

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Красноярский государственный меди-
цинский университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра госпитальной терапии и иммунологии с курсом ПО

Реферат

**На тему : «Применение JAK – 1 препаратов в терапии
воспалительных заболеваний кишечника»**

Выполнила: ординатор 2 года
Казмерчук Ольга Витальевна

Проверила: к.м.н., доц.
Мамаева Марина Геннадьевна

2022г

Оглавление

Актуальность	2
Патогенез болезни Крона	4
Патогенез язвенного колита	6
Особенности влияния JAK1- ингибиторов на воспалительный процесс	9
Схема патогенетического влияния Янус – киназ.	10
Заключение:	12
Список литературы	13

Актуальность

Кишечник – важная составляющая иммунной системы, которая распознает и реагирует на внешние раздражители, а так же микроорганизмы в его просвете. Это взаимодействие строго регулируется и позволяет синантропным бактериям нормального микробиома существовать без индукции воспаления слизистой оболочки, которая находится в режиме «управляемого» воспаления, что регулируется тонким балансом Т- хелперов 1, 17, 2, 3 и 9 типов, а также Т-reg.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) рассматриваются как многофакторные заболевания с комбинацией экологических и генетических факторов, вызывающих неадекватный иммунный ответ слизистой оболочки на синантропные микроорганизмы, что приводит к спонтанному выходу провоспалительных цитокинов. Это вызывает или усугубляет нарушение целостности кишечного барьера и изменяет регулирование адаптивных иммунных реакций с гиперпродукцией деструктивных провоспалительных медиаторов, в первую очередь это касается фактора некроза опухоли α (ФНО- α), интерферона γ (ИФН- γ), интерлейкина-1 (ИЛ-1), -5, 6-, -12, -17, -18, -21, -23, -27 и др., при этом с относительной редукцией концентрации противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, -10, -13, -19, -22) [1-2].

На данный момент структура ВЗК представлена двумя нозологическими единицами, различающимися по локализации, клинико-эндоскопической и гистологической картине: болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК) [3]. БК характеризуется неспецифическим гранулематозным трансмуральным воспалением с сегментарным поражением любого отдела ЖКТ, однако преимущественной локализацией патологического процесса является дистальный отдел тонкой кишки и проксимальный отдел толстой кишки. В свою очередь, при ЯК поражается исключительно слизистая оболочка толстой кишки, за исключением ретроградного илеита [4].

Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что заболеваемость и распространенность ВЗК характеризуется перманентной тенденцией к росту, особенно четко прослеживающейся в странах Западной Европы и Северной Америки [5]. В этих регионах распространенность БК и ЯК составляет от 76 до 335 случаев на 100000 населения, а ежегодная заболеваемость – от 4,7 до 18,7 случая на 100 000 населения [6]. Не стоит забывать о колоссальной значимости ВЗК в связи с тем, что в большинстве случаев поражаются социально активные люди трудоспособного возраста. Так, средний возраст манифестации БК составляет 15–30 лет, а ЯК – 25–40 лет [7]. Помимо этого, несмотря на относительно небольшую распространенность по сравнению с другими заболеваниями ЖКТ, ВЗК традиционно занимают лидирующие позиции в структуре летальности и инвалидизации пациентов. Главной целью лечения ВЗК является индукция и поддержание ремиссии, а также улучшение качества жизни пациентов. В настоящее время в рутинной клинической практике для консервативного лечения ВЗК используются различные группы препаратов: системные и топические глюкокортикостероиды, препараты 5-аминосалициловой кислоты, иммуносупрессоры, тиопурины, антимаболиты. Тем не менее данные конвенционные методики лечения ВЗК трудно назвать высокоэффективными. Согласно некоторым данным, при их применении достижение стойкой ремиссии наблюдается у менее чем 50% пациентов.

