021 г.).

#### *Статистический анализ*

Данные представлены в виде абсолютных и относительных частот. Для сравнения клинической эффективности применения ЖЭК использовали таблицы сопряженности и критерий  $\chi^2$  или точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .



Рис. 1. Множественные эрозии в области очагов рубцовой атрофии на коже туловища у 20-летнего больного тяжелым рецессивным дистрофическим буллезным эпидермозом  
 Fig. 1. Multiple erosions in the area of atrophic scarring on the trunk of a 20-year-old patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa

**Результаты**

При клиническом обследовании у всех 7 больных врожденным БЭ выявлены множественные пузыри и эрозии на коже различной локализации. На слизистой оболочке полости рта пузыри и эрозии имелись у больных среднетяжелым и тяжелым рецессивным дистрофическим БЭ и у больной среднетяжелым пограничным БЭ.

У больных тяжелым рецессивным дистрофическим БЭ поражение кожи носило генерализованный характер. Кожа туловища, верхних и нижних конечностей представлена очагами преимущественно рубцовой атрофии, на поверхности которых имелись множественные пузыри с вялой крышкой, геморрагическим, серозным и гнойным содержимым, и эрозивно-язвенные дефекты кожи, которые сливались друг с другом, образуя обширные очаги поражения (рис. 1). У больных среднетяжелым рецессивным дистрофическим БЭ клиническая картина была представлена эрозиями, преимущественно локализовавшимися в области очагов рубцовой атрофии на коже верхних и нижних конечностей. У пациента с доминантным дистрофическим БЭ на коже наблюдались эрозивные дефекты кожи преимущественно на коже плеч, предплечий и голени. Эрозии располагались на видимо неповрежденных участках кожи.

У больной пограничным БЭ 24 лет эрозии локализовались исключительно на коже голени. Единичные пузыри были обнаружены на коже в области разгибательной поверхности локтевых суставов. Эрозии с незначительным и умеренным гнойным отделяемым наблюдались на коже у всех больных.

Среди осложнений у больных среднетяжелым и тяжелым рецессивным дистрофическим БЭ выявлены псевдосиндактилии кистей и стоп, контрактуры суставов кистей, стоп, локтевых и коленных суставов, микростомия, анкилоглоссия, заращение вестибулярных складок, анонихии и частичная адентия. Рубцовая атрофия волосистой части головы наблюдалась у 1 пациента с рецессивным дистрофическим БЭ средней тяжести.

Трансплантации ЖЭК проведена на 19 эрозий с розовым влажным дном, свободным от гнойного отделяемого, с четкими границами, ровными краями, не возвышающимися над дном эрозий. Площадь эрозий варьировала от 0,4 до 120 см<sup>2</sup>. 5 (26,3%) эрозий из 19 были отнесены к группе длительно не заживающих, которые существовали на коже более 1 месяца и не зажившие в течение 1 месяца проводимой терапии с применением атравматичных неадгезивных перевязочных средств.

Неадгезивные перевязочные средства применили на 20 эрозий, сопоставимых по характеристикам, с исходной площадью от 1 до 18 см<sup>2</sup>, 2 (10%) эрозии были длительно незаживающими.

*Основные результаты исследования*

В результате однократной трансплантации комбинированного аллогенного ЖЭК к 14-му дню полная эпителизация достигнута в 10 случаях (53%), из которых 8 (80%) эрозий полностью эпителизовалось уже к 7-му дню. Более чем на 75% сократилась исходная площадь 4 (21%) эрозий. В аналогичной доле случаев отмечено отсутствие положительной динамики, что обусловлено присоединением вторичной инфекции в области 3 (75%) эрозий без нарушения сроков заживления; 1 (25%) из эрозий изначально являлась длительно незаживающей, что объясняет отсутствие динамики; в 1 случае (5%) наблюдалось уменьшение площади эрозий в диапазоне 25–75% (рис. 2).



Рис. 2. Распределение эрозивных дефектов кожи у больных врожденным буллезным эпидермозом по выраженности уменьшения площади на 14-й день после трансплантации живого эквивалента кожи, n (%)  
 Fig. 2. Reduction in erosion size in patients with epidermolysis bullosa at day 14 after human living skin equivalent transplantation, n (%)

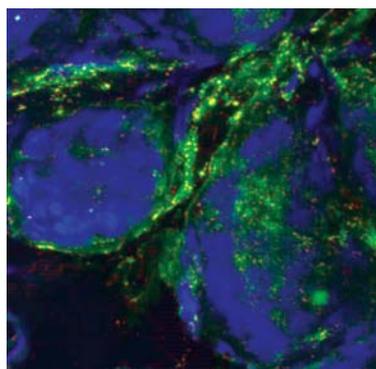


На 14-е сутки после применения перевязочных средств отмечена полная эпителизация 6 (30%) эрозий. Сокращение площади 7 (35%) эрозий составило более 75%. Доля сокращения площади в диапазоне 25–75% наблюдалась в 25% случаев. Отсутствие динамики в 10% случаев обусловлено исходной длительностью существования эрозий (рис. 3).

