



Том № 1

1

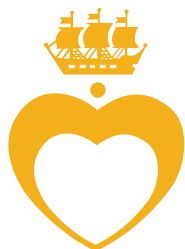
2021

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович





Том № 1

| 1

| 2021

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович

ОСНОВНЫЕ ТЕМАТИКИ (РУБРИКИ)

- Генетические риски и причины заболеваний
- Эпигенетика
- Биомаркеры болезни и здоровья
- Микробиота и антимикробная терапия
- Таргетная терапия заболеваний
- Фармакогенетика и фармакогеномика
- Генная терапия и технологии редактирования генома
- Искусственный интеллект и машинное обучение как инструмент персонализированной медицины



ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: Шлякто Е. В.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: Конради А.О.

ОТВ. СЕКРЕТАРЬ: Пospelова М.Л.

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

Бабенко А. Ю. (Санкт-Петербург)
Бухановский А. В. (Санкт-Петербург)
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)
Васин А. В. (Санкт-Петербург)
Васичкина Е. С. (Санкт-Петербург)
Дмитриев А. В. (Санкт-Петербург)
Ильин И. В. (Санкт-Петербург)
Каприн А. Д. (Москва)
Копылов Ф. Ю. (Москва)
Максимов А. С. (Санкт-Петербург)
Мокрышева Н. Г. (Москва)
Омельяновский В. В. (Москва)
Пармон Е. В. (Санкт-Петербург)
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)
Секачева М. И. (Москва)
Созинов А. С. (Казань)
Стародубова А. В. (Москва)
Суворов А. Н. (Санкт-Петербург)
Сычев Д. А. (Москва)
Филаретова Л. П. (Санкт-Петербург)
Хатьков И. Е. (Москва)
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)
Шелудько В. Н. (Санкт-Петербург)
Jeroen J. Vax (Нидерланды)
Roberto Ferrari (Италия)
Michel Komajda (Франция)
Gilbert Massard (Люксембург)
Fausto J. Pinto (Португалия)
Panos Vardas (Греция)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Alberico Catapano (Италия)
Giuseppe Faggian (Италия)
Luigi Fontana (Австралия)
Omry Koren (Израиль)
Béla Merkely (Венгрия)
Mark Pitkin (США)
Noam Shomron (Израиль)
Petr Widimský (Чешская республика)
Гринева Е. Н. (Санкт-Петербург)
Дячук В. А. (Санкт-Петербург)
Закьян С. М. (Новосибирск)
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)
Костик М. М. (Санкт-Петербург)
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)
Моисеенко В. М. (Санкт-Петербург)
Первунина Т. М. (Санкт-Петербург)
Попова П. В. (Санкт-Петербург)
Пospelова М. Л. (Санкт-Петербург)
Софронов Г. А. (Санкт-Петербург)
Ткачук В. А. (Москва)
Ульрих Е. А. (Санкт-Петербург)
Успенский В. Е. (Санкт-Петербург)
Чехонин В. П. (Москва)
Школьникова М. А. (Москва)
Янишевский С. Н. (Санкт-Петербург)

18+

Журнал зарегистрирован в Государственном
комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-80730
от 29 марта 2021 г.

Периодичность – 6 выпусков в год.
Тираж – 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка – Попова Л. П.
Корректурa – Попова А. А.

Издатель: «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург,
ул. Аккуратова, д. 2
Телефон издательства: + 7 (812) 702-37-16

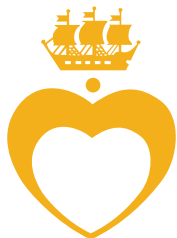
Подача рукописей и переписка с авторами,
размещение рекламы и подписка –
e-mail: pm@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»:
подписной индекс 79638

Архив номеров: [http://www.almazovcentre.ru/
?page_id=78357](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357)

Все права защищены. © 2021.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных в журнале,
допускается только с письменного
разрешения редакции.
Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.



Federal State Budgetary Institution
“Almazov National Medical Research Centre”
of the Ministry of Health of the Russian Federation

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

CHIEF EDITOR: Prof. Evgeny Shlyakhto

DEPUTY CHIEF EDITOR: Alexandra Konradi

EXECUTIVE SECRETARY: Maria Pospelova

EDITORIAL BOARD

A. Yu. Babenko (St. Petersburg)
A. V. Bukhanovsky (St. Petersburg)
A. V. Dmitriev (St. Petersburg)
L. P. Filaretova (St. Petersburg)
I. V. Ilyin (St. Petersburg)
A. D. Kaprin (Moscow)
I. E. Khatkov (Moscow)
F. Yu. Kopylov (Moscow)
A. S. Maksimov (St. Petersburg)
N. G. Mokrysheva (Moscow)
V. V. Omelyanovskiy (Moscow)
E. V. Parmon (St. Petersburg)
K. A. Samochernykh (St. Petersburg)
M. I. Sekacheva (Moscow)
V. N. Sheludko (St. Petersburg)
M. A. Shevtsov (St. Petersburg)
A. S. Sozinov (Kazan)
A. V. Starodubova (Moscow)
A. N. Suvorov (St. Petersburg)
D. A. Sychev (Moscow)
E. S. Vasichkina (St. Petersburg)
A. V. Vasin (St. Petersburg)
T. M. Vavilova (St. Petersburg)
Jeroen J. Bax (Netherlands)
Roberto Ferrari (Italy)
Michel Komajda (France)
Gilbert Massard (Luxembourg)
Fausto J. Pinto (Portugal)
Panos Vardas (Greece)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Alberico Catapano (Italy)
Giuseppe Faggian (Italy)
Luigi Fontana (Austria)
Omry Koren (Israel)
Béla Merkely (Hungary)
Mark Pitkin (USA)
Noam Shomron (Israel)
Petr Widimský (Czech Republic)
V. P. Chekhonin (Moscow)
V. A. Dyachuk (St. Petersburg)
E. N. Grineva (St. Petersburg)
A. A. Kostareva (St. Petersburg)
M. M. Kostik (St. Petersburg)
A. B. Malashicheva (St. Petersburg)
O. M. Moiseeva (St. Petersburg)
V. M. Moiseenko (St. Petersburg)
T. M. Pervunina (St. Petersburg)
P. V. Popova (St. Petersburg)
M. L. Pospelova (St. Petersburg)
M. A. Shkolnikova (Moscow)
G. A. Sofronov (St. Petersburg)
V. A. Tkachuk (Moscow)
E. A. Ulrikh (St. Petersburg)
V. E. Uspensky (St. Petersburg)
S. N. Yanishevsky (St. Petersburg)
S. M. Zakiyan (Novosibirsk)

18+

The Journal is registered by the State Press Committee of the Russian Federation.

Registration Certificate PI No. ФC77-80730 dated March 29, 2021.

Publication frequency: 6 issues per year.
Circulation: 1,100 copies.

Distribution to specialists.

Layout designer: L.P. Popova,
proofreader: A.A. Popova.

Publisher: ALMAZOV FOUNDATION

Address: 2 Akkuratova street,
Saint Petersburg, 197341
Phone: + 7 (812) 702-37-16

For submission, correspondence, advertisement and subscription, please email your inquiry to pm@almazovcentre.ru.

The subscription code in the Rospechat catalogue is 79638.

Previous issues: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357

All rights reserved. © 2021.

Materials published in this Journal should not be reproduced, in full or in part, without the written permission of the publisher.

The editorial board bears no responsibility whatsoever for the contents of advertisements.

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА
ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

- 6** **Персонализированная медицина. История, современное состояние проблемы и перспективы внедрения**
Шляхто Е. В., Конради А. О.

ОБЗОРЫ

- 21** **Внедрение мобильного здравоохранения и его польза в условиях пандемии COVID-19**
Феррари Р., Гуардигли Г., Чималья П., Тавацци Л., Рапецци К., Вардас П.
- 33** **Фабрика фармакогенетических биомаркеров: как это работает?**
Сычев Д. А., Мирзаев К. Б., Денисенко Н. П., Абдуллаев Ш. П., Гришина Е. А.
- 43** **Персонализированная медицина — этапы формирования концепции и пути практической ее реализации**
Мокрышева Н. Г., Мельниченко Г. А.
- 59** **Ожирение как предиктор метаболических нарушений и цель для персонифицированных воздействий**
Бабенко А. Ю., Голикова Т. И.
- 95** **Трансгенные модельные объекты нового поколения и их использование в персонализированной медицине**
Андреева Д. Д., Синегубов А. А., Бурзак Н. А., Мурашова Л. А., Васютина М. Л., Дячук В. А.
- 118** **Современные подходы к поиску лекарственной терапии кальцификации аортального клапана**
Шишкова А. А., Лобов А. А., Докшин П. М., Боярская Н. В., Качанова О. С., Малашичева А. Б.

- 136** **Изучение врожденных рисков заболеваний с помощью методов вычислительной генетики**
Артемов Н. Н.

- 146** **Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями**
Шамова О. В., Жаркова М. С., Чернов А. Н., Владимирова Е. В., Сухарева М. С., Комлев А. С., Коченда О. Л., Орлов Д. С.

- 173** **Потенциальные биомаркеры острого повреждения почек, вызванного контрастированием у пациентов, перенесших чрескожные коронарные вмешательства**
Лаврищева Ю. В., Конради А. О., Яковенко А. А.

- 192** **Факторы риска венозных тромбоэмболических осложнений у пациентов с глиальными опухолями головного мозга**
Пищулов К. А., Мельничникова О. С., Золотова Е. А., Красношлык П. В., Гуляев Д. А., Симакова М. А.

- 207** **Синтез микро- и наночастиц в микрофлюидных реакторах для биомедицинского применения**
Лазарева Е. О., Евстапов А. А., Гареев К. Г., Чебуркин Ю. В., Крижанович А., Королев Д. В.

КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

- 237** **Амилоидоз желудочно-кишечного тракта. Клинические случаи**
Солоницын Е. Г., Алиева Ю. Ш., Сейфединова С. Ш., Баранов Д. Г., Митрофанова Л. Б., Грозов Р. В., Перминова А. А.

CONTENT

EDITORS CORNER

- 6 Personalized Medicine: History, current state and future directions**
Shlyakhto E. V., Konradi A. O.

REVIEWERS

- 21 The invasion of m-Health and its utility in COVID-19 pandemic**
Ferrari R., Guardigli G., Cimaglia P., Tavazzi L., Rapezzi C., Vardas P.
- 33 Pharmacogenetic biomarker factory: how does it work?**
Sychev D. A., Mirzaev K. B., Denisenko N. P., Abdullaev S. P., Grishina E. A.
- 43 Personalized medicine — stages of concept formation and ways of its practical implementation**
Mokrysheva N. G., Mel'nichenko G. A.
- 59 Obesity as a predictor of metabolic deviations and the purpose for the personified impact**
Babenko A. Yu., Golikova T. I.
- 95 New generation transgenic models in modern personalized medicine**
Andreeva D. D., Sinegubov A. A., Burzak N. A., Murashova L. A., Vasyutina M. L., Dyachuk V. A.
- 118 Modern approaches to the search for drug therapy for aortic valve calcification**
Shishkova A. A., Lobov A. A., Dokshin P. M., Boyarskaya N. V., Kachanova O. S., Malashicheva A. B.

- 136 Investigating inherited disease risks using computational genetics methodology**
Artomov M.
- 146 Antimicrobial peptides of innate immunity as prototypes of new agents to fight antibiotic-resistant bacteria**
Shamova O. V., Zharkova M. S., Chernov A. N., Vladimirova E. V., Sukhareva M. S., Komlev A. S., Kochenda O. L., Orlov D. S.
- 173 Potential biomarkers of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary intervention**
Lavrishcheva Yu. V., Konradi A. O., Yakovenko A. A.
- 192 Risk factors for venous thromboembolic in glioma patients**
Pishchulov K. A., Melnichnikova O. S., Zolotova E. A., Krasnoshlyk P. V., Gulyaev D. A., Simakova M. A.
- 207 Synthesis of micro- and nanoparticles in microfluid reactors for biomedical applications**
Lazareva E. O., Evstrapov A. A., Gareev K. G., Cheburkin Yu. V., Krizhanovich A., Korolev D. V.

CLINICAL CASES

- 237 Amyloidosis of the gastrointestinal tract. Clinical cases**
Solonitsyn E. G., Alieva Iu. Sh., Seyfedinova S. Sh., Baranov D. G., Mitrofanova L. B., Grozov R. V., Perminova A. A.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 61(091)

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА. ИСТОРИЯ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ

Шляхто Е. В.^{1, 2}, Конради А. О.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Конради Александра Олеговна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: konradi_ao@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
01.09.2021 и принята к печати
20.10.2021.

РЕЗЮМЕ

В обзоре приводится история формирования направления персонализированной медицины, а также связанных с ней терминов и определений, оценка состояния проблемы на современном этапе и перспективы будущего. Приведен краткий анализ основных направлений персонализированной медицины и областей применения, преимущества подхода и барьеры на пути практического внедрения.

Ключевые слова: персонализированная медицина, прецизионная медицина, фармакогенетика, омиксные технологии.

Для цитирования: Шляхто Е.В., Конради А.О. Персонализированная медицина. История, современное состояние проблемы и перспективы внедрения. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):6-20.

ВВЕДЕНИЕ

Персонализированная медицина (ПМ), хотя и находится сегодня на этапе становления, уже представляет важный эволюционный шаг на пути создания лекарств, развития методов диагностики и профилактики. Со временем, благодаря применению в повседневной клинической практике концепции персонализированной медицины, ожидается значимое улучшение прогноза, точности диагностики и результатов терапии. При этом это может быть достигнуто в режиме реального времени, позволяя стратифицировать пациентов, имеющих такие сложные по патофизиологии заболевания, как рак и атеросклероз, и определить наиболее быстрый и результативный способ оказания помощи.

Современное развитие молекулярных и информационных технологий в медицине привело к тому, что концепция персонализированной медицины переживает эпоху стремительного развития. За два десятилетия от узкой области применения в онкологии персонализированных лекарств, таких как герцептин, данная область расширилась до огромного перечня нозологий, возможностей точной предикации большинства болезней на основе широкогеномного скрининга, создания генно-терапевтических препаратов, технологий модификации экспрессии генов и мощнейшей информационно-аналитической системы сопровождения поиска индивидуальных предикторов ответа на лекарственные препараты.

Концепция персонализированной медицины диктует необходимость существенного изменения инфраструктуры биомедицинской науки, подчеркивает важность междисциплинарного подхода, направленного на более эффективное использование знаний, полученных в области геномики, инновационной биоинформатики и передовых нанотехнологических достижений, в клинической практике, т. е. на быструю трансляцию фундаментальных достижений в практическое здравоохранение. Для реализации концепции необходимо расширение приборной базы научных учреждений, развитие сети биобанков и центров коллективного пользования, информационных банков и библиотек, широкая международная интеграция. Еще важнее изменить суть и структуру подготовки кадров для последующей реализации технологий ПМ.