Патогенез болезни Крона

Этиология и патогенез болезни Крона (БК) еще во многом неясны. Наиболее ранние теории говорят об этиологической роли талька, попадающего с хирургических перчаток в брюшную полость и способствующего образованию гранулем, а также о травме живота как первопричине возникновения болезни Крона. Однако эти теории довольно уязвимы для критики. С одной стороны, не во всех случаях больные БК ранее перенесли какие-либо операции или травму живота, с другой — заболевание может протекать изолированно, вне кишечника [8]. Конечный отрезок подвздошной кишки, примыкающий к баугиниевой заслонке, подвергается воспалительным изменениям чаще других отделов тонкой кишки. Это дает основание предполагать, что основными этиологическими факторами в развитии илеита выступают, с одной стороны, нервно-сосудистые расстройства в илеоцекальном отделе кишечника, с другой — развитие гранулематозного лимфангита в связи с закупоркой лимфатических путей. Возможно, первопричиной илеита являются длительные хронические процессы в слепой кишке, вследствие чего в слизистой терминального отрезка подвздошной кишки в связи с застоем в лимфатических сосудах, воспалительными явлениями происходит оседание мелких инородных тел из кишечного содержимого, что приводит к травматизации слизистой и воспалительным процессам. Возможно, имеет место закупорка лимфатических сосудов жирными кислотами в результате интоксикации с последующим неспецифическим воспалением кишечной стенки. Все это приводит к длительному стазу содержимого кишечника в терминальном отрезке подвздошной кишки и способствует внедрению инородных тел и жирных кислот в уже захваченные воспалительным процессом лимфатические сосуды ближайшего участка тонкой кишки. В патогенезе терминального илеита играет роль внедрение в слизистую оболочку мелких инородных тел, которые являются основной причиной развития грануляционного процесса, ведущего к изъязвлению, склерозу и сужению просвета кишечника [9].

В предрасположенности к БК имеют значение и генетически детерминированные дефекты барьерной функции кишечного эпителия, облегчающие проникновение бактериальных антигенов. Ген, ответственный за восприимчивость к БК, с помощью внутриклеточного белка NOD2/CARD15 реагирует на присутствие бактериальных антигенов. Бактериальные антигены вызывают иммунный ответ Т-лимфоцитов CD4+. Активируются цитокины α -ФНО, интерферон- γ , интерлейкин-4, 13, 23, 27 и 3, инициирующие воспалительный процесс. Определенное значение в патогенезе БК придают факторам окружающей среды. Рост заболеваемости БК в индустриальных странах мира уже давно и не без оснований связывают с загрязнением окружающей среды, воды и воздуха, ранним переводом грудных детей на искусственное вскармливание, увеличенным потреблением углеводов, животного и молочного белка, увеличенным соотношением ω -6 и ω -3 полиненасыщенных жирных кислот в пище. Люди, употребляющие преимущественно белки растительного происхождения, реже болеют БК. Риск развития БК увеличивают курение и гормональная контрацепция, а также чрезмерно тщательное соблюдение личной гигиены, снижающее активность Т-хелперов 2-го типа, обеспечивающих защиту от инфекций и увеличивающее риск развития ВЗК.

Патогенез язвенного колита

В патогенезе заболевания предполагается значение изменений иммунологической реактивности, дисбиотических сдвигов, аллергических реакций, генетических факторов, нервно-психических нарушений. Существует генетическая предрасположенность к ЯК (семейные случаи язвенного колита) и связь ЯК с антигенами комплекса гистосовместимости HLA. Среди ближайших родственников ЯК встречается в 15 раз чаще, чем в общей популяции [10].

Согласно результатам исследования, проведенного в Государственном университете медицины и фармации в Кишиневе, факторами риска часто рецидивирующего течения являются возраст в начале заболевания моложе 30 лет, статус