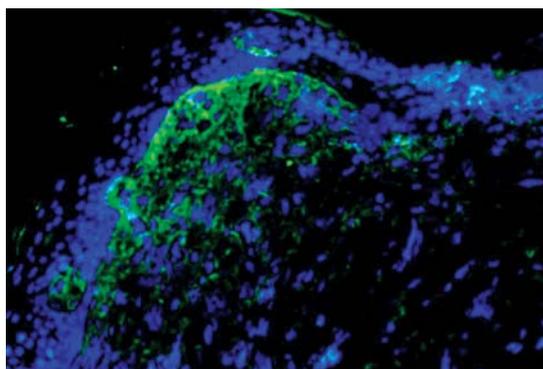
Различия в доле достижения полной эпителизации эрозий при применении ЖЭК (53%) и перевязочных средств (35%) не достигли уровня статистической значимости, наблюдалась незначимая тенденция ( $p = 0,133$ ; точный критерий Фишера).

По результатам иммунофлуоресцентного антигенного картирования в 5 (26%) случаях после проведен-

ной терапии в биоптатах кожи больных наблюдалось формирование почти непрерывной полосы свечения коллагена VII типа, что расценивалось как повышение экспрессии (рис. 4). Сопоставление результатов иммунофлуоресцентного антигенного картирования и клинической эффективности показало, что повышение экспрессии коллагена VII типа сопровождалось клинической эффективностью в виде сокращения площади либо полной эпителизации эрозий в 3 случаях из 5. В оставшихся 2 случаях повышение экспрессии возникло при отсутствии клинического эффекта, что было связано с присоединением вторичной инфекции (рис. 5). Экспрессия коллагена VII типа в области дермо-эпидермального соединения сохранилась на исходном уровне



а



б

Рис. 5. Экспрессия коллагена VII типа в биоптате кожи 20-летнего больного тяжелым рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом до и на 14-е сутки после трансплантации живого эквивалента кожи: а — до лечения в биоптате кожи свечение антител к коллагену VII типа представлено на границе между придатками кожи и дермой в виде прерывистой линии и единичных гранул (увеличение  $\times 600$ ); б — на 14-е сутки после трансплантации живого эквивалента кожи в биоптате свечение антител к коллагену VII типа представлено в виде формирующейся сплошной линии вдоль дермо-эпидермальной границы (увеличение  $\times 200$ )  
Fig. 5. Expression of type VII collagen in skin biopsy material from 20-years-old patient with severe recessive dystrophic bullous epidermolysis before and in 14 days after living skin equivalent transplantation: а — before the treatment the fluorescence of anti-collagen VII antibodies is detected along the borderline between cutaneous appendages and dermal stroma and looks like broken line and single dots (magnification  $\times 600$ ); б — in 14 days after living skin equivalent transplantation the fluorescence of anti-collagen VII antibodies in the biopsy sample from the same person looks like forming solid line along dermal-epidermal junction (magnification  $\times 200$ )

в 3 (16%) случаях, несмотря на клинический эффект в виде полного заживления эрозий. В 11 (58%) случаях после терапии иммуофлюоресцентное антигенное картирование не проводилось в связи с отказом пациентов.

### Обсуждение

Методы и материалы, используемые для разработки тканеинженерных эквивалентов кожи, являются интенсивно развивающейся областью исследований. На небольших выборках (от 1 до 10) пациентов с простым, пограничным и рецессивным дистрофическим БЭ проведены единичные наблюдательные исследования эффективности применения аллогенных комбинированных эквивалентов, созданных на основе коммерчески доступных продуктов, не зарегистрированных в Российской Федерации.

В настоящее время проводятся исследования с применением аутологичных комбинированных тканеинженерных эквивалентов кожи, которые наиболее близки по строению к человеческой коже. Результаты этих исследований могут позволить применять такие эквиваленты у большого числа пациентов. Эффективность тканеинженерных эквивалентов кожи различается у пациентов с врожденным БЭ, что, вероятно, обусловлено молекулярной гетерогенностью его различных типов [6]. В случае рецессивного дистрофического БЭ комбинированные/послойные эквиваленты, содержащие как фибробласты, так и кератиноциты, могут быть более эффективными.