На концепции персонализированной медицины уже сегодня построено большинство инноваций в медицине — создание новых диагностических технологий на основе биомаркеров, развитие индустрии таргетных препаратов, формирование фармакогенетики и фармакогеномики как новых направлений наук, развитие технологий редактирования

генома, модификации микробиоты, нутритивной геномики, функционального питания и др. Большинство биотехнологических и фармацевтических компаний объявили в последние годы персонализированную медицину одной из основных стратегий развития на будущее, во многих странах и крупных научных центрах создаются консорциумы по персонализированной медицине, запускаются большие дорогостоящие проекты государственного масштаба, развиваются сервисы и определенная информационная среда, позволяющая привлекать все больше участников и тиражировать технологии [1–3].

Переход к персонализированному здравоохранению объявлен одним из приоритетов стратегического развития Российской Федерации на период до 2030 года «Стратегией научно-технологического развития РФ» [4]. В связи с этим в рамках реализации национального проекта «Наука» Министерством науки и высшего образования были проведены конкурсы на создание геномных центров в 2019 году и научных центров мирового уровня (НЦМУ) в 2020, в результате которых как минимум 6 победителей сосредоточили свои исследования и разработки на технологиях персонализированной медицины. Одним из победителей конкурса стал НМИЦ им. В. А. Алмазова в консорциуме с Институтом экспериментальной медицины. НЦМУ «Центр персонализированной медицины (руководитель академик РАН, профессор Е. В. Шляхто) стал учредителем первого в России специализированного научного медицинского журнала по данному направлению — «Российского журнала персонализированной медицины», и настоящий обзор состояния проблемы открывает первый выпуск в 2021 году.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЙ

Идеология персонализированной медицины была заложена задолго до того, как этот термин вошел в практику здравоохранения, а во главу угла были поставлены генетические риски заболеваний и генетические предикторы ответа на терапию. Черпая свои истоки еще в античной философии и медицине, исторически индивидуальный подход к лечению пациента был ключевым звеном русской медицинской школы XIX века (табл. 1). Стремление лечить «не болезнь, а больного», провозглашенное М. Я. Мудрым, развитие этой идеологии С. П. Боткиным и другими лучшими представителями отечественной школы терапии, как никогда актуально звучит в современном мире, когда концепция индивидуального подхода начинает вновь побеждать идеологию преувеличенной

догмы доказательной медицины, основывающейся только на «диктатуре» клинических исследований и статистики. При этом современная концепция ПМ уже давно вышла за рамки геномики и молекулярной биологии и предполагает широкие возможности осуществления адресной профилактики, диагностики и лечения заболеваний и продления жизни каждого человека.

В настоящее время мы находимся в начале четвертой индустриальной революции и формирования не просто постиндустриального общества, а общества, основанного на глубоких научных знаниях. Биоинформатика, биология, медицина и в целом «науки о жизни» стали сегодня самыми сильными драйверами изменения жизни общества. Сочетание неограниченных возможностей хранения и обработки данных, стремительного развития аналитических методов, а также возможности перевода процессов анализа в режим реального времени, не только изменяют производственные процессы, социальную жизнь, но и открывают воз-

можность радикального изменения всех процессов в здравоохранении, начиная с общественного здоровья и заканчивая персонализированной медицинской помощью. В то же время столь быстрое развитие технологий несет в себе определенные угрозы, в том числе риски внедрения технологий, не доказавших свою безопасность и эффективность, а также риски дискриминации определенных групп населения за счет доступа разного рода пользователей к их персональным данным и, наоборот, ограничения их доступа к новым технологиям. В связи с этим применение персонализированных технологий также, как и любая иная инновация в медицине, нуждается в серьезных научных доказательствах и в проверке практикой.

Термин «персонализированная медицина» (или индивидуализированная, персонифицированная) стал популярен в конце XX — начале XXI века [5]. Он предполагает выбор лечения, основанный на учете индивидуальных особенностей пациента, в первую очередь генетических, а также половоз-

Таблица 1. Исторические вехи появления и становления концепции персонализированной медицины (адаптировано и дополнено из [12])

Эпоха и даты	Авторы и страна	Суть концепции
4000 лет до н. э.	Медицина Древней Индии	Система индивидуального подбора трав и режима медитации
510 г. до н. э.	Пифагор, Греция	Описание фавизма — заметил, что только некоторые люди дают реакцию при употреблении в пищу fava beans (теперь заболевание, известное как дефицит глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы)
Средние века	Европа	Лечение индивидуально в связи с отсутствием знаний и стандартных схем
1789	Семмуэль Ханеманн, Германия	Принцип гомеопатии. Подобное лечится подобным
1908	Германия	Появление слов: ген, генотип и фенотип
1931	Garrod [14]	Публикация книги, в которой было обозначено индивидуальное действие лекарств в зависимости от генетической конституции
1953	Ватсон и Крик	Двуцепочечное строение ДНК
1956, 1957	Kalow; Motulsky [15, 16]	Концепция фармакогенетики
1962	Kalow [17]	Первая монография по фармакогенетике
1986	Mullis, et al. [18]	Открытие полимеразной цепной реакции
2000		Завершение секвенирования генома человека
2000–2020		Постгеномная эра. Изменение стратегии создания лекарств. ПМ как основа медицины будущего

растных, антропометрических, этнических, особенностях окружающей среды и др. Этот принцип в корне отличает ПМ от концепции «стандартизованного лечения», основанного на результатах клинических испытаний и больших когортных исследований [6]. В узком смысле ПМ первоначально фокусировалась на потенциале геномных маркеров (вариантов нуклеотидной последовательности) для формирования идей по стратификации риска, профилактике, подбору доз препаратов, выбора препаратов, предсказания терапевтического ответа и исхода [7–8]. Это предполагало развитие двух основных направлений — изучение редких заболеваний с очевидной генетической природой и частых заболеваний с генетической предрасположенностью. В дальнейшем спектр биомаркеров стал расширяться, появились новые направления, такие как персонифицированные клеточные продукты, технологии редактирования генома, антисмысловая терапия, что привело к созданию сложной современной архитектуры ПМ и выделению в ней большого количества различных направлений.

Эволюция и расширение концепции персонализированной медицины привело к появлению нового термина «прецизионная (или точная) медицина», которая предполагает выявление группы людей (вплоть до отдельных индивидуумов), которые имеют какие-то общие пути особенностей развития заболеваний и ответа на терапию [5]. Этот термин Национальным научным советом США в 2011 году [5] был признан официально более корректным и частично заменяющим персонализированную медицину. Прецизионная медицина — область медицины, учитывающая индивидуальные различия в генах, микробиомах, среде, семейном анамнезе и образе жизни для определения стратегии диагностики, лечения и профилактики, точно направленных на конкретного пациента [5, 9]. И все-таки это понятия близкие, но не тождественные. Прецизионная (точная) медицина предполагает поиск вероятностных рисков или вероятности того или иного вмешательства принести большую или меньшую пользу в отношении исхода у какой-то группы больных с общими характеристиками (например, генами), тогда как истинная персонализация медицинской помощи наблюдается только тогда, когда роль биомаркеров и факторов риска накладывается на предпочтения и потребности конкретного пациента, включая его семью, характер, ожидания и особенности межличностного взаимодействия с лечащим врачом [10].

Фармакогеномика, фармакогенетика и фармакопротеомика остаются ведущими разделами ПМ, основываясь на молекулярной диагностике как на жизненно важном инструменте для ПМ [11]. Как

известно, большинство современных лекарств разработаны и одобрены на основе их эффективности в больших группах пациентов. Первоначальной концепцией создания лекарств было представление о том, что при наличии понятного механизма тот или иной ответ на лечение будет наблюдаться у всех пациентов. Классические данные клинических испытаний нового препарата просто оценивали средний ответ исследуемой группы (среднее снижение уровня АД, холестерина, уменьшение в размерах опухоли, достижение ремиссии, уменьшение боли и др.). Хотя индивидуализация некоторых методов лечения была предложена уже в прегеномную эпоху, концепция персонализированной медицины, которая развивается в современном обществе, основывается на достижениях в молекулярной диагностике и разработке лекарств на основе геномики, протеомики, метаболомики и биомаркеров. Цель персонализированной фармакотерапии состоит не только в том, чтобы подобрать правильный препарат нужному пациенту, а подобрать его, не прибегая к пробному лечению, на основе знаний о генотипе и уровне биомаркеров. Это повышает эффективность и безопасность лечения и закономерно снижает его стоимость.

Существуют немало терминов и определений, которые имеют тесную связь с ПМ. Собственно термин устоялся после опубликования первой одноименной монографии в 1998 году [12], тогда же он появляется среди ключевых слов, индексируемых в системе MEDLINE с 1999 года, но длительное время был ассоциирован только с областями фармакогеномики.

Очень близкими понятиями, а на самом деле на современном этапе отраслями ПМ, являются такие термины, как:

- Genomic medicine — геномная медицина.
- Genotype-based therapy — терапия, основанная на генотипе.
- Individualized medicine, или individual-based therapy — индивидуализированная медицина.
- Information-based medicine — медицина, основанная на информации.
- Omics-based medicine — медицина, основанная на омиксных технологиях (фармакогеномике, фармакопротеомике, фармакометаболизме).
- pharmacogenomics/pharmacogenetics/pharmacoproteomics/pharmacometabolomics — фармакогеномика, фармакогенетика, фармакопротеомика и фармакометаболизм.
- Precision medicine — прецизионная (точная) медицина.
- Rational drug selection — рациональный выбор лекарств.

- Stratified medicine — стратифицированная медицина.
- Systems medicine — системная медицина.

ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА ПМ И БАРЬЕРЫ НА ПУТИ ВНЕДРЕНИЯ

Возможность более взвешенных медицинских решений на основании более глубокого понимания механизмов болезни и действия лекарств.

- Повышение вероятности хорошего прогноза за счет более таргетного воздействия.
- Снижение вероятности побочных эффектов лекарств и других ятрогенных осложнений.
- Концентрация на профилактике, в том числе индивидуально обоснованной.
- Более раннее начало лечения болезней на основании более чувствительных маркеров, в том числе возможность лечения до появления симптомов.
- Пренатальная диагностика генетических дефектов и профилактика детской инвалидности.

Существенными проблемами в здравоохранении являются низкая точность диагностических процедур и периодическое отсутствие эффекта от лечения, в том числе дорогостоящего. И то и другое приводит к неоправданным расходам в здравоохранении — выполнению исследований, которые не несут искомой информации и бесполезному назначению лекарственных препаратов. Особенно ярко это проявляется в тех областях медицины, где лечение очень дорогостоящее и сопряжено с большими рисками — онкология, ревматология, психиатрия. В лечении некоторых опухолей или таких заболеваний, как ревматоидный артрит, число «неответчиков» на лечение может достигать 50 % и более [12]. Это приводит к неоправданным расходам и снижению эффективности помощи. В связи с этим, с точки зрения планирования расходов и их рациональности, наличие специфических биомаркеров, которые достоверно определяют врачебную тактику в отношении пациента, обязательно сопровождается прямой и косвенной финансовой выгодой.

Однако сделать правдивый прогноз о том, насколько внедрение ПМ приведет к снижению затрат в здравоохранении, сегодня достаточно сложно. Для того чтобы внедрить подходы в реальную клиническую практику, необходимы очень большие вложения в изменение структуры медицинской помощи: в лабораторное и информационное оснащение, в повышение квалификации медицинских работников, в систему оценки качества помощи и даже в клинические рекомендации и протоколы лечения заболеваний. Сегодня ни одна страна

еще не может сказать, сколько это займет времени и насколько широко это возможно в ближайшем будущем. К сожалению, опыт последних десятилетий показывает, что стоимость медицинской помощи во всем мире только возрастает, поэтому к сиюминутному повсеместному внедрению ПМ стоит относиться без слепого энтузиазма и даже с должной степенью скептицизма. Реальная экономическая эффективность прецизионных подходов к лечению будет видна спустя значительный период времени, требует постоянной оценки и переосмысления. К сожалению, существуют риски, что широкое внедрение дополнительных методов обследования, в том числе определение новых генетических маркеров, на начальном этапе только увеличит расходы на здравоохранение. В лечении опухолей и ряда других патологий таргетные препараты обладают очень высокой стоимостью, тогда как их преимущества в плане отдаленного прогноза зачастую еще требует уточнения. Даже такой революционный подход в лечении гиперлипидемии, как ингибиторы PCSK9, уже некоторыми экспертами считается спорным достижением с точки зрения соотношения эффективности и стоимости [18]. В связи с этим внедрение методов и технологий ПМ во всем мире происходит постепенно от областей в высокой степени доказанности результата к более спорным отраслям.

СТРУКТУРА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Сегодня персонализированная медицина включает в себя несколько стратегических направлений инноваций в медицине, таких как:

Персонализированная диагностика, включая науку о биомаркерах.

- Персонализированная профилактика.
- Нанотехнологии и наноустройства.
- Персонализированные информационные технологии в медицине. Вычислительные инструменты и трансляционная биоинформатика. Искусственный интеллект.
- Персонализированная фармакология, в том числе персонализированная биологическая терапия.
- Персонализированные клеточные продукты и генные препараты.

Частные вопросы ПМ в диагностике и лечении заболеваний привели к самостоятельным наукам, которые активно развиваются в соответствующих областях. Сред них максимальные достижения есть по следующим направлениям:

- ПМ в онкологии.

- ПМ в психиатрии и лечении неврологических расстройств.
- ПМ в лечении сердечно-сосудистых заболеваний.
- ПМ и болезни метаболизма.
- ПМ и аутоиммунные и аутовоспалительные заболевания.
- ПМ, перинатология и наследственные болезни. Репродукция.
- ПМ и образ жизни.
- ПМ и лечение инфекций.

Основные драйверы развития ПМ

- Политические и социально-экономические факторы
 - Растущий запрос и общественное давление на правительство в целях внедрения более безопасных и эффективных методов лечения.
 - Запрос в отношении фармацевтической отрасли и медицинской промышленности — снижение побочных эффектов лекарств и снижения числа ятрогенных осложнений.
 - Стремление бизнеса сделать генетический скрининг более распространенным.
 - Повышение требований к качеству медицинской помощи, стимулирующее медицинских работников искать гарантий безопасности.
 - Запрос на снижение стоимости медицинской помощи за счет сокращения потерь на неэффективную лекарственную терапию, лечение последствий ятрогенных осложнений.
 - Снижение стоимости генетических тестов, в том числе секвенирования генома.

Факторы, связанные с развитием науки и технологий

- Доступность геномных знаний, полученных в результате секвенирования генома человека.
- Наличие новых технологий, позволяющих широко и повсеместно применять персонализированную медицину, таких как биочипы и высокопроизводительное секвенирование.
- Смена поколений медицинских работников на молодое поколение, повышение осведомленности о фармакогеномике, фармакогенетике и молекулярной медицине.
- Внедрение персонализированной медицины в научных медицинских центрах.