некурильщика, тяжелая степень активности дебюта, наличие осложнений и внекишечных проявлений, длительность заболевания до назначения специфической терапии более 6 мес., неадекватность лечения в дебюте заболевания, длительность до ремиссии более 6 мес. и короткая продолжительность поддерживающей терапии. При наличии этих факторов в совокупности вероятность часто рецидивирующего течения составляет 75,8%. Не было выявлено связи демографических, социальных, гигиенических факторов, особенностей анамнеза жизни и сопутствующих заболеваний с тем или иным вариантом течения язвенного колита [11]. Таким образом, наиболее значимые факторы риска — длительный период до назначения специфической терапии, характер лечения в дебюте заболевания, длительность до ремиссии, являются модифицируемыми факторами, что при адекватной и своевременной терапии позволяет улучшить прогноз заболевания. После выявления воспалительных заболеваний кишечника около ста лет назад были предложены многочисленные гипотезы в качестве возможных механизмов развития, которые включают: инфекции, токсические вещества, психогенные нарушения, недостаток питания, аллергия на пыльцу или продукты, травмы живота, нарушение сосудистой или лимфатической циркуляции, лизоцимы и другие ферменты, избыток или недостаток иммунного ответа в связи с уменьшением воздействия бактерий или глистов. Большинство из них были признаны недействительными и забыты. На сегодня полное связное объяснение механизма развития ВЗК по-прежнему отсутствует, но люди начинают понимать, что патогенез ВЗК включает четыре основных компонента: окружающую среду, микрофлору кишечника, состояние иммунной системы и генетический компонент. В настоящее время доминирующей теорией, объясняющей увеличение частоты ВЗК (а также других аутоиммунных и аллергических заболеваний) в современном обществе, является «гигиеническая гипотеза», которая предполагает, что эти заболевания вызваны аномальным развитием и реакцией иммунной системы в результате уменьшенного воздействия микроорганизмов, таких как кишечные микроорганизмы. Однако эта

теория пренебрегает другим фактом — повышенной кишечной проницаемостью, которая наблюдается не только у этих больных и их здоровых родственников, но и у супругов, предполагая вероятные условия для этих заболеваний. Кишечник содержит бактерий в количестве, в десять раз превосходящем количество клеток нашего организма, которое может убить хозяина тысячи раз. Считается, что уровень риска определяется проницаемостью кишечника и абсолютным числом бактерий в его просвете. Таким образом, усиленный иммунный ответ у этих пациентов может быть просто нормальным ответом на увеличение проникновения бактериальных и пищевых компонентов из просвета кишечника. Тогда стоит выявить причину увеличения проницаемости кишечной стенки. (Здесь предлагается механизм повышенной кишечной проницаемости, а также ВЗК, гипотеза: бактерии — протеазы — слизь — барьер.) Эта гипотеза предполагает, что повышенное потребление пищевых химических веществ, таких как сахарин, сукралоза, вызывает значительное снижение количества кишечных бактерий наряду с недостаточностью для оперативного пополнения вследствие улучшения гигиены в современном обществе. Что приводит к заметному снижению β -глюкуронидазы в просвете кишечника, а это, в свою очередь, к нарушению деконъюгации желчного билирубина и последующей инактивации пищеварительных протеаз. Затем эти плохо инактивированные протеазы работают синергически с гликозидами из оставшихся бактерий и вызывают ускоренную деградацию слоя слизи, что вызывает повреждение кишечного барьера (гипотеза: бактерии — протеазы — слизь — барьер). Это в дальнейшем способствует проникновению бактерий и их компонентов (в основном, в толстой кишке) и увеличению числа нейтрофилов, что приводит к образованию абсцессов крипт — характерное изменение. В то время как в местах или ситуациях относительно стерильных увеличивается проникновение антигенов и частиц из просвета кишечника, которые могут привести к накоплению макрофагов и формированию воспалительных гранулем (отличительная черта бо-

лезни Крона). Это дополнительно индуцирует усиленный иммунный ответ организма, что вызывает дальнейшее повреждение кишечника, а также внекишечные проявления в суставах, коже, глазах, во рту и т. д. [12].