Композитный продукт Apligraf® (Organogenesis, США) разработан как аллогенный трансплантат, состоящий из эпидермального слоя неонатальных кератиноцитов и подлежащего дермального слоя, который содержит неонатальные фибробласты, внедренные в гель, состоящий из бычьего коллагена I типа, и в Российской Федерации не зарегистрирован. В проведенных исследованиях у больных с различными типами врожденного БЭ (простой, пограничный и рецессивный дистрофический) зарегистрирован хороший терапевтический эффект в виде частичной эпителизации 44% хронических эрозивно-язвенных дефектов через 12 недель после трансплантации и полная эпителизация — только у 2 (22%) из них через 18 недель [9, 10].

Отмечены частичная эпителизация на лице пациента через 1 год и устранение подмышечной контрактуры после трех трансплантаций сетчатой формы эквивалента Apligraf [11]. Полнослойные эквиваленты наиболее эффективны у больных с рецессивным дистрофическим БЭ, несмотря на то, что клинические результаты продемонстрировали краткосрочный эффект.

Полученные в нашем исследовании результаты применения ЖЭК продемонстрировали клиническую эффективность, не достигшую, однако, уровня статистической значимости в сравнении с применением неадекватных перевязочных средств (наблюдалась только незначимая тенденция, что связано с малым размером выборки). Необходимы дальнейшие исследования с увеличением числа пациентов.

В соответствии с п. 1 ст. 2 Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» биомедицинский клеточный продукт — это комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения, и/или фармацевтическими субстанциями, включенными в государственный реестр лекарственных средств, и/или медицинскими изделиями. Согласно проекту федерального закона «О внесении изменений в статью 4 Федерального закона “Об обращении лекарственных средств” и Федеральный закон “О биомедицинских клеточных продуктах”», вынесенному Правительством РФ на рассмотрение Государственной Думой Федерального Собрания РФ 1 февраля 2023 г., п. 6<sup>2</sup> ст. 4 Федерального закона от 12 октября 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» дополняется словами «лекарственные препараты на основе соматических клеток».

На данный момент в Российской Федерации не зарегистрированы лекарственные препараты на основе соматических клеток для лечения эрозивных дефектов кожи, а имеющиеся в разработке представляют собой пленки с нанесенными на них клетками.

### Заключение

Применение ЖЭК, содержащего аллогенные кератиноциты и фибробласты, представляет собой перспективный метод терапии, который может способствовать восстановлению продукции структурных белков эпидермиса и дермо-эпидермального соединения и ускорению эпителизации эрозивно-язвенных дефектов. Разработка новой тканеинженерной конструкции на основе матрикса, который позволил бы инкорпорировать мезенхимные клетки в трехмерном пространстве и одновременно нанести эпителиальные клетки на его поверхность, обеспечивая при этом высокую жизнеспособность и функциональную активность обоих клеточных типов, позволит повысить клиническую эффективность терапии. ■

## Литература/References

1. Natsuga K, Shinkuma S, Hsu CK, Fujita Y, Ishiko A, Tamai K, et al. Current topics in epidermolysis bullosa: pathophysiology and therapeutic challenges. *J Dermatol Sci.* 2021;104(3):164–76. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.11.004
2. Hou PC, Wang HT, Abhee S, Tu WT, McGrath JA, Hsu CK. Investigational treatments for epidermolysis bullosa. *Am J Clin Dermatol.* 2021;22(6):801–817. doi: 10.1007/s40257-021-00626-3
3. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, et al. The classification of in-herited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on DIAGNOSIS and classification of EB. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(6):931–950. doi: 10.1016/j.jaad.2008.02.004
4. Bardhan A, Bruckner-Tuderman L, Chapple ILC, Fine JD, HarperN, Has C, et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):78. doi: 10.1038/s41572-020-0210-0

5. 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. doi: 10.5582/irdr.2017.01005

6. Alex du Rand A, Hunt JMT, Feisst V, Sheppard HM. Epidermolysis bullosa: a review of the tissue-engineered skin substitutes used to treat wounds. *Mol Diagn Ther.* 2022;26(6):627–643. doi: 10.1007/s40291-022-00613-2

7. Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Ikeda S, Ogawa H, Kubo K, et al. Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for the treatment of intractable skin ulcers in 3 patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50(5):803–804. doi: 10.1016/j.jaad.2003.08.013

8. Supp DM, Hahn JM, Combs KA, McFarland KL, Powell HM. Isolation and feeder-free primary culture of four cell types from

a single human skin sample. *STAR Protoc.* 2022;3(1):101172. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101172