Промышленные драйверы

- Распространение биотехнологических компаний, заинтересованных в персонализированной медицине.
- Увеличение числа компаний, сочетающих диагностику с терапией (тераностика).

- Стремление компаний повысить надежность и безопасность своей продукции, снизить репетиционные потери при развитии неэффективности или побочных действий. Развитие ценностной медицины и концепции разделения рисков (risk-sharing).

РАЗВИТИЕ БИОМАРКЕРОВ

Одним из важнейших условий для развития ПМ является валидация и внедрение новых биомаркеров. Процесс создания нового биомаркера включает следующие направления, которые активно развиваются в настоящее время и будут совершенствоваться в будущем:

- Обнаружение маркера и его валидация.
- Оценка предиктивного потенциала и сопоставление с другими маркерами.
- Преклинические и клинические исследования.
- Животные модели.
- Биоинформатическая обработка генетических данных.
- Подходы на основе принципов системной биологии.

БУДУЩЕЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Быстрая эволюция биомедицины приведет к серьезным изменениям в здравоохранении уже в самое ближайшее время. В частности, реальные молекулярные механизмы большинства заболеваний, которые мы ранее считали идиопатическими и неясными, будут расшифрованы и детализированы. На основе омиксных данных будет создано большое число медицинских сервисов, в том числе коммерческих, которые будут широко развиваться и предлагаться населению не только медицинскими учреждениями. Геномные данные и системы калькуляции рисков будут постепенно интегрироваться в клиническую медицину. Со временем будут решены этические и регуляторные проблемы внедрения передовых генетических технологий, и они быстро войдут в практическую деятельность. Ожидается бурное развитие наномедицины и так называемой «медицины связи» (Connected Health), которая подразумевает использование для диагностики и мониторинга огромного множества дистанционных сервисов связи, обеспечивающих сосредоточение беспроводных, мобильных, электронных и иных сервисов, созданных для нужд пациента и предоставляющих возможность пациенту поделиться этими данными в целях получения

максимально эффективного медицинского сопровождения [19].

Огромный рывок совершит профилактическая медицина, что должно увенчаться успехами в лечении заболеваний в доклинической стадии и созданием иных технологий лечения «до болезни».

Автоматизация, роботизация, системы поддержки принятия решений и предиктивная аналитика прочно войдут в клиническую практику и приведут к серьезной трансформации функции врача и других медицинских работников. Сочетание информатизации и технологий искусственного интеллекта с прогрессом в молекулярной биологии приведет не только к созданию «умного» здравоохранения, но и к истинно индивидуализированному подходу, включая питание, физическую активность, назначение лекарств и иных методов лечения.

В первую очередь подобной трансформации медицины следует ожидать в области онкологии, нейронаук и лечения вирусных инфекций, где достижения молекулярной биологии уже наиболее заметны. Считается, что технологии ПМ в этих сферах уже будут широко применяться к 2025 году [20]. Не только новые таргетные препараты будут создаваться с учетом персонализации, но и применением многих известных молекул и технологий будет уточнено на основании данных геномики и протеомики. Существует мнение о том, что гентипирование станет «рентгеном XXI века», что основано на представлении о роли генетических тестов в предикции заболеваний, точной диагностики, выбора лечения и прогнозе [21–23].

Безусловно, не все заболевания быстро потребуют персонализированного лечения, эта область будет развиваться постепенно и охватывать все новые направления. Но, что крайне важно осознать, мы не должны ждать еще пару десятков лет, чтобы войти в эру персонифицированной медицины, мы должны уже активно внедрять ее принципы в клинические рекомендации и протоколы лечения, в практическую жизнь, что уже активно происходит в прогрессивных системах здравоохранения. Ожидается большой прогресс в биофармацевтическом секторе в этой сфере, что обеспечит генерацию инноваций и новых научных знаний. Для многих стран, таких как США, Япония и Китай, стратегия персонализированной медицины стала мейнстримом государственной политики в области здравоохранения. Крайне важно, что в рамках национального проекта «Наука» так много внимания уделено сегодня геномным исследованиям и персонализированной медицине. Без сомнения, деятельность НЦМУ в этой области будет способствовать прогрессу и генерации технологий. И созданный жур-

нал должен стать информационной площадкой для ученых и бизнес-сообщества для публикации новых данных и обсуждения важности проблемы.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schwab K. The fourth industrial revolution. World Economic Forum. New York, NY: Crown Publishing Group, 2017.
2. Personalized medicines fact sheet. Genes to personalized medicines. Progress from the National Institute of General Medical Sciences. National Institute of Health. <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-turning-discovery-into-health/personalized-medicine> (29 August 2021).
3. Alyass A, Turcotte M, Meyre D. From big data analysis to personalized medicine for all: challenges and opportunities. BMC Med Genomics. 2015;8: 33. DOI: 10.1186/s12920-015-0108-y.
4. Strategy of scientific and technological development of the Russian Federation (approved by the Decree of the President of the Russian Federation of December 1, 2016 No. 642). In Russian [Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации (утверждена Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642)].
5. National Research Council (US) Committee on a framework for developing a new taxonomy of disease. Toward precision medicine: building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 22536618.
6. Kirchhof P, Sipido KR, Cowie MR, et al. The continuum of personalized cardiovascular medicine: a position paper of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2014;35(46):3250–3257. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu312.
7. Senn S. Mastering variation: variance components and personalised medicine. Stat Med. 2016;35(7):966–977. DOI: 10.1002/sim.6739.
8. Pan S, Knowles JW. Exploring predisposition and treatment response — the promise of genomics. Prog Cardiovasc Dis. 2012;55(1):56–63. DOI: 10.1016/j.pcad.2012.04.006.
9. Hwang J, Christensen CM. Disruptive innovation in health care delivery: a framework for business-model innovation. Health Aff (Millwood). 2008;27(5):1329–1335. DOI: 10.1377/hlthaff.27.5.1329.
10. Joyner MJ, Prendergast FG. Chasing Mendel: five questions for personalized medicine. J Physiol. 2014;592(Pt 11):2381–2388. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.272336.

11. Mayo clinic staff. Pharmacogenomics: when medicine gets personal. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). July 16, 2010.
12. Jain KK. Personalized medicine. Waltham: Decision Resources Inc; 1998.
13. Garrod AE. The inborn factors in disease. London: Oxford University Press; 1931.
14. Kalow W. Familial incidence of low pseudocholinesterase level. Lancet. 1956;268(6942):576–577.
15. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. J Am Med Assoc. 1957;165(7):835–837. DOI: 10.1001/jama.1957.729802500100.
16. Kalow W. Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs. Philadelphia: Saunders; 1962.
17. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263–273. DOI:10.1101/sqb.1986.051.01.032.
18. O'Donnell CJ, Nabel EG. Cardiovascular genomics, personalized medicine, and the National Heart, Lung, and Blood Institute: part I: the beginning of an era. Circ Cardiovasc Genet. 2008;1(1):51–57. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.108.813337.
19. Caulfield BM, Donnelly SC. What is Connected Health and why will it change your practice? QJM. 2013;106(8):703–707. DOI: 10.1093/qjmed/hct114.
20. Jain KK. Personalized medicine. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. Springer Science+Business Media New York; 2015.
21. Offit K. Personalized medicine: new genomics, old lessons. Hum Genet. 2011;130(1):3–14. DOI: 10.1007/s00439-011-1028-3.
22. Offit K. Genomic profiles for disease risk: predictive or premature? JAMA. 2008;299(11):1353–1355. DOI: 10.1001/jama.299.11.1353.
23. Sherkow JS, Greely HT. The future of gene patents and the implications for medicine. JAMA Intern Med. 2013;173(17):1569–1570. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.10153.

Информация об авторах:

Шляхто Евгений Владимирович, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, директор НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Конради Александра Олеговна, д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, заместитель генерального директора ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России по научной работе, заведующий НИО артериальной гипертензии Института сердца и сосудов ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой организации управления и экономики здравоохранения Института медицинского образования Центра Алмазова.

PERSONALIZED MEDICINE. HISTORY, CURRENT STATE AND FUTURE DIRECTIONS

Shlyakhto E. V.^{1, 2}, Konradi A. O.¹

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Konradi Aleksandra O.,
Almazov National Medical Research
Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341
E-mail: konradi_ao@almazovcentre.ru

Received 01 September 2021; accepted
20 October 2021.

ABSTRACT

The review assesses history of personalized approach in medicine, terminology and definitions and current situation in personalized medicine in the world. Major fields of implementation, classification, advantages and practical barriers are also discussed as well as future perspectives.

Key words: personalized medicine, precision medicine, pharmacogenetics, OMICS-technologies.

For citation: Shlyakhto EV, Konradi AO. Personalized Medicine. History, current state and future directions. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):6-20.

INTRODUCTION

Personalized medicine (PM), although it is in its infancy today, is already an important evolutionary step towards the creation of drugs, the development of diagnostic and prevention methods. Over time, due to the use of the concept of personalized medicine in everyday clinical practice, a significant improvement in the prognosis, accuracy of diagnosis and results of therapy is expected. At the same time, this can be achieved in real time, making it possible to stratify patients with pathophysiological diseases such as cancer and atherosclerosis, and determine the most a quick and effective way to provide assistance.

The modern development of molecular and information technologies in medicine has led to the fact that the concept of personalized medicine is experiencing an era of rapid development. Over two decades, this area has expanded from a narrow field of application in oncology of personalized drugs, such as gerceptin, to a huge list of nosologies, possibilities for accurate prediction of most diseases based on broad-gene screening, the creation of gene therapeutic drugs, technologies for modifying gene expression and the most powerful information-analytical system supporting the search for individual predictors of response to drugs.

The concept of personalized medicine dictates the need for a significant change in the infrastructure of biomedical science, emphasizes the importance of an interdisciplinary approach aimed at more effective use of knowledge obtained in the field of genomics, innovative bioinformatics and advanced nanotechnological achievements in clinical practice, i.e. for a fast translation of fundamental achievements in practical health care. To promote the concept, it is necessary to expand the resource base of scientific institutions, develop a network of biobanks and collective use centers, information banks and libraries and a broad international integration. It is even more important to change the essence and structure of training for the subsequent implementation of PM technologies.

Most innovations in medicine have already been built on the concept of personalized medicine today — the creation of new diagnostic technologies based on biomarkers, the development of the industry of targeted drugs, formation of pharmacogenetics and pharmacogenomics as new disciplines of sciences, development of genome editing technologies, microbiota modification, nutritive genomics, functional nutrition, etc. In recent years, most biotechnological and pharmaceutical companies have declared personalized medicine one of the main development strategies for the future, many countries and major scientific centers are creating consortia for personalized medicine, launching large expensive

projects of the national scale, services and a media environment are being developed, making it possible to involve more and more participants and replicate technologies [1—3].

The Strategy for Scientific and Technological Development of the Russian Federation has declared the transition to personalized health care one of the priorities of the strategic development of the Russian Federation for the period up to 2030 [4]. In this regard, as part of the implementation of the national project “Science”, the Ministry of Science and Higher Education held competitions for the creation of genomic centers in 2019 and world level scientific centers (WLSC) in 2020, as a result of which at least 6 winners focused their research and development on the technologies of personalized medicine. The Almazov National Medical Research Centre in a consortium with the Institute of Experimental Medicine became one of the winners of the competition. WLSC Center for personalized medicine (headed by Academician of the Russian Academy of Science, Prof. E. V. Shlyakhto) became the founder of the first specialized scientific medical journal in Russia in this area — the Russian Journal for Personalized Medicine, and this review of the state of the problem is opening the first issue in 2021.

DEFINITION OF TERMS

The ideology of personalized medicine was laid long before the term had become customary in the health care practice, and genetic exposure to diseases and genetic predictors of response to therapy were regarded as of paramount importance. Rooted in ancient philosophy and medicine, historically an individual approach to the treatment of a patient was a key element of the Russian medical school of the 19th century (Table 1). The endeavor to treat “not a disease, but a patient”, proclaimed by M. Y. Mudry, the extension of this ideology by S. P. Botkin and other best representatives of the domestic school of therapy, sounds more relevant than ever in the modern world, when the concept of an individual approach begins to defeat the ideology of the blown-up dogma of evidence-based medicine, relying only on the “dictatorship” of clinical research and statistics. At the same time, the modern concept of PM has long gone beyond the scope of geonomy and molecular biology and provides wide opportunities for the implementation of targeted prevention, diagnosis and treatment of diseases and prolonging the life of each person.

At present, we are at the beginning of a new industrial revolution and the formation of not just a post-industrial society, but a society based on deep scientific knowledge. Bioinformatics, biology, medicine and, in general, “life sciences” have become the strongest

drivers of changing the life of society today. The combination of unlimited data storage and processing capabilities, rapid development of analytical methods, as well as the ability to translate analysis processes into real time, not only change production processes and social life, but also open up new possibility of a radical change in all processes in health care, from public health to personalized medical care. At the same time, such a rapid development of technologies carries certain threats, including the risks of introducing technologies that do not prove their safety and efficiency, as well as risks of discriminating certain groups of the population by providing all kinds of users with access to their personal data and, vice versa, by reducing their access to new technologies. In this regard, the use of personalized technologies, as well as any other innovation in medicine, requires serious scientific evidence and practical testing.

The term “personalized medicine” (or individualized, personified medicine) became popular in the late 20th — early 21st centuries [5]. It involves a choice of

treatment based on the individual characteristics of the patient, primarily genetic, as well as age and gender, anthropometric, ethnic, environmental characteristics, etc. This principle fundamentally distinguishes PM from the concept of “standardized treatment”, based on the results of clinical trials and large cohort studies [6]. In a narrow sense, PM initially focused on the potential of genomic markers (variants of the nucleotide sequence) to form ideas for risk stratification, prevention, dose selection for drugs, drug selection, prediction of therapeutic response and outcome [7—8]. This involved the development of two main directions — the study of rare cases with obvious genetic nature and frequent diseases with a genetic predisposition. Then the range of biomarkers began to expand, new areas appeared, such as personalized cell products, genome editing technologies, antisense therapy, which led to creating a complex modern PM architecture and highlighting a large number of different directions in it.