Факторами вовлечения в патофизиологию язвенного колита являются: ненормальный иммунный ответ, дефект в кишечном эпителии, выполняющем барьерную функцию, и микрофлоры кишечника. В настоящее время неясно, является ли конкретный бактериальный штамм ответственным за индукцию воспаления кишечника, но увеличенные в результате бактериальной инвазии ткани были описаны у пациентов с язвенным колитом. Кроме того, количественный и качественный дисбаланс микрофлоры при язвенном колите, определяемый как дисбактериоз, характеризуется увеличением *Rhodococcus* spp., *Shigella* spp. и *Escherichia* spp., но снижением в определенных случаях *Bacteroides* spp. Более того, *Campylobacter* spp., *Enterobacteriaceae* и *Helicobacter* были наиболее распространены в образцах ткани, взятых у пациентов с язвенным колитом, и подвергались молекулярным методам обнаружения. Кроме того, серологическое тестирование выявило *Fusobacterium varium* как потенциальный источник воспаления кишечника при язвенном колите. Интересно, что на месте исследования по гибридизации *Lactobacillus* spp. и *Pediosoccus* spp. проявили противовоспалительное действие, но отсутствовали в образцах тканей, взятых у больных язвенным колитом. Следовательно, дисбактериоз является одним из факторов в патогенезе ЯК.

Особенности влияния JAK1-ингибиторов на воспалительный процесс

В спектре медиаторов воспаления при ВЗК особое место занимает ФНО- α , который обладает мощной «провоспалительной» и деструктивной активностью и индуцирует транскрипцию генов других «провоспалительных» медиаторов. Поэтому мАТ к ФНО- α (инфликсимаб, адалимумаб) зарекомендовали себе как высокоэффективные препараты (индукция и поддержание ремиссии) для лечения кишечных и внекишечных осложнений ВЗК. Однако у трети пациентов с ВЗК

ингибиторы ФНО- α недостаточно эффективны, а у 30–50% первичных «ответчиков» в дальнейшем развивается вторичная резистентность к терапии. Применение другого препарата – МАТ к $\alpha 4\beta 7$ интегрина (ведолизумаб), несмотря на высокую эффективность в отношении поражения кишечника, имеет потенциальные ограничения, связанные с отсутствием влияния на системные (внекишечные) проявления заболевания. Кроме того, у пациентов с ВЗК, резистентных к ингибиторам ФНО- α , лечение ведолизумабом эффективно менее чем у половины пациентов [13]. Необходимо принимать во внимание иммуногенность МАТ, которая приводит к снижению эффективности терапии и увеличению риска нежелательных лекарственных реакций (НЛР), а также парентеральный путь введения препаратов (внутривенный или подкожный), ухудшающий приверженность лечению. Все это вместе взятое послужило мощным стимулом к разработке новых подходов к фармакотерапии ВЗК, один из которых связан с использованием низкомолекулярных химически синтезированных препаратов (так называемые малые молекулы), ингибирующих Janus-киназы (JAK), с успехом использующихся (или завершающих клинические испытания) для лечения широкого спектра ИВЗ, таких как ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, алопеция, витилиго, атопический дерматит, а в последнее время и ВЗК. Сигнальный путь JAK-STAT (signal transducer and activator of transcription) регулирует эффекты более 50 цитокинов, интерферонов, факторов роста и является ключевым компонентом регуляции иммунитета и гемопоэза [14]. Основными компонентами этого сигнального пути, наряду с клеточными рецепторами, являются 4 JAK (JAK-1, JAK-2, JAK-3 и TYK-2), 7 молекул STAT, три молекулы PTP (protein tyrosine phosphatase), 4 молекулы PIAS (protein inhibitors of activated STATs) и 8 молекул SOCS (suppressors of cytokine signaling). Напомним, что JAK представляют собой внутриклеточные тирозинкиназы, тесно связанные с каталитическими клеточными рецепторами цитокинов I и некоторых гормонов (эритропоэтин, тромбопоэтин, гормон роста, пролактин, лептин), которые в зависимости от структуры подразделяются на рецепторы класса I и II.

Взаимодействие цитокинов с рецепторами вызывает димеризацию соответствующих лиганд-специфических рецепторных цепей и способствует связыванию JAK с внутриклеточным доменом каждой субъединицы рецепторов, что приводит к изменению их конформации и индуцирует активацию JAK .