9. Falabella AF, Valencia IC, Eaglstein WH, Schachner LA. Tissue-engineered skin (Apligraf) in the healing of patients with epidermolysis bullosa wounds. *Arch Dermatol.* 2000;136(10):1225–1230. doi: 10.1001/archderm.136.10.1225

10. Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC, Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol.* 1999;135(10):1219–1222. doi: 10.1001/archderm.135.10.1219

11. Ozerdem OR, Wolfe SA, Marshall D. Use of skin substitutes in pediatric patients. *J Craniofac Surg.* 2003;14(4):517–520. doi: 10.1097/00001665-200307000-00023

**Участие авторов:** все авторы несут ответственность за содержание и целостность всей статьи. Концепция и дизайн исследования — А.А. Кубанов; сбор и обработка материала, написание текста — Е.С. Мончаковская, О.С. Роговая, В.В. Чикин, М.А. Нефедова; написание текста — А.Э. Карамова; редактирование — Е.А. Воротеляк.

**Authors' participation:** all authors: approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article. Concept and design of the study — Alexey A. Kubanov; collection and processing of material, text writing — Ekaterina S. Monchakovskaya, Olga S. Rogovaya, Vadim V. Chikin, Mariya A. Nefedova; text writing — Arfenya E. Karamova; editing — Ekaterina A. Vorotelyak.

## Информация об авторах

**\*Карамова Арфеня Эдуардовна** — к.м.н., доцент; адрес: Россия, 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>; eLibrary SPIN: 3604-6491; e-mail: [karamova@cnikvi.ru](mailto:karamova@cnikvi.ru)

**Кубанов Алексей Алексеевич** — д.м.н., профессор, академик РАН; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: [alex@cnikvi.ru](mailto:alex@cnikvi.ru)

**Воротеляк Екатерина Андреевна** — д.б.н., член-корреспондент РАН; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5405-0212>; eLibrary SPIN: 2310-9118; e-mail: [vorotelyak@yandex.ru](mailto:vorotelyak@yandex.ru)

**Роговая Ольга Сергеевна** — к.б.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-9372>; eLibrary SPIN: 1441-8532; e-mail: [rogovaya26f@gmail.com](mailto:rogovaya26f@gmail.com)

**Чикин Вадим Викторович** — д.м.н., старший научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9688-2727>; eLibrary SPIN: 3385-4723; e-mail: [chikin@cnikvi.ru](mailto:chikin@cnikvi.ru)

**Нефедова Мария Андреевна** — младший научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1141-9352>; e-mail: [nefedova.maria.arb@gmail.com](mailto:nefedova.maria.arb@gmail.com)

**Мончаковская Екатерина Сергеевна** — младший научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6402-0962>; eLibrary SPIN: 9859-1912; e-mail: [monchakovskaya@cnikvi.ru](mailto:monchakovskaya@cnikvi.ru)

## Information about the authors

**\*Arfenya E. Karamova** — MD, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor; address: 3 bldg 6 Korolenko street, 107076 Moscow, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>; eLibrary SPIN: 3604-6491; e-mail: [karamova@cnikvi.ru](mailto:karamova@cnikvi.ru)

**Alexey A. Kubanov** — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: [alex@cnikvi.ru](mailto:alex@cnikvi.ru)

**Ekaterina A. Vorotelyak** — Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5405-0212>; eLibrary SPIN: 2310-9118; e-mail: [vorotelyak@yandex.ru](mailto:vorotelyak@yandex.ru)

**Olga S. Rogovaya** — Cand. Sci. (Biol.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-9372>; eLibrary SPIN: 1441-8532; e-mail: [Rogovaya26f@gmail.com](mailto:Rogovaya26f@gmail.com)

**Vadim V. Chikin** — MD, Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9688-2727>; eLibrary SPIN: 3385-4723; e-mail: [chikin@cnikvi.ru](mailto:chikin@cnikvi.ru)

**Mariya A. Nefedova** — Junior Research Associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1141-9352>; e-mail: [nefedova.maria.arb@gmail.com](mailto:nefedova.maria.arb@gmail.com)

**Ekaterina S. Monchakovskaya** — Junior Research Associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6402-0962>; eLibrary SPIN: 9859-1912; e-mail: [monchakovskaya@cnikvi.ru](mailto:monchakovskaya@cnikvi.ru)

Статья поступила в редакцию: 09.10.2023

Принята к публикации: 14.11.2023

Опубликована онлайн: 18.12.2023

Submitted: 09.10.2023

Accepted: 14.11.2023

Published online: 18.12.2023