The evolution and expansion of the concept of personnel medicine has led to the emergence of a new term

Table 1. Historical milestones in the emergence and formation of the concept of personalized medicine (adapted and supplemented from [12])

Epochs and dates	Authors and country	The concept
4000 BC	Medicine in ancient India	System for individual selection of herbs and meditation regimes
510 BC	Pythagoras, Greece	Description of favism — he noticed that only some people react when eating fava beans (now this disease is known as glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency)
Middle Ages	Europe	Treatment is individual due to lack of knowledge and standard schemes
1789	Samuel Hahnemann, Germany	The principle of homeopathy. Similia similibus curantur
1908	Germany	The appearance of words: gene, genotype and phenotype
1931	Garrod [14]	Publication of a book that identified the individual effect of drugs DEPENDENT ON THE GENETIC CONSTITUTION
1953	Watson & Crick	Double-stranded DNA
1956, 1957	Kalow; Motulsky [15, 16]	Pharmacogenetics concept
1962	Kalow [17]	The first monograph on pharmacogenetics
1986	Mullis, et al. [18]	Discovery of polymerase chain reaction
2000		Completion of human genome sequencing
2000–2020		Post-genomic era. Changing the strategy for creating drugs. PM as the basis of medicine of the future

“precision medicine”, which implies the identification of a group of people (down to individuals) who have some common ways of the characteristics of disease development and response to therapy [5]. This term was officially recognized by the National Scientific Council of the United States in 2011 [5] as officially more correct and partially replacing personalized medicine. Precision medicine is a field of medicine that takes into account individual differences in genes, microbiomes, environment, family history and lifestyle to define a strategy for diagnosis, treatment and prevention, precisely aimed at a specific patient [5, 9]. And yet these concepts are close, but not identical. Precision medicine relies on search for probabilistic risks or the likelihood of an intervention to bring more or less benefit in relation to the outcome in a group of patients with common characteristics (for example, genes), whereas true personalization of medical care is observed only when the role of biomarkers and risk factors overlap with the preferences and needs of a particular patient, including his family, temper, expectations and features of interpersonal interaction with the attending physician [10].

Pharmacogenomics, pharmacogenetics and pharmacoproteomics remain the leading sections of PM, based on molecular diagnostics as a vital tool for PM [11]. As it is known, most modern drugs are developed and approved on the basis of their effectiveness in large groups of patients. The initial concept of creating drugs was the idea that, with an understandable mechanism, a response to treatment would be observed in all patients. Classical data from clinical trials of a new drug simply assessed the response of the study group (average decrease in blood pressure, cholesterol, decrease in the size of tumor, remission, pain reduction, etc.). Although the individualization of some treatment methods was proposed already in the pregenomic era, the concept of personalized medicine, which is developing in modern society, is founded on achievements in molecular diagnostics and drug development based on genomics, proteomics, metabolomics and biomarkers. The goal of personalized pharmacotherapy is not only to find the right drug for the right patient, but to select it without resorting to trial treatment, basing on knowledge about the genotype and biomarker levels. This increases the efficiency and safety of treatment and as naturally reduces its cost.

There are many terms and definitions that have a close relationship with PM. Actually, the term was established after the publication of the monograph of the same title in 1998 [12], at the same time it appears among the keywords indexed in MEDLINE system since 1999, but for a long time was associated only with areas of pharmacogenomics.

Very close concepts, but in fact at the present stage, PM fields, are such terms as:

- Genomic medicine.
- Genotype-based therapy.
- Individualized medicine, or individual-based therapy.
- Information-based medicine.
- Omics-based medicine.
- pharmacogenomics/pharmacogenetics/ pharmacoproteomics/pharmacometabolomics.
- Precision medicine.
- Rational drug selection
- Stratified medicine.
- Systems medicine.

MAIN ADVANTAGES OF PM AND BARRIERS TO IMPLEMENTATION

The possibility of more balanced medical decisions based on a deeper comprehension of the mechanisms of a disease and the effect of drugs.

- Increasing the probability of a good prognosis due to a more targeted impact.
- Reducing the probability of drug side effects and other iatrogenic complications.
- Concentration on prevention, including the individually justified one.
- Earlier treatment of diseases based on more sensitive markers, including the possibility of treatment before the onset of symptoms.
- Prenatal diagnosis of genetic defects and prevention of childhood disability.

Significant problems in healthcare are the low accuracy of diagnostic procedures and the periodic absence of the effect of treatment, including expensive ones. Both lead to unjustified costs in health care — research that does not provide the required information and useless prescription of drugs. This is especially evident in those areas of medicine where treatment is very expensive and involves large risks — oncology, rheumatology, psychiatry. In the treatment of some tumors or diseases such as rheumatoid arthritis, the number of “non-responders” to treatment can reach 50% or more [12]. This leads to unnecessary costs and a decrease in aid effectiveness. In this regard, from the point of view of cost planning and their rationality, the presence of specific biomarkers that reliably determine the medical tactics in relation to the patient is necessarily accompanied by a direct and indirect financial benefit.

However, making a truthful prognosis about how much the introduction of PM will lead to a decrease in costs in healthcare today is quite hard. In order to introduce approaches into real clinical practice, a lot of investments are needed in changing the structure of medical care: in laboratory and information equipment, in increasing qualifications of medical workers, to the sys-

tem for assessing the quality of care and even in clinical guidelines and protocols for the treatment of diseases. Today, no country can say yet, how long it will take and how widely it is possible in the near future. Unfortunately, the experience of the last ten years shows that the cost of medical care around the world is only increasing, so the momentary widespread introduction of PM should be considered without blind enthusiasm and even with a proper degree of skepticism. The real economic efficiency of precision treatment approaches will be visible after a considerable period of time and requires constant evaluation and reinterpretation. Unfortunately, there are risks that the widespread introduction of additional survey methods, including the identification of new genetic markers, at the initial stage will only increase the cost of health care. Targeted drugs have a very high cost in the treatment of tumors and a number of other pathologies, while their advantages in terms of long-term prognosis often still require clarification. Even such a revolutionary approach to the treatment of hyperlipidemia as PCSK9 inhibitors is already considered by some experts to be a controversial achievement in terms of the ratio of efficacy and cost [18]. In this regard, the introduction of PM methods and technologies around the world is gradually spreading from areas with a high grade of evidence of the result onto more controversial fields.

THE STRUCTURE OF PERSONALIZED MEDICINE

Today, personalized medicine includes several strategic areas of innovation in medicine, such as:

Personalized diagnostics, including information on biomarkers.

- Personalized prevention.
- Nanotechnologies and nanodevices.
- Personalized information technologies in medicine. Computational tools and translational bioinformatics. Artificial intelligence.
- Personalized pharmacology, including personalized biological therapy.
- Personalized cellular products and gene drugs.

Particular issues of PM in the diagnosis and treatment of diseases led to independent sciences, which are actively developing in the relevant fields. Among them, the maximum achievements are in the following areas:

- PM in oncology.
- PM in psychiatry and treatment of neurological disorders.
- PM in the treatment of cardiovascular diseases.
- PM and metabolic diseases.
- PM and autoimmune and autoinflammatory diseases.

- PM, perinatal medicine and hereditary diseases. Reproduction.
- PM and lifestyle.
- PM and treatment of infections.

Major drivers of PM development

- Political and socio-economic factors
- Growing demand and public pressure on the government to introduce safer and more effective treatments.
 - A demand towards pharmaceutical and medical industry regarding reduction of drug side effects and reduction of iatrogenic complications.
 - The aspiration of businesses to make genetic screening more available.
 - Increasing requirements for the quality of medical care, encouraging medical workers to seek safety guarantees.
 - A demand for decrease of the cost of medical care by reducing losses from non-effective drug therapy and treatment of the consequences of iatrogenic complications.
 - Reducing the cost of genetic tests, including genome sequencing

Factors related to the development of science and technology

- The availability of genomic knowledge obtained as a result of sequencing the human genome.
- The availability of new technologies that make it possible to widely and universally apply personalized medicine, such as biochips and high-performance sequencing.
- Changing generations of medical workers to the younger generation, increasing awareness of pharmacogenomics, pharmacogenetics and molecular medicine.
- Introduction of personalized medicine in scientific medical centers.

Industrial drivers

- The spread of biotechnological companies interested in personalized medicine.
- An increase in the number of companies that combine diagnostics with therapy (theranostics).
- The aspiration of companies to increase the reliability and safety of their products, reduce repetition losses due to the development of inefficiency or side effects. Development of value medicine and the concept of risk sharing.

BIOMARKER DEVELOPMENT

One of the most important conditions for the development of PM is the validation and introduction of new

biomarkers. The process of creating a new biomarker includes the following areas that are actively developing at present and will be improved in the future:

- Detection and validation of the marker.
- Assessment of predictive potential and comparison with other markers.
- Preclinical and clinical trials.
- Animal models.
- Bioinformatic processing of genetic data.
- Approaches based on the principles of systems biology.

THE FUTURE OF PERSONALIZED MEDICINE

The rapid evolution of biomedicine will lead to major changes in healthcare in the nearest future. In particular, the real molecular mechanisms of most diseases that we previously considered idiopathic and unclear will be deciphered and detailed. Based on omics data, a large number of medical services, including commercial ones, will be created, which will be widely developed and offered to the population not only by medical institutions. Genomic data and risk calculation systems will be gradually integrated into clinical medicine. Over time, ethical and regulatory problems of introducing advanced genetic technologies will be solved, and they will quickly become a part of practical activity. The rapid development of nanomedicine and the so-called “connected health” is expected, which involves the use of a huge variety of remote communication services that ensure the concentration of wireless, mobile, electronic and other services created for the needs of the patient and providing the patient with the opportunity to share this data in order to receive the most effective medical care [19].

Preventive medicine will make a huge leap forward, which should be crowned with success in the treatment of diseases in the preclinical stage and the creation of other technologies of treatment “before the disease”.

Automation, robotization, decision-making support systems and predictive analytics will become firmly established in clinical practice and will lead to a serious transformation of the function of a doctor and other medical employees. The combination of information and artificial intelligence technologies with progress in molecular biology will lead not only to the creation of “smart” health care, but also to a truly individualized approach, including nutrition, physical activity, the use of drugs and other methods of treatment.

First of all, this transformation of medicine should be expected in the field of oncology, neuroscience and the treatment of viral infections, where the advances in molecular biology are already most noticeable. It is be-

lieved that PM technologies in these areas will already be widely used by 2025 [20]. Not only will new targeted drugs be created taking into account personalization, but also the use of many known molecules and technologies will be refined based on genomics and proteomics data. There is an opinion that genotyping will become the “X-ray of the XXI century”, which is based on the idea of the role of genetic factors in the prediction of diseases, accurate diagnosis, choice of treatment and prognosis [21—23].

Of course, not all diseases will quickly require personalized treatment, this field will develop gradually and cover new areas more and more. But what is extremely important to realize is that we should not wait another couple of decades to enter the era of personalized medicine, we must already actively introduce its principles into clinical guidelines and protocols of treatment, into practical life, which is already taking place actively in progressive health care systems. Great progress is expected in the biopharmaceutical sector in this field, which will ensure the generation of innovations and new scientific knowledge. For many countries, such as the United States, Japan, and China, the strategy of personalized medicine has become the mainstream of public health policy. It is extremely important that within the framework of the national project “Science”, so much attention is paid today to genomic research and personalized medicine. Without a doubt, the activity of the WLSC in this area will contribute to the progress and generation of technologies. And this new journal should become an information platform for scientists and the business community to publish new data and discuss the importance of the problem.

Conflict of interest

The authors stated that there is no potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Schwab K. The fourth industrial revolution. World Economic Forum. New York, NY: Crown Publishing Group, 2017.
2. Personalized medicines fact sheet. Genes to personalized medicines. Progress from the National Institute of General Medical Sciences. National Institute of Health. <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-turning-discovery-into-health/personalized-medicine> (29 August 2021).
3. Alyass A, Turcotte M, Meyre D. From big data analysis to personalized medicine for all: challenges and opportunities. BMC Med Genomics. 2015;8: 33. DOI: 10.1186/s12920-015-0108-y.
4. Strategy of scientific and technological development of the Russian Federation (approved by the

Decree of the President of the Russian Federation of December 1, 2016 No. 642). In Russian [Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации (утверждена Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642)].

5. National Research Council (US) Committee on a framework for developing a new taxonomy of disease. Toward precision medicine: building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 22536618.

6. Kirchhof P, Sipido KR, Cowie MR, et al. The continuum of personalized cardiovascular medicine: a position paper of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2014;35(46):3250–3257. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu312.

7. Senn S. Mastering variation: variance components and personalised medicine. *Stat Med*. 2016;35(7):966–977. DOI: 10.1002/sim.6739.

8. Pan S, Knowles JW. Exploring predisposition and treatment response — the promise of genomics. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;55(1):56–63. DOI: 10.1016/j.pcad.2012.04.006.

9. Hwang J, Christensen CM. Disruptive innovation in health care delivery: a framework for business-model innovation. *Health Aff (Millwood)*. 2008;27(5):1329–1335. DOI: 10.1377/hlthaff.27.5.1329.

10. Joyner MJ, Prendergast FG. Chasing Mendel: five questions for personalized medicine. *J Physiol*. 2014;592(Pt 11):2381–2388. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.272336.

11. Mayo clinic staff. Pharmacogenomics: when medicine gets personal. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). July 16, 2010.

12. Jain KK. Personalized medicine. Waltham: Decision Resources Inc; 1998.

13. Garrod AE. The inborn factors in disease. London: Oxford University Press; 1931.

14. Kalow W. Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*. 1956;268(6942):576–577.

15. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957;165(7):835–837. DOI: 10.1001/jama.1957.729802500100.

16. Kalow W. Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs. Philadelphia: Saunders; 1962.

17. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263–273. DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.

18. O'Donnell CJ, Nabel EG. Cardiovascular genomics, personalized medicine, and the National Heart, Lung, and Blood Institute: part I: the beginning of an era. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1(1):51–57. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.108.813337.

19. Caulfield BM, Donnelly SC. What is Connected Health and why will it change your practice? *QJM*. 2013;106(8):703–707. DOI: 10.1093/qjmed/hct114.

20. Jain KK. Personalized medicine. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. Springer Science+Business Media New York; 2015.

21. Offit K. Personalized medicine: new genomics, old lessons. *Hum Genet*. 2011;130(1):3–14. DOI: 10.1007/s00439-011-1028-3.

22. Offit K. Genomic profiles for disease risk: predictive or premature? *JAMA*. 2008;299(11):1353–1355. DOI: 10.1001/jama.299.11.1353.

23. Sherkow JS, Greely HT. The future of gene patents and the implications for medicine. *JAMA Intern Med*. 2013;173(17):1569–1570. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.10153.