Схема патогенетического влияния Янус – киназ.

Активированная JAK подвергается ауто-и трансфосфорилированию и, в свою очередь, вызывает фосфорилирование рецепторной субъединицы, которая формирует «стыковочный» (docking) участок для связывания со STAT. На следующем этапе каскада сигнализации STAT, связываясь с рецепторами, дополнительно фосфорилируется JAK, что приводит к изменению ее молекулярной конформации и димеризации. Затем димер STAT отделяется (dissociation) от рецепторов и транслоцируется в ядро клеток, реализуя свои функции как фактора транскрипции, а именно – регулируя экспрессию генов посредством соответствующих ДНК-связывающих доменов. Гены-мишени для STAT включают большое число генов «раннего ответа», а также негативные регуляторы JAK-STAT, обеспечивающие механизмы «обратной связи», которые предотвращают неконтролируемую цитокин-опосредованную активацию клеток. В зависимости от геномной архитектоники и структуры белка, рецепторы-цитокнины класса I классифицируются на цитокины с короткими цепями и с длинными цепями. Рецепторы типа I с короткими цепями разделяются на две группы: содержащие γ -цепь и рецепторы ИЛ-4-подобных цитокинов. При этом ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15, ИЛ-21 и тимусный стромальный лимфопоэтин связываются с гетеродимерными или гетеротримерными рецепторами, содержащими γ -цепь, которая ассоциируется с JAK-3. Другие рецепторные субъединицы, специфичные для каждого цитокина этой группы, ассоциируются с JAK-1. ИЛ-4-подобные цитокины, включающие ИЛ-4 и ИЛ-13, связываются с рецепторами, имеющими общую субъединицу ИЛ-4R α , ИЛ-3, ИЛ-5 и ГМ-КСФ – β -цепь. β -Цепь и другие

субъединицы гетеродимерных рецепторов ИЛ-3, ИЛ-5, ГМ-КСФ также ассоциируются с JAK-2. Гетеродимерные рецепторы гормонов, ассоциируются только с JAK-2. Класс рецепторов цитокинов типа I с длинными цепями включает ИЛ-6-подобные цитокины и ИЛ-12-подобные цитокины. ИЛ-6-подобные цитокины представляют собой мономеры и включают ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-31, Г-КСФ, цилиарный нейротрофический фактор, лейкоимический ингибиторный фактор, онкостатин М и тимусный стромальный лимфопоэтин. Эти цитокины (за исключением ИЛ-31) связываются с гетеродимерными или гетеротримерными рецепторами, имеющими общую субъединицу gp130, которая ассоциируется с JAK-1, JAK-2 и TYK-2. ИЛ-12-подобные цитокины являются гетеродимерными белками, к которым относятся ИЛ-12, ИЛ-23, а также ИЛ-27 и ИЛ-35. Рецепторы ИЛ-12 и ИЛ-23 – гетеродимеры и состоят из субъединиц ИЛ-12R β 1 и ИЛ-12R β 2 или субъединицы ИЛ-23R, соответственно, которые ассоциируются с JAK-2. Цитокины класса II включают ИЛ-10-подобные цитокины, и цитокины группы ИФН и ИЛ-28. ИЛ-10-подобные цитокины включают ИЛ-10, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-22, ИЛ-24, ИЛ-26 и связываются с JAK-1, JAK-2 и TYK-2. Рецепторные субъединицы ИФН типа I ассоциируются с JAK-1 и TYK-2. Таким образом, рецепторы различных цитокинов ассоциируются с различными комбинациями JAK, и, в свою очередь, различные JAK активируют различные типы STAT. При этом необходимо принимать во внимание, что многие рецепторы ассоциируются с несколькими STAT, поэтому активация сигнализации JAK-STAT под действием различных цитокинов частично перекрещивается. В упрощенном виде взаимодействие между цитокинами, рецепторами и сигнальными путями JAK-STAT можно представить следующим образом: STAT-1 участвует в сигнализации типа I ИФН, STAT-3 – ИЛ-6- и ИЛ-10-подобных цитокинов, STAT-4 и STAT-5 – ИЛ-12- и ИЛ-2-подобных цитокинов, а STAT-6 – только сигналов, индуцированных ИЛ-4 и ИЛ-13. Вероятно, все STAT участвуют в сигнализации ИЛ-27- и ИЛ-28-подобных цитокинов. Кроме того, STAT-1 участвует в сигнализации ИЛ-6-подобных цитокинов и ИЛ-35, а STAT3 – ИЛ-2 и ИЛ-23. STAT-4 играет важную роль в сигнализации ИФН типа I, а STAT-1 и STAT-5 вносят

вклад в сигнализацию, опосредованную ИЛ-10 и ИЛ-22. Следует подчеркнуть, что, хотя эффекты нескольких важных «провоспалительных» цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-1 α/β и ИЛ-17, не регулируются JAK-STAT, их конечные биологические эффекты могут напрямую (или опосредованно) быть связаны с цитокинами сигнального пути JAK-STAT, как на молекулярном уровне (взаимодействие JAK-STAT с другими факторами транскрипции), так и на клеточном уровне в рамках «цитокиновой сети».

Заключение:

Терапия ингибиторами JAK-1 представляет собой новую перспективную альтернативу в лечении воспалительных заболеваний кишечника.

Исследования показывают, что применение JAK-ингибиторов приводит к более длительному достижению ремиссии, даже у пациентов с длительным анамнезом, частыми обострениями и выявленной стероидорезистентностью..

Необходимы дальнейшие исследования для изучения долгосрочной эффективности и безопасности данных препаратов в реальной клинической практике.

Список литературы

1. Monteleone G., Boirivant M., Pallone F., MacDonald T.T. TGF- β 1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal. Immunol.* 2008;1(1):50–3.
2. Roggenbuck D., Reinhold D., Wex T., Goihl A., von Arnim U., Malfertheiner P., Büttner T., Porstmann T., Porstmann S., Liedvogel B., Bogdanos D.P., Laass M.W., Conrad K. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta.* 2011;412(9–10):718–24.
3. Руководство по внутренней медицине. Под ред. Г.П. Арутюнова, А.И. Мартынова, А.А. Спасского. М. 2015. Guide on Internal Medicine. Edited by Arutyunova GP, Martynova AI, Spassky AA. М., 2015.
4. Маев И.В., Андреев Д.Н., Дичева Д.Т., Великанов Е.В. Болезнь Крона: этиопатогенез, диагностика и консервативное лечение. М., 2016. /Maev IV, Andreev DN, Dicheva DT, Velikanov EV. Crohn's disease: etiopathogenesis, diagnosis and conservative treatment. М., 2016
5. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(8): 942-51.
6. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 2017 Oct 13.
7. Ye Y, Pang Z, Chen W, et al. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(12): 22529-42
8. Князев О.В., Парфенов А.И., Ручкина И.Н. и др. Новые возможности преодоления вторичной неэффективности антицитокиновой терапии у больных воспалительными заболеваниями кишечника. *Тер арх* 2013; 2: 57—60.

9. Neurath M.F., Travis S.P.L. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* 2012; 61 (11): 1619— 1635.
10. Ивашкин В. Т., Лапина Т. Л. Гастроэнтерология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР Медиа, 2008. 704 с. (Серия «Национальные руководства».) С. 460–490.
11. Цуркан С. И. Факторы риска часто рецидивирующего язвенного колита // *Казанский медицинский журнал*. 2013. Т. 94, № 1. С. 128–130.
12. Xiaofa Qin. Etiology of inflammatory bowel disease: A unified hypothesis // *World J. Gastroenterol*. 2012. Vol. 18, N15. P. 1708–1722.
13. Vermeire S, Gils A, Accossato P, Lula S, Marren A. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan 21;11:1756283X17750355. doi: 10.1177/1756283X177
14. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O’Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Dec;16(12):843-62. doi: 10.1038/nrd.2017.201. Epub 2017 Nov 6.