Author information:

Shlyakhto Evgeny V., MD, PhD, Dr. Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Science, Director of Almazov National Medical Research Centre, Director of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Konradi Alexandra O., MD, Dr. Sc., Professor, Corresponding Member RAS, Deputy General Director for Research, Head of the Research Department of Arterial Hypertension, Head of the Department of Management Organization and Health Economics, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
 ISSN 2782-3814 (Online)
 УДК 614.2:578.834.11

ВНЕДРЕНИЕ МОБИЛЬНОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ЕГО ПОЛЬЗА В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19

Феррари Р.^{1, 2}, Гуардигли Г.², Чималья П.¹, Тавацци Л.¹,
 Рапецци К.^{1, 2}, Вардас П.³

¹Отделение сердечно-сосудистой хирургии, Медицинский центр GVM Care and Research, Больница Марии Сесилии, Италия

²Сердечно-сосудистый центр, Университет Феррары, Италия

³Кардиологическое отделение, Кардиологический центр, клиника Hrygeia, Греция

Контактная информация:

Проф. Роберто Феррари
 Центр профилактики,
 Виа Эрколе I д'Эсте 32, Феррара,
 Италия.
 E-mail: fri@unife.it
 Статья поступила в редакцию
 21.09.2021 и принята к печати
 27.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Пандемия COVID-19 привела к неожиданному ускорению развития мобильного здравоохранения (*m-Health*) с внедрением телемедицины, удаленного мониторинга и ряда других цифровых подходов. Эти изменения произошли быстро, за несколько недель, и, вероятно, сохранятся даже после завершения пандемии. Таким образом, инструменты мобильного здравоохранения, дистанционной медицины и носимые устройства могут заменить или по меньшей мере дополнить традиционный личный контакт между врачом и пациентом. Это особенно верно в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку теперь существует техническая возможность удаленно собирать широкий спектр данных, таких как артериальное давление, частота сердечных сокращений, регулярность сердечного ритма, тоны сердца, масса тела, уровни сахара и холестерина, электрокардиограмма, частота дыхания, в дополнение к симптоматике. Однако все еще остается много сложных и нерешенных аспектов. Необходимо изменить принципы размещения затрат, чтобы в равной степени поддержать цифровую трансформацию. Вопросы, касающиеся конфиденциальности данных, ответственности, нормативно-правового соответствия и проведения исследований, должны решаться справедливо и четко как для врачей, так и для разработчиков технологий. В настоящее время все эти аспекты создают препятствия для внедрения мобильного здравоохранения. Правительства должны повышать уровень информированности и знаний медицинских работников и населения (особенно старшего возраста) в области мобильного здравоохранения, чтобы поддерживать цифровую революцию. Необходимо признать проблему «цифрового разрыва» и уменьшить его, чтобы люди с низким доходом, плохим доступом к высокоскоростному интернету или персональным компьютерам могли воспользоваться преимуществами мобильного здравоохранения.

Обо всем этом пойдет речь в настоящей статье. В начале статьи дано определение понятию «мобильное здравоохранение», далее рассматриваются преимущества и недостатки мобильного здравоохранения в общих чертах и в контексте пандемии COVID-19. В завершение приводится утверждение о том, что необходимо обеспечить более конкретное участие и объединить усилия множества заинтересованных сторон системы здравоохранения для оценки, улучшения и управления мобильным здравоохранением и цифровым будущим.

Ключевые слова: мобильное здравоохранение, телемедицина, удаленный мониторинг, цифровое здравоохранение, электронная медицинская карта.

Для цитирования: Ferrari R., Guardigli G., Cimaglia P. и др. Внедрение мобильного здравоохранения и его польза в условиях пандемии COVID-19. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):21-32. (In English)

THE INVASION OF M-HEALTH AND ITS UTILITY IN COVID-19 PANDEMIC

Ferrari R.^{1,2}, Guardigli G.², Cimaglia P.¹, Tavazzi L.¹, Rapezzi C.^{1,2}, Vardas P.³

¹Cardiovascular Department, GVM Care and Research, Maria Cecilia Hospital, Via Corriera 1 — 48033 Cotignola (RA), Italy

²Cardiovascular Research Centre, Ferrara University, Via Aldo Moro 8, 44124 Ferrara, Italy

³Department of Cardiology, Heart Sector, Hygeia Hospitals Group, Athens, Greece

Corresponding author:

Prof Roberto Ferrari, MD,
Prevention Centre,
Via Ercole I° D'Este 32, Ferrara, Italy.

E-mail: fri@unife.it

Received day 21 September 2021;

accepted 27 October 2021.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has led an unexpected acceleration of mobile-health (*m-Health*) with the adoption of telemedicine, remote monitoring, and several other digital approaches. These changes occurred rapidly in a few weeks and are likely to remain even when the emergency will be over. Thus, *m-health* tools, wearables, and remote medicine may replace or, at least, support the traditional face-to-face contact between patients and clinicians. This is particularly true in the area of cardiovascular diseases as it is now technically possible to collect remotely a vast range of data, such as blood pressure, heart rate and its regularity, heart sounds, body weight, sugar and cholesterol levels, electrocardiogram, respiratory rate in addition to symptoms. Several aspects, however, are still a challenge and need to be resolved. Reimbursement has to be changed in order to equally support the digital transformation. Aspects related to privacy, liability, regulatory issues, and even research need to be addressed in a fair and

firm way for both clinicians and technology developers. At present, these are still barriers to the implementation of *m*-health. Governments should provide more education on *m*-health to support healthcare professionals and citizens (*especially the elderly*) with the digitalisation revolution. A “*Digital divide*” for those with poor income or poor access to high-speed internet or personal computers should also be recognised and improved to avoid to be excluded from the benefits of *m*-health.

The present review article is about all this. First, we define what *m*-health is, then we consider the good and bad of *m*-health in general terms and in the context of COVID-19 pandemic. Finally, we argue that more concrete involvement and effort is needed by the multi-stakeholders of healthcare system to evaluate, improve, and govern *m*-health and the digital future.

Key words: digital health, electronic medical records, *m*-health, remote monitoring, telemedicine.

For citation: Ferrari R, Guardigli G, Cimaglia P, et al. The invasion of m-Health and its utility in COVID-19 pandemic. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):21-32.

INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic has driven an unprecedented acceleration and adoption of digital patient care interactions. Patients have become engaged of their own health via video, telemedicine visits, remote monitoring, use of “*touchpoints*” such as mobile-health (*m*-Health) tools and wearables, phone calls, portal messages as well as sharing of the remote data. Just in the United States, the number of messages sent to patients’ portals and of telemedicine’s consultation has increased at the beginning of the lockdown of about 40% as compared with the pre-pandemic levels [1]. These “*forced*” changes occurred very rapidly, almost overnight [2]. In a few weeks, digital medicine replaced the traditional face-to-face relationships between patients and clinicians. It is unclear whether these changes in healthcare delivery are temporary or whether and to which extent when the pandemic is over, patients will go back to the traditional face-to-face system. Although the changes were motivated by a urgent necessity, it seems that neither patients nor clinicians are aiming to go back to the old days of in person visits [3]. Such a digital shift can be considered as an opportunity to share a better system with the possibility to choose among in person or video visits or asynchronous messages or digital touchpoints. These last options might be welcomed by patients and the population in general. Telemedicine, for instance, can be provided at a more convenient time and avoid travelling. More frequent and shorter interactions than traditional visits such as weekly checks using portal messaging may also be useful (*even for the outcome*) especially for chronic illnesses and reduce hospitalisations [4].

As a consequence, the area of digital and *m*-health, which was already expanding rapidly, has been sped up by the current situation. *m*-health is now the third largest industry in the European health sector, after pharmaceuticals and medical devices. This is not surprising. The interest on *m*-health started long before the occurrence of the pandemic for several reasons. On one hand, the limited healthcare budget, the lack of responsible workers (*especially in remote areas of low-income countries*) and the ever-increasing health problems, (*as dramatically spotted by the COVID-19 emergency*), are challenging the national healthcare systems and there is the need to find more efficient solutions. On the other hand, smartphones, tablet computers, and their applications have become ubiquitous in modern life across the world and are part of the new actual healthcare [5]. Today, there is the need and the hope to deliver reliable healthcare by using *m*-health innovations and all stakeholders need to be involved in shaping the future of *m*-health as the choices made now will last for generations.

The purpose of the present review is: 1) to define *m*-health; 2) to discuss the “*good*” and the “*less good*” of *m*-health, the reasons why *m*-health has been so far under-delivered and to highlight the challenges and the opportunities; 3) to consider the specific role of *m*-health to manage the current COVID-19 emergency; 4) to call for action and encourage health professionals, technology developers, regulators, reimbursement authorities, and citizens to take a more active role in the use of *m*-health.

Let’s start by defining the terminology related to *m*-health.

DEFINITIONS

- ***m-Health***: *m* stands for mobile. Although there is no precise definition for *m-Health*, the terminology is used for the practice of medicine and public health support by mobile devices. It is a part of and often a synonymous of e-Health and relates to provision of health-related services via a mobile device. It comprises multidimensional elements including providers, patients, and administrative applications. The term is normally used in reference to the adoption of mobile communication devices such as mobile phones, computers, tablets, televisions, telephones, communication satellites but also wearable devices like smart watches, different sensors, and intelligent pacemakers for health services, information, and data collection. It follows that *m-Health* has enormous possibilities of application, including consumer education and behaviour change, disease and population registries through wearable sensors, point of care diagnosis, electronic health records, decision support, professional education, conduction of pragmatic-virtual trials, and, eventually, full healthcare management [6]. Part of *m-Health* are several other (and even increasing) sub-domains, the most popular being:

- ***Tele-Health***: Which also includes a broad spectrum of technologies and systems for remote exchange of data between patients and their clinicians to assist diagnosing, monitoring long-term conditions, and treating

- ***Tele-Medicine or Tele-Care***: which indicates remote care offered using telecommunication and information technologies.

- ***Wearable Sensors***: As it is intuitive, the term means sensors in contact with the body that are integrated into wearable objects (*watches, jewellery, rings, t-shirts, shoes, etc.*). Sensors can be directly applied to or in the body to monitor health by providing clinical relevant data. There are millions of sensors, often able to provide and connect many different information on an ongoing basis, and to upload the data immediately to the cloud, so that the doctor can make diagnosis, or adjustment to medication or treatment plan accordingly.

- ***Internet of medical things***: It refers to the several connected systems of medical devices and applications which collect data that are then provided to healthcare internet systems through computer networks. When connected to internet, ordinary medical devices or sensors can collect additional data and, importantly, can integrate each data in the actual context (*either biochemical, genetic, environmental, or even administrative*) thus enriching the level of information.

- ***Genomics***: It is an inter-disciplinary field of biology that focuses on the structure, evolution, functions, mapping, and editing of genome which, in turn, is the complete set of DNA and includes all the genes of the organism.

- ***Digital Health***: It is a rather broad term, which means the convergence of digital technologies (*including genomics*) with health, healthcare, living, and society to enhance the efficiency of healthcare delivery and make medicine more available, personalised and precise (7). The World Health Organisation (*WHO*) provides a classification of digital health interventions defined as “discrete function of digital technology to achieve health sector objectives” [8]. The wording “digital health” comprises several other terminologies, often confounding. Here, we report the most relevant ones:

- ***Information and Communication Technology (ICT)***: It refers to technologies that provide access to and dissemination of information (*not necessarily related to health and healthcare*). ICT covers any product that stores, retrieves, manipulates, transmits, or receives information electronically in a digital form. Typical examples are personal computers, tablets, telephone lines, wireless signals, digital televisions, emails, robots, etc. In the context of digital health, ICT comprehends communication channels, that facilitate delivery of digital intervention and health content, which, in turn, is any information that is aligned with recommended health practice.

- ***Artificial Intelligence (AI)***: It is a branch of Computer Science that studies the development of intelligent machines, which are able to think and work like the human intelligence. Classical examples are speech recognition, problem-solving, learning, and planning (*i.e. Siri, Cogito, Tesla, etc.*). AI is not limited to just *IT* or technology industry. It is extensively used in other areas such as business, law, education, and, indeed, medicine.

- ***Machine Learning***: Another umbrella-type of terminology that can be applied to different concepts and techniques. In general, the term refers to enabling a computer to carry out tasks that are typical of human intelligence by itself, without receiving line-by-line instructions to do so. There is no need to pre-specify all the steps necessary to solve the problem because the computer is able to “learn” by analysing the details of the data it receives (*input*), and to confront, generalise, organise these details (*algorithms*), and, eventually, to provide new data (*output*). It follows that machine learning is about data, while AI is about cognition. The more accurate data the computer receives, the better the output will be. This technique can and is applied to diagnosis (*especially in the area of imaging*) and treatment of diseases.

***m*-HEALTH PERCEPTION: THE GOOD**

The world is in the middle of a digital revolution independently from the epidemic. The use of mobile devices in health coupled with the related technologies promises to literally transform global health delivery by creating new models that can be integrated and even substitute the existing health systems [9]. However, as for every revolution, the perception and its application depends on different angles of observation. Several groups are strong believers that *m*-Health is the future, others, however, are more reluctant. The enthusiasm relies on several reasons.

First, the number of smartphones is predicted to reach more than 6 billion [10]. Just one year ago, 6 million multimedia applications in the app stores, 418,000 of these being *m*-Health apps (*and more as we are writing this article*) with more than 200 added users each day [10]. The commercial wireless signals cover 85% of the world population, extending far beyond the reach of the electrical grid [11]. Given such scale and speed of technological advancement during the past few decades, together with the importance, and the value of the health-market, it is not surprising that different industries are trying to create a more convenient (*and profitable*) healthcare system [11].

Second, health assumes or should assume prime interference around the globe as it is becoming a significant indicator of a nation's growth and development. Limited access to healthcare, in fact, creates a major barrier for social and economic development. This is particularly true when nations have to deal with an epidemic like the one of SARS-COV-2. In all, 400 millions of individuals have no access to any form of basic healthcare and 2 billion patients do not have access to required medications [12]. Therefore, more than one-fourth of the world has unmet health needs. It is not surprising that, in low-income countries, the popularity of *m*-Health is increasing as the use of mobile phones/devices is also exponentially increasing even in the illiterate and very low-income citizens. The majority of people, including those leaving in rural areas who are in desperate need of health, have access to mobile phones and are familiar with their function [10]. Today, the industry, together with social institutions, is working to develop *m*-Health applications that are usable by people with very low literacy [11–13]. Therefore, all these low-income countries are welcoming *m*-Health with great enthusiasm [14].

Third, in the most developed countries, the relative success in prolonging the prognosis, particularly in the area of cardiology and oncology, has led to substantial aging of the population and the relative increase of chronic condition poses economical and organisational

challenges to almost every health system [15]. While an acute condition can be treated with “*ad hoc*” solutions, chronic conditions need to be managed and contained during a long and expensive journey from onset (*diagnosis*) to the end (*death*), with limited possibilities of recovery. This is particularly true in case of an epidemic when care is not only centralized to these patients requiring intensive care, but mainly to the others that need to be managed at home. The actual pandemic has revealed all the limits of the existing healthcare systems. The emergency of treating COVID-19 patients, as a side effect, has reduced care of patients affected by other pathologies, with consequent more casualties especially for cancer and cardiovascular patients [16]. All of this jeopardises the already insufficient healthcare budgets with the result that healthcare providers as well as institutions, such as national and international scientific societies, including the ESC, which are starting initiatives to welcome *m*-Health with the aim to find reliable and less expensive alternative solutions [17, 18].

Fourth, politicians do strongly believe that *m*-Health might be the solution to all their problems. They believe that ubiquity of mobile devices (*and therefore of m-Health*) in the developed and developing world represent the opportunity to improve health delivery and outcome, to reduce unnecessary and costly hospital visits and stay, thus improving the population wellbeing. They also hope that *m*-Health might replace the lack of medical and health-related workers, especially in remote non-urbanised areas as well as the complicated health delivery in the ever-increasing megalopolis. Therefore, a sizeable proportion of the budget is shifted versus (*promising?*) start-up industry to develop *m*-health projects [19, 20].

Fifth, researchers and regulators are becoming more and more worried about the costs, the effective participation and even the meaning of traditional randomised controlled trials (*RCTs*) [21]. Usually, *RCTs* are numerically huge with rigid design, slowly and cumbersome realization and increasingly expensive. Majority of the trials are funded by companies, and managed by costly CROs (*Clinical Research Organisations*). Ancillary investigations to answer pathophysiological questions are limited by costs and time and also by the scarce interest of the sponsors and of the researchers [22, 23]. The endpoints are usually composite and often driven by subsidiary components, and the study representativeness and generalizability are always debatable. Co-morbidities remain a major open issue, typically clicked in the database as “physician-reported”, without any further information. The old debate on the nature of these and observation trials has recently risen, leading to new experimental digital solutions [24]. This is now possible by the universal digital diffusion, including Electronic

Health Recording (*EHR*) which have provided private and public health settings of networks encompassing hospitals, clinics, and ambulatory services with unified EHR and central data warehouses. In these archives are deposited individual hard events such as hospitalizations and death, which facilitate periodic interim analyses and safety monitoring, also by leveraging, where available, machine learning and advanced language processing. In addition to these technical facilities, two methodological innovations were introduced in trials' designs. First, the adaptive design model used in the largest trials conducted during the COVID-19 epidemic [25, 26]. Second, the very recent virtual or remote trials. All these models of RCTs (large and simple, adaptive, and virtual) are classified as "pragmatic". Thus, both scientists and regulators are looking at *m-Health* as an interesting alternative for clinical research and this is particularly true in the current days. The SARS-COV-2 tsunami, by necessity, has also changed the approach. Adaptive trials, which allow to change during the trial dosages, drugs, and even the endpoint, have been proposed and accepted by the authorities to speed up research and *m-health* is the preferred instrument to run such trials [25, 26].

Another promising application of *m-Health* is collecting data in digital form from real world registries and post-marketing surveillance. Pilot experience is going on, particularly for cancer drugs, when treatment may be promising but not proving. The clinical use might be allowed for limited years, while collecting data by means of *m-Health* used by the competent authorities to finally approve or reject the medication under scrutiny [27].

Sixth, beside pragmatic or adaptative clinical and observational trials, research is moving, as it should, to be directly conducted by patients and/or even by healthy people. This is logical as healthcare is about patients or avoiding healthy people to become patients. Up to now, however, patients and the population in general have not been the main stakeholders in healthcare. Things are rapidly changing as there is greater involvement of patients in health issues and their access to health information is facilitated by the digital and *m-Health* revolution. Thus, today, often patients are directly participating to research [28]. This is particularly true for chronic illnesses and also for epidemic diseases, such as CV diseases, that require changes of life-style approach with constant monitoring [29]. Connected devices – *tablets, wearables, hand-held devices* – enable patients to take a more active role in managing their health ("*empowerment*") and to provide their data to increase disease knowledge from a different angle which could be relevant for the others in the same conditions [28]. Therefore, today, as patients become more

and more empowered in their health, many of them are spontaneously participating to research by providing their data (*including the genetic ones*) and their relationship with the disease. The data are then processed for global analysis, thus joining the "*Big Data Company*" [29]. The several groups or patients' associations dealing with the sequel of COVID-19, the so-called "*long COVID*" is a classic example.

It follows that, for different reasons, many different categories (*technology industries, big pharma, managers, suppliers, governments, patients, scientists, insurance companies, and many others*) have a good perception of *m-Health* and several hopes in its application. The picture, however, is not all rosy and other groups are less enthusiastic, to say the best.

m-HEALTH PERCEPTION: THE LESS GOOD

As for the enthusiasm, there are reasons for scepticism.

One is rather historical, with roots extending back to Hippocrates. It is a sort of subliminal pride and/or fair for a drastic change. It is the so-called "*medical professionalism*" which has been challenged through time in many different ways and it is not always appreciated [30]. The changes in healthcare delivery, already adopted in several industrialised countries, threaten the nature and the values of medical profession. Several physicians were and are worried (*and, most probably, correctly so*) about the accuracy and reproducibility of the *m-Health* data which are highly dependent on the reliability of the information delivered and the relative coding.

A **second** scepticism relates to AI. In general doctors believe that AI is not as good as full work-up by them, although they are starting to realise that it may be very useful in solving several problems, particularly in situations of emergency like the present one. Apart from emergencies, a metanalysis of 69 well conducted studies provide 92% specificity for AI deep learning imaging and 90% for healthcare professionals, although reporting is better when is performed by human intelligence [31]. This is an example of clear win-to-win interaction by doctors and AI. However, some clinicians consider *m-Health* and AI a sort of competitor, something that will take away their job and pride, an "*invention that will substitute me*". On the other hand, the order of magnitude of data that will be produced by *m-Health* will require supplementation of human intelligence. Nevertheless, there are several issues, including ethical aspects, on the use of AI in medicine which should be resolved quickly. So, strangely enough, a category that is less enthusiastic or even sceptical about *m-health* is the one of "*doctors*".

In our opinion, this is a wrong way of thinking. Actually, it is a contradiction to *professionalism* that is the basis of Medicine's contract with the Society. It requires placing the interest of patients above those of physicians, setting and maintaining the standard of competence and integrity, thus providing advice to the Society on health matters [30].

A **third** issue relates to the usefulness of several tools of *m-Health* for clinical management as the majority of them has been designed to capture data but without meaningful clinical engagement and, therefore, useless.

Fourthly, reimbursement is a critical and not easy to be solved task. Actually, it is an obstacle to the delivery of *m-Health*. The classical fee-for-service scheme forces physicians to return to the in-person visits instead of navigate among often complex rules to determine which digital services are reimbursable and which not as well as the size of reimbursement. Regulatory authorities are in a difficult situation. For sure, they are aiming to facilitate *m-Health* innovations but at reasonable costs [32]. Technology industries also expect a reimbursement based just on proof of functionality, but without proper ad hoc studies showing clear added value. Billing for digital intervention is not easy [33]. In the US, for example, medicare reimburse an e-visit only if the visit was initiated by the patient, when patients' written consent was obtained and a clinical decision was made [34]. All this will increase administrative costs for both the physicians and the administration that has to pay.

A **fifth** obstacle is related to regulatory and liability issues. Maintenance of privacy is difficult, if not impossible, in a digital world. The same applies to the consent of the use of data. There is urgent need of establishing clear rules for delivery of *m-Health* as regulatory and liability are often a barrier for *m-Health* and digital tools in absence of an ad hoc legislation [35]. The pandemic, however, has shown that these barriers can be overcome when there is a clear need, but once the emergency is over, particularly liability controversies will explore.

Despite all these scepticisms, staying away or remaining sceptical about *m-Health* is anachronistic. It should be recognised that future is going to be digital. *m-Health* is just a tool, which can facilitate rather than substitute everybody's/everyday work, not only for physicians but also for all the allied medical professions. It is a duty of medical professionalism and, in particular, of national and international medical societies to drive the development and to incorporate *m-Health* into everyday practice. This means a common and synergic approach from all stake holders to move forward and strategically plan how *m-Health* should be developed,

how to evaluate a concrete added value, and when, where, and how it should be applied.

Nothing, however, will really improve without the enthusiasm of the medical professionals. An ESC survey in 2019 reported that cardiologists are "fairly" familiar with digital tools but not with *m-Health*. They claim that they are too busy and do not have enough time to dedicate to *m-Health*, apart from using, in a rather passive way, basic functions of smartphones to communicate with their patients by short messaging or voice calls [35]. As a result, and this is the **sixth** obstacle, there is the tendency to produce over-engineered solutions, detached by contextual medical factors and by the complexity of the problem that often needs to be solved. The majority of the apps are not fully professional, thus physicians use only few of them. Most downloads are never opened and consistent continuous use is rare. This is true also for allied professionals, such as nurses, technicians, and students. Not surprisingly, the most visited apps by physicians are those related to conferences (*i.e. those that follow a conference providing proceedings*), diagnosis and treatment as well as those linked to guidelines. The apps related to education, monitoring, motivation, nutrition, lifestyle, etc. are more visited by patients. Unfortunately, these last are mostly detached from the diseases, focusing mainly on behaviour changes and are not integrated with the medical system. The underlying scope of the producers is to reach a rather large audience and not the specific stakeholders. This is wrong because the inability to address specific problems and to be connected with the entire health system results in early abandonment and scepticism in the entire technology. A proper development of *m-Health* involves a multidisciplinary collaboration among researchers, clinicians, non-health-specialists, engineers, patients, anthropologists, psychologists, communicators, ethics experts, etc. which will provide a user-centre approach instead of over-engineering solutions. Once again, all of this needs a precise methodological approach, proper time and dedication. The lead must come from the medical arena, which represents the expertise and has the data. Indeed, it is not the work or the enthusiasm of one doctor, but the vision of large medical national and international societies as well as that in Europe, at least, of the European Parliament.

ROLE OF *m-HEALTH* IN THE CONTEST OF THE COVID-19 EPIDEMIC

The unexpected and abrupt spreading of COVID-19 infection has found the world totally unprepared. Great concerns were immediately raised about the readiness and capacity of health systems to respond to the pan-

demic. This has speed up interest and appreciation for the use of *m*-health in several areas [36].

The most relevant use of *m*-health was and still is for **instantaneous contact tracing** [37]. The current virus is less virulent but more infectious than previous coronaviruses with high tendency to mutate. As a result, SARS-COV-2 has a greater epidemic potential because the spread is fuel by mild or asymptomatic cases making difficult to trace pre-symptomatic infections. This seems to be true also in vaccinated people who can be asymptomatic but still infectious as vaccines do not conferee total immunity. Therefore, precaution, such as social distancing and, when necessary, quarantine as well as decontamination, wearing masks, and hygiene measures are still, in absence of specific drugs (*which could be available soon*), a way to limit virus spread. To implement the most drastic measures at the right time (*the earlier, the better*), it is critical to understand routes and timings of the infection transmission, i.e. instantaneous contact tracing [38]. Digital contact tracing, especially if widely developed, seems to be more effective than traditional methods of contact tracing. Several COVID-19 apps are available and have been successfully used by governments. These applications have been developed using different mathematical models for infectiousness to estimate the basic reproductive R_0 and to quantify the weight of different transmission routes [39]. Not surprisingly, privacy concerns have been raised, especially about systems that are based on tracking the geographical location of the app users. Less intrusive alternatives have been developed, including the use of Bluetooth signals to detect users' proximity to other mobile phones. Google and Apple have integrated the functions to support such Bluetooth-based applications directly to their operating systems. They have also produced specifications of the core technologies based on a combination of Bluetooth low energy and private preserving cryptography [40]. Although there are small differences among the applications, the basic principle is the following: the contacts of an individual using the app, are traced using GPS co-localisations with other app users. Then, when and if any individual linked by the app requests a SARS-COV-2 test (*using the same app*) and the test results positive, the app immediately triggers a notification to all the individuals who have been in close contact as well as to the relevant health providers. One of the problems is inevitably related to false positive results, which would trigger unnecessary worries and reactions. Another problem is the potential lack of effectiveness if the system is limited to a small fraction of the population. Data ownership, privacy, and ethics are the other issues, particularly once the threat has passed. A set of principles and conditions have been provid-

ed and approved by several governments to overcome those problems [38]. Apple and Google have agreed to remove the tracing mechanisms from their operating systems once it is no longer needed [39]. Another way to avoid these problems is to use a centralised network tracing location instead of apps, eliminating the need of download the app and the risk of tracking information other than those related to the infection.

In view of the possible spread of the virus, despite vaccines, it would be useful to have a worldwide accepted system able to trace the pandemic across the world without any border. We are far from this; there are not even central repositories of meaningful data and follow-up of the pandemic situation. Governments are making decisions just from incomplete, constantly changing data spread out by a wide range of sources, not always trustable. This is the reason why **COVID Tracing Tracker** has been developed, a database to capture details of every automated contact tracing app around the world. It is far from being a database of infected people but, at least, it provides a list of automated contact tracing up backed by local governments with details on who the producer of the algorithm is, which technology is used, the level of penetration, whether the system is voluntary or not, and, importantly, when the data will be destroyed, and whether are used for purposes other than public health.

Another obvious use of *m*-health, when fighting the epidemic, is to **expand home medical services** [9]. Patients with mild symptoms and without chronic comorbidities may and should be cared remotely, at home. It is essential to establish easy and continuous communication with healthcare providers so that they can check on patients' conditions via *m*-health, telephone or digital solutions. Remote monitoring and telemedicine will help to provide drugs prescription and information on possible side effects, to monitor their effective use and efficacy as well as to observe the progression of the patients' conditions and intervene in person when necessary. Primary care database can be used in digitalised health systems to identify the patient, provide the data to central authorities and public health organisations, tag the patients for follow-up and, importantly, use the digital data for research as still little is known about the novel virus.

Thus, **remote monitoring** has been often used, and still is, during the pandemic, particularly for patients with CVD in whom was not difficult to measure digitally basic parameters such as blood pressure, heart rate, rhythm, etc. [9]. Today, actually, it is technically possible to remotely monitor symptoms, electrocardiograms, heart rate, blood pressure, regularity of heart rate, weight, heart sound, respiratory rate, lung water accumulation, etc. This is helping to maintain a line of

contact and to provide care to CV patients often reluctant or unable to reach for the regular check-up busy hospitals with COVID-19 patients.

During the immediate and acute phase of the pandemic, it was also important to establish **a line of communication** and reassurance even with healthy people, a sort of informative first-point of contact by means of a centralised hotline using online platforms. In China and in several Western European countries, for people at risk or with COVID-19 suspicion or even with symptoms, the first contact with the health system was through an online platform with clear, simple algorithms, to alleviate tension and provide instructions on what to do or not to do, if necessary. This approach was important to protect healthcare workers in primary care centres, to avoid unnecessary hospital or first aid admission, and to reassure the population that was not left alone.

CALL FOR ACTION

m-health is rapidly expanding and is a key to the digital transformation of healthcare. Main targets of *m*-health are patients, physicians and organisations. Several issues have to be revised or solved in the field of *m*-health. Terms related to this topic are broad, carry ambiguity and, particularly, the definition of *m*-health remains challenging. The technologies included in *m*-health, are designed to achieve easier access to health services and research and to optimise the cost medicines. At present, none of these aims has been reached. Several challenges remain, especially in low- and middle-income countries, related to literacy and limited connectivity. Even in the most advanced countries, *m*-health is sporadically used, even for simple and easy tasks, such as blood-glucose and blood pressure monitoring or for cardiac rehabilitation [41]. In more complex situations, such as heart failure or coronary artery diseases, the value of remote monitoring and telemedicine is still controversial [42]. However, COVID-19 has changed the perception. The present limitations are expected to be quickly resolved and the actual improvement of outcome may not be the endpoint of *m*-health. Just less travelling and inconvenience for patients may be sufficient.

There is a lack of properly performed *m*-health driven trials but we are confident that the evidence based utility of *m*-health will grow substantially in the coming years especially if the Scientific Communities and relevant authorities will set rules on how value the results of *m*-health.

Health services, political institutions, and the entire healthcare ecosystem are called to embrace this innovation. There is the need to solve issues related to liability, regulatory rules, and reimbursement for both physicians and technology developers [43]. Privacy

and consents to capture and use of data also need to be solved [41]. Beside these technical aspects, support should be provided to allow physicians to be more confident and to encourage their patients to move forward and use *m*-health. As the majority of tools are produced by “*big tech*” and targeted for wealthy customers, the healthy population will be an important stake holder. In this case, it is important to avoid the so-called “*digital divide*”. This wording refers to people with low income and/or with poor access for high speed internet, smartphones or personal computers. They would be totally or partially excluded by the benefits of *m*-health. This is the empty part of the glass, the full size is that *m*-health can be of paramount importance in geographical areas with poor access to healthcare. This is facilitated by the fact that young people are confident with smartphones, while older population may be less so.

Thus, there is the need to reconcile uncertainty of costs for this part of the world population. It is also essential that governments will quickly invest on an efficient EHR system, interoperative across hospitals and clinic and, in the future, even among countries [44]. The process is in progress in the US and few European nations but it needs to be expanded to the whole world. As sub-product, this approach could contribute substantially to generate tracking of the routine out-hospital care of chronic patients, thus familiarising them with interconnection via *m*-health. In this way, *m*-health will strongly contribute to research as an efficient EHR is fundamental for pragmatic-virtual clinical trials [45]. Equally, it is hopefully that regulators will determine the proper trial designs, the validity for final drugs or interventions approval, etc. [46]. Only when all this is in place, it will be possible to clearly determine, in terms of objective outcome, the real added value of *m*-health.

CONCLUSIONS

m-health represents a fertile ground of opportunities and not just of challenges. However, there is a strong need of a more enthusiastic involvement of doctors and scientific institutions. The society expects clinicians and healthcare system to govern the changes and to use the available data for diagnosis and treatment. Science may be also essential to produce objective knowledge of “*what works*” and “*what does not*”.

In the last years, the COVID-19 pandemic has speeded up an unbelievable change in the delivery of healthcare which has been dormant for decades [46]. *m*-health, during the crisis, has been essential to maintain a line of communication between doctors and patients via telemedicine and remote monitoring. Another major contribution has been the instantaneous contact

tracking. All of this will remain as indicated by the fact that Apple and Google are mobilising huge investments and teams to build up their own system which could be used by millions of people worldwide.

We need to accept that the future will be digital. Unless we move rapidly towards *m*-health models for medicine, the healthcare system will continue to be suboptimal, non-patient centred and unnecessarily costly. But more than anything else, it will be responsible for not capturing the potential of the existing technology around us.

Funding

This work was supported by a grant from Fondazione Anna Maria Sechi per il Cuore (FASC).

Acknowledgements

We thank Silvia Felloni for her professional assistance on this manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Adler-Milstein J, Mehrotra A. Paying for Digital Health Care — Problems with the Fee-for-Service System. *N Engl J Med*. 2021 Sep 2;385(10):871-873. doi: 10.1056/NEJMp2107879. Epub 2021 Aug 28. PMID: 34449187.
- Mueller, B. Telemedicine arrives in the U.K.: '10 years of change in one week'. The New York Times. <https://www.nytimes.com/2020/04/04/world/europe/telemedicine-uk-coronavirus.html> (2020).
- Mehrotra A. Looking ahead: what should the telemedicine regulatory and payment landscape look like after the pandemic? Washington, D.C.: Committee on Ways and without payment-system changes, we can expect to have many unhappy patients and physicians struggling with this complex payment labyrinth. PERSPECTIVE 873 Paying for Digital Health Care *n engl j med* 385;10 *nejm*. org September 2, 2021 Means, Subcommittee on Health, United States House of Representatives, April 28, 2021 (<https://waysandmeans.house.gov/sites/democrats.waysandmeans.house.gov/files/documents/Ateev%20Mehrotra%20Testimony.pdf>).
- Cowie MR, Lam CSP. Remote monitoring and digital health tools in CVD management. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(7):457-458. doi:10.1038/s41569-021-00548-x
- Topol, E. The Topol review: preparing the healthcare workforce to deliver the digital future. Health Education England <https://topol.hee.nhs.uk/> (2019).
- Peiris D, Miranda JJ, Mohr DC. Going beyond killer apps: building a better mHealth evidence base. *BMJ Glob Health*. 2018 Feb 21;3(1):e000676.
- Labrique AB, Vasudevan L, Kochi E, et al. mHealth innovations as health system strengthening tools: 12 common applications and a visual framework. *Glob Health Sci Pract* 2013;1:160–71. 10.9745/GHSP-D-13-00031
- https://www.who.int/reproductivehealth/publications/mhealth/WHO_Classifications_Poster.pdf?ua=1
- Mueller, B. Telemedicine arrives in the U.K.: '10 years of change in one week'. The New York Times <https://www.nytimes.com/2020/04/04/world/europe/telemedicine-uk-coronavirus.html> (2020).
- Singh P, Panjwani M. et al. mHealth: Meaning, Purpose and Outcomes. Pooja Singh et al, / (IJCSIT) International Journal of Computer Science and Information Technologies, Vol. 7 (5) , 2016, 2216-2221
- Geng EH, Peiris D, Kruk ME. Implementation science: relevance in the real world without sacrificing rigor. *PLoS Med* 2017;14:e1002288 10.1371/journal.pmed.1002288
- Peiris D, Praveen D, Johnson C, et al. Use of mHealth systems and tools for non-communicable diseases in low- and middle-income countries: a systematic review. *J Cardiovasc Transl Res* 2014;7:677–91. 10.1007/s12265-014-9581-5
- Asteggiano, R., Cowie, M. R., Richter, D., Christodorescu, R., Guasti, L. & Ferrini, M. Survey on e-health knowledge and usage in general cardiology. *Eur. Heart J. Digital Health* (in the press).
- Nyemba-Mudenda M, Simphiwe Metfula A, "A review on mHealth research in developing countries", Vol 9, No2 (2013) Chigona
- Lowe CR. "mHealthcare: Opportunities, Challenges and Prospects", 4th Future of Wireless International Conference, the Moller Center, Churchill College, University of Cambridge
- National Institute for Health and Care Excellence. Evidence standards framework for digital health technologies. <https://www.nice.org.uk/Media/Default/About/what-we-do/our-programmes/evidence-standards-framework/digital-evidence-standards-framework.pdf> (2019).
- Kotecha D, Chua WWL, Fabritz L, et al. European Society of Cardiology smartphone and tablet applications for patients with atrial fibrillation and their health care providers. *Europace*. 2018 Feb 1;20(2):225-233.
- Frederix, I. et al. ESC e- Cardiology Working Group position paper: overcoming challenges in digital health implementation in cardiovascular medicine. *Eur. J. Prev. Cardiol*. 26, 1166–1177 (2019).
- WHO Global Observatory for eHealth, "New horizons for health through mobile technologies.", Geneva, 2011

20. Krittanawong, C. et al. Integration of novel monitoring devices with machine learning technology for scalable cardiovascular management. *Nat. Rev. Cardiol.* 18, 75–91 (2021).
21. Mohr DC, Schueller SM, Riley WT, et al. Trials of intervention principles: evaluation methods for evolving behavioral intervention technologies. *J Med Internet Res* 2015;17:e166 10.2196/jmir.4391
22. Ferreira JP, Cleland JGF, Lam CSP, van Veldhuisen DJ, Byra WM, La Police DA, et al. Geographic Region Impact on the COMMANDER-HF Trial. *JACC Heart Fail* 2021;9(3):201-211.
23. de Denus S, O'Meara E, Desai AS, et al. Spironolactone metabolites in TOPCAT— new insights into regional variation. *N Engl J Med* 2017;376: 1690–2.
24. Schwartz D, Lellouch J. Explanatory and pragmatic attitudes in therapeutical trials. *J Chronic Dis.* 1967;20(8):637–48.
25. Maggioni A, Rapezzi C, Tavazzi L, Ferrari R. Key words to be adopted for COVID-19 research. *Eur Heart J.* 2020 Nov 21;41(44):4229-4230. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa322. PMID: 32293675; PMCID: PMC7184511.
26. Tavazzi L, Maggioni AP, Rapezzi C, Ferrari R. One year on: The impact of COVID-19 on clinical research. *Eur J Intern Med.* 2021 Aug 25:S0953-6205(21)00274-0. doi: 10.1016/j.ejim.2021.08.008.
27. Loudon K, Treweek S, Sullivan F, Donnan P, Thorpe KE, Zwarenstein M. The PRECIS-2 tool: designing trials that are fit for purpose. *BMJ* 2015;350:h2147.
28. Wallentin L, Gale CP, Maggioni A, Bardinet I, Casadei B. EuroHeart: European Unified Registries On Heart Care Evaluation and Randomized Trials. *Eur Heart J.* 2019 Sep 1;40(33):2745-2749. doi: 10.1093/eurheartj/ehz599. PMID: 31505603.
29. Implementing high-quality primary care: rebuilding the foundation of health care. National Academy of Medicine, May 2021 (<https://www.nap.edu/resource/25983/High%20Quality%20Primary%20Care%20Policy%20Brief%201%20Payment.pdf>).
30. ABIM Foundation. American Board of Internal Medicine; ACP-ASIM Foundation. American College of Physicians-American Society of Internal Medicine; European Federation of Internal Medicine. Medical professionalism in the new millennium: a physician charter. *Ann Intern Med.* 2002 Feb 5;136(3):243-6.
31. Marcolino MS, Oliveira JAQ, D'Agostino M, et al. The Impact of mHealth Interventions: Systematic Review of Systematic Reviews. *JMIR Mhealth Uhealth.* 2018 Jan 17;6(1):e23.
32. Washington V, DeSalvo K, Mostashari F, Blumenthal D. The HITECH era and the path forward. *N Engl J Med* 2017; 377: 904-6.
33. Fischer SH, Ray KN, Mehrotra A, Bloom EL, Uscher-Pines L. Prevalence and characteristics of telehealth utilization in the United States. *JAMA Netw Open* 2020;3: e2022302.
34. Schickedanz A, Huang D, Lopez A, et al. Access, interest, and attitudes toward electronic communication for health care among patients in the medical safety net. *J Gen Intern Med* 2013; 28: 914-20.
35. Byambasuren O, Sanders S, Beller E, Glasziou P. Prescribable mHealth apps identified from an overview of systematic reviews. *NPJ Digit Med.* 2018 May 9;1:12.
36. Arnold, M. H. Teasing out artificial intelligence in medicine: an ethical critique of artificial intelligence and machine learning in medicine. *J. Bioeth. Inq.* <https://doi.org/10.1007/s11673-020-10080-1> (2021).
37. Schmitz, Rob (2020-04-02). "In Germany, High Hopes For New COVID-19 Contact Tracing App That Protects Privacy". NPR.org. Retrieved 2020-04-07.
38. Kelion, Leo (2020-04-16). "NHS coronavirus app to target 80% of smartphones". BBC News. Retrieved 2020-04-16.
39. Ferretti, Luca; Wymant, Chris; Kendall, Michelle; Zhao, Lele; Nurtay, Anel; Abeler-Dörner, Lucie; Parker, Michael; Bonsall, David; Fraser, Christophe (2020-03-31). "Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing". *Science.* 368 (6491): eabb6936. doi:10.1126/science.abb6936. PMC 7164555. PMID 32234805.
40. Delcker, Janosch; Brown, Stephen (2020-04-01). "Europe shares code for new coronavirus warning app". POLITICO. Retrieved 2020-04-01.
41. Subedi, N., Rawstorn, J. C., Gao, L., Koorts, H. & Maddison, R. Implementation of telerehabilitation interventions for the selfmanagement of cardiovascular disease: systematic review. *JMIR Mhealth Uhealth* 8, e17957 (2020).
42. Klersy, C. et al. Effect of telemonitoring of cardiac implantable electronic devices on healthcare utilization: a meta- analysis of randomized controlled trials in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 18, 195–204 (2016).
43. McManus, R. J. et al. Home and Online Management and Evaluation of Blood Pressure (HOME BP) using a digital intervention in poorly controlled hypertension: randomised controlled trial. *BMJ* 372, m4858 (2021).
44. Kadakia KT, Howell MD, DeSalvo KB, et al. Modernizing Public Health Data Systems Lessons From the Health Information Technology for Economic and Clinical Health (HITECH) Act. *JAMA.* 2021;326:385-386.
45. Almufleh A, Jacob J, The time is now: role of pragmatic clinical trials in guiding response to global pandemics. *Trials* 2021;22:229. <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05165-0>
46. DeMerle K, Angus, DC ; Seymour, CW. Precision Medicine for COVID-19. Phenotype Anarchy or Promise Realized? *JAMA.* 2021;325(20):2041-2042.

Информация об авторах:

Проф. Феррари Р., отделение сердечно-сосудистой хирургии, Медицинский центр GVM Care and Research, Больница Марии Сесилии (Италия), Сердечно-сосудистый центр, Университет Феррары (Италия);

Проф. Гуардигли Г., Сердечно-сосудистый центр, Университет Феррары (Италия);

Д-р Чималья П., отделение сердечно-сосудистой хирургии, Медицинский центр GVM Care and Research, Больница Марии Сесилии (Италия);

Проф. Тавацци Л., отделение сердечно-сосудистой хирургии, Медицинский центр GVM Care and Research, Больница Марии Сесилии (Италия);

Проф. Рапецци К., отделение сердечно-сосудистой хирургии, Медицинский центр GVM Care and Research, Больница Марии Сесилии (Италия), Сердечно-сосудистый центр, Университет Феррары (Италия);

Проф. Вардас П., кардиологическое отделение, Кардиологический центр, клиника Hygeia (Греция).

Author information:

Prof Ferrari R., Cardiovascular Department, GVM Care and Research, Maria Cecilia Hospital, Via Corriera 1 — 48033 Cotignola (RA), Italy; Cardiovascular Research Centre, Ferrara University, Via Aldo Moro 8, 44124 Ferrara, Italy;

Prof Guardigli G., Cardiovascular Research Centre, Ferrara University, Via Aldo Moro 8, 44124 Ferrara, Italy;

Dr Cimaglia P., Cardiovascular Department, GVM Care and Research, Maria Cecilia Hospital, Via Corriera 1 — 48033 Cotignola (RA), Italy;

Prof Tavazzi L., Cardiovascular Department, GVM Care and Research, Maria Cecilia Hospital, Via Corriera 1 — 48033 Cotignola (RA), Italy;

Prof Rapezzi C., Cardiovascular Department, GVM Care and Research, Maria Cecilia Hospital, Via Corriera 1 — 48033 Cotignola (RA), Italy; Cardiovascular Research Centre, Ferrara University, Via Aldo Moro 8, 44124 Ferrara, Italy;

Prof Vardas P., Department of Cardiology, Heart Sector, Hygeia Hospitals Group, Athens, Greece.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 615.1

ФАБРИКА ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ: КАК ЭТО РАБОТАЕТ?

Сычев Д. А., Мирзаев К. Б., Денисенко Н. П., Абдуллаев Ш. П.,
Гришина Е. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования «Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образования» Министерства
здравоохранения России, Москва, Россия

Контактная информация:

Денисенко Наталья Павловна,
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава
России,
ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, Москва,
Россия, 125993.
E-mail: natalypilipenko3990@gmail.com

Статья поступила в редакцию
17.09.2021 и принята к печати
20.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Несмотря на успехи в области изучения омиксных данных, в том числе фармакогеномных, до сих пор имеется нехватка надежных, воспроизводимых, чувствительных, специфичных и, главное, клинически полезных биомаркеров прогнозирования ответа на медикаментозное лечение в реальной клинической практике. Важнейшую роль в разработке и внедрении новых фармакогенетических биомаркеров может сыграть создание соответствующей экосистемы вокруг биомаркеров путем объединения в консорциумы академических и научных центров, биомедицинских лабораторий и фармацевтических компаний, компаний сферы IT-разработки и искусственного интеллекта. В статье представлен обзор так называемой «фабрики биомаркеров», позволяющей выстроить и систематизировать процесс внедрения фармакогеномного биомаркера в клиническую практику.

Ключевые слова: биомаркеры, консорциумы, научные группы, омиксные технологии, персонализированная медицина, фармакогенетика.

Для цитирования: Сычев Д.А., Мирзаев К.Б., Денисенко Н.П. и др. Фабрика фармакогенетических биомаркеров: как это работает? Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):33-42.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие во многих развитых странах на государственном уровне были приняты и реализованы различные стратегии развития персонализированной медицины, включающие финансирование крупных исследовательских проектов по разработке и внедрению новых омиксных технологий в клиническую практику. Примерами подобных программ являются: Приказ Минздрава России от 01.02.2019 № 42 (ред. от 24.08.2020) «Об утверждении ведомственной целевой программы «Развитие фундаментальной, трансляционной и персонализированной медицины», «Концепция предиктивной, превентивной и персонализированной медицины в Российской Федерации до 2025 года» и приоритетное направление научно-технологического развития до 2035 года — «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» в Российской Федерации, «The Precision Medicine Initiative» в Соединенных Штатах Америки, «The 100000 Genomes Project» в Великобритании, «National Strategy for Personalized Medicine» в Дании, «The Medea (Medicina Personalizada Aplicada, Applied Personalised Medicine)» в Испании, «Horizon 2020» в целом по Евросоюзу и многие другие [1–6]. Одной из наиболее динамично развивающихся омиксных технологий персонализированной медицины является геномика и, в частности, фармакогеномика, изучающая роль генетических особенностей пациента в нарушении ответа на лекарственный препарат [7]. При этом, несмотря на значительные успехи в области геномных технологий, снижение стоимости секвенирования и тестирования методом полимеразной цепной реакции, разработку национальных программ развития персонализированной медицины, оценка фармакогенетических биомаркеров для индивидуализации лечения до сих пор не получила широкого внедрения в клиническую практику. Помимо регуляторных, административных и финансовых барьеров, которые ранее были хорошо описаны [8], причинами подобного «провала» между передовыми научными достижениями в области фармакогенетики и реальной клинической практикой является отсутствие выстроенной системы: открытие нового биомаркера – разработка тест-системы – лабораторная и клиническая валидация – разработка рекомендаций по применению – клиническое использование; то есть так называемой «фабрики биомаркеров». Под «фабрикой био-

маркеров» в данном случае понимается разделение процесса изучения фармакогенетических биомаркеров на модули, где каждый участник или группа участников консорциума отвечает за определенный этап. В то же время все этапы тесно связаны и являются частью одного непрерывного процесса.

РОЛЬ ОБЪЕДИНЕНИЯ АКАДЕМИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ, КЛИНИК, БИМЕДИЦИНСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ И ВЛАДЕЛЬЦЕВ БИОБАНКОВ В ВЫСТРАИВАНИИ «ФАБРИК БИОМАРКЕРОВ»

Согласно глоссарию терминов Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) Biomarkers, EndpointS and other Tools (BEST), биомаркер — это характеристика, измеряемая в качестве индикатора патологических или нормальных биологических процессов или ответной реакции на воздействие или вмешательство [9]. Среди различных типов биомаркеров, предложенных FDA и Европейским медицинским агентством (EMA), к лекарственным препаратам применимы прежде всего: биомаркеры чувствительности (восприимчивости) или риска, прогностические биомаркеры, биомаркеры мониторинга, фармакодинамические биомаркеры или биомаркеры ответа, биомаркеры безопасности. Разработка биомаркера — системный многостадийный процесс, в котором степень достоверности доказательств, подтверждающих возможность использования биомаркера, увеличивается на пути от исследований в лабораторных условиях к клиническим исследованиям и реальной клинической практике [10]. Схематично процесс разработки и внедрения новых, в том числе фармакогенетических, биомаркеров состоит из следующих этапов:

1. Обоснование необходимости/потребности в биомаркере.
2. Разработка надежной и воспроизводимой методики и тест-систем измерения биомаркера.
3. Валидация биомаркера на тестовых, а затем и на наивных образцах пациентов.
4. Разработка алгоритма/схемы использования биомаркера для персонализации терапии.
5. Проспективная валидация с оценкой чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности, отрицательной прогностической ценности.

После подтверждения клинической полезности биомаркера для дальнейшего внедрения в клиническую практику необходима разработка компьютери-



Рис. 1. Структура «Фабрика биомаркеров»

зированных систем поддержки принятия решений (СППР), образовательных программ, проведение фармакоэкономического исследования (рис. 1).

В настоящее время в контексте разработки омиксных биомаркеров и сбора больших данных (big-data) все меньшую ценность как для науки, так и для биомедицинской промышленности представляет разработка и защита патентами отдельных биомаркеров или создание платных отдельных баз данных биомаркеров (например, генетических) без сопутствующей комплексной клинической информации о пациентах. С учетом увеличивающегося количества открытых обезличенных баз данных с огромным массивом омиксных данных о пациентах, важнейшую роль в разработке и внедрении новых фармакогенетических биомаркеров играет создание соответствующей экосистемы вокруг биомаркеров путем объединения в консорциумы академических и научных центров, биомедицинских лабораторий и фармацевтических компаний, компаний сферы IT-разработки и искусственного интеллекта. При этом академические центры со своей инфраструктурой (геномные лаборатории, коллекции образцов и базы клинических данных), клиническими центрами и образовательными компетенциями все чаще становятся важнейшим составным элементом в процессе разработки и внедрения омиксных биомаркеров [11]. В то же время ограничения финансирования, отсутствие возможности быстрого масштабирования инфраструктуры при появлении новых технологических возможностей, отсутствие строгих регуляторных требований и расширенных возможностей продвижения тест-систем у академических центров — эффективно компенсируют биомедицинские лаборатории и фармацевтические компании в составе консорциума.

Подобные объединения научно-исследовательских групп могут формироваться вокруг конкрет-

ной проблемы или нозологии. Примером может служить многоцентровая исследовательская инициатива United Europeans по развитию фармакогеномики при лечении рассеянного склероза (UEPNA*MS), представляющая собой объединение 11 исследовательских групп из 5 стран (Испания, Германия, Франция, Нидерланды, Россия), для изучения биомаркеров эффективности терапии рассеянного склероза [12]. Европейским союзом было выделено финансирование UEPNA*MS в размере 2,3 млн евро в рамках 7-й рамочной программы поддержки и поощрения исследований в Европейском исследовательском пространстве. Координатором UEPNA*MS выступил Университет Страны Басков, Испания.

Предпосылками к формированию UEPNA*MS послужили данные за 2007 год о 380 000 человек, страдающих рассеянным склерозом, среди 466 млн человек, проживающих в 28 европейских странах. При этом общие затраты на пациентов с рассеянным склерозом в Европе, по данным на 2005 год, составили 12,5 млрд евро, из которых 20 % (2,5 млрд евро) приходилось на стоимость лекарственных препаратов [13]. Поскольку лечение рассеянного склероза как препаратами первой линии (препараты интерферона бета и глатирамера ацетат), так и препаратом второй линии натализумбом эффективно лишь у части пациентов, возникает необходимость выявлять предикторы ответа на терапию. В том числе такая необходимость обусловлена значительным экономическим и социальным бременем данного заболевания для Европы, поражающего преимущественно молодых людей в возрасте 20–40 лет.

В команду UEPNA*MS были включены эксперты в области молекулярной биологии, неврологии, иммунологии, биоинформатики и компьютерного моделирования для изучения фармакогенетических биомаркеров эффективности препаратов интерферона бета и глатирамера ацетата в лечении рассеян-

ного склероза, а также для поиска новых биомаркеров или мишеней для терапевтического воздействия при рассеянном склерозе.

Основными направлениями работы междисциплинарной сети экспертов в области фармакогеномики применительно к рассеянному склерозу UERHA*MS были следующие:

- разработка клинических критериев и набор биоматериала; базы: клиники, в том числе при университетах, взаимодействующие между собой;
- исследования в области генетики, транскриптомики, протеомики, клеточной биологии; базы: научно-исследовательские институты и университеты, а также биотехнологическая компания-разработчик диагностических генетических тестов, иммунологических тестов для мониторинга биологических препаратов и др.;
- статистическое моделирование и разработка системных подходов; базы: клиника, где имеются возможности анализа ответа на иммунотерапию, университет (транскриптомные прогностические маркеры терапии рассеянного склероза) и научно-исследовательский институт (статистический анализ взаимосвязи генов в фармакогенетике препаратов, применяемых при рассеянном склерозе);
- экспериментальные модели и клинические исследования; базы: научно-исследовательские институты и университеты.

Первостепенной задачей UERHA*MS, наряду с научным аспектом, стало обучение молодых исследователей в новой наддисциплинарной области, которая включает в себя геномику, транскриптомику, протеомику, «клиническую науку» и «системную» биологию. Отмечается, что обучение по программе UERHA*MS будет способствовать взаимодействию и взаимному обмену между фундаментальными и клиническими, трансляционными исследованиями, между академической средой и индустрией, а также между лабораториями отдельных европейских стран. В конечном итоге обучающиеся получают навыки, способствующие изменениям в области персонализированной терапии рассеянного склероза.

В перспективе объединение в рамках UERHA*MS ляжет в основу междисциплинарной сети экспертов в области фармакогеномики применительно к рассеянному склерозу, что позволит участникам легче взаимодействовать для обмена знаниями и идеями. Эксперты отмечают, что несмотря на то, что большинство участников UERHA*MS уже имели опыт взаимодействия между собой, их сотрудничество ранее происходило спонтанно, поскольку не было систематизировано в единую сеть. Данный консорциум, как планируется, объединит внутри себя

коллекцию биоматериала необходимой мощности, инфраструктуру, ноу-хау и опытных ученых с необходимым набором компетенций. Аналогичные примеры представлены и в других областях: пульмонологии — «Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes» (U-BIOPRED) [14], онкологии — «Oncology Research Information Exchange Network» (ORIEN) [15] и другие.

Примеры создания подобных консорциумов все чаще стали встречаться и в Российской Федерации — консорциум «Генетика сердечно-сосудистых заболеваний» [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом многокомпонентности и сложности процесса разработки омиксных биомаркеров, в том числе фармакогеномных, необходимости создания крупных репозиториях образцов с сопутствующей базой клинических данных, потребности в гибкой и масштабируемой инфраструктуре, лабораторных, клинических, образовательных и IT-компетенциях, в настоящее время наиболее эффективной моделью изучения и выведения на рынок новых биомаркеров может стать создание экосистемы — «фабрики биомаркеров», позволяющей ускорить и систематизировать путь от разработки нового фармакогеномного биомаркера до его внедрения в клиническую практику.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Order of the Ministry of Health of Russia dated 01.02.2019 No. 42 (revised from 24.08.2020) "On approval of the departmental program" Development of fundamental, translational and personalized medicine". https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/042/771/original/Приказ_№_42_ВЦП.pdf?1549880974 (12 September 2021). In Russian [Приказ Минздрава России от 01.02.2019 г. № 42 (ред. от 24.08.2020) «Об утверждении ведомственной целевой программы "Развитие фундаментальной, трансляционной и персонализированной медицины"» https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/042/771/original/Приказ_№_42_ВЦП.pdf?1549880974 (12.09.2021)].
2. Decree of the Government of Russia dated May 21, 2013 No. 426 "On the federal target program" Research and development in priority areas of development of the scientific and technological complex of Russia for 2014-

2021". <https://fcpir.ru/business/priority-nauchno-tekhnologicheskogo-razvitiya/> (12 September 2021). In Russian [Постановление Правительства России от 21 мая 2013 г. № 426 «О федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2021 годы»]. <https://fcpir.ru/business/priority-nauchno-tekhnologicheskogo-razvitiya/> (12.09.2021)].

3. The precision medicine initiative. <https://obamawhitehouse.archives.gov/precision-medicine> (13 September 2021).

4. The 100,000 Genomes Project. <https://www.genomicsengland.co.uk/about-genomics-england/the-100000-genomes-project> (13 September 2021).

5. Health research and innovation of European Commission. Personalised medicine. https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/health-research-and-innovation/personalised-medicine_en (13 September 2021).

6. The project Clinical Implementation of Personalized Medicine in Health Services (Personalized Medicine Applied-MedeA). <https://www.proyectomedeas.es/en/home/> (13 September 2021).

7. Sychev DA. Applied pharmacogenetics. Tver: Izdatel'stvo Triada, 2021. p. 496. In Russian [Прикладная фармакогенетика: монография / под ред. Д. А. Сычева. М. Тверь: Издательство «Триада», 2021. с. 496].

8. Whitcomb DC. Barriers and research priorities for implementing precision medicine. *Pancreas*. 2019;48(10):1246-1249. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001415.

9. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> (14 September 2021).

10. Davis KD, Aghaiepour N, Ahn AH, et al. Discovery and validation of biomarkers to aid the development of safe and effective pain therapeutics: challenges and opportunities. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(7):381-400. DOI: 10.1038/s41582-020-0362-2.

11. Silva PJ, Schaibley VM, Ramos KS. Academic medical centers as innovation ecosystems to address population — omics challenges in precision medicine. *J Transl Med*. 2018;16(1):28. DOI: 10.1186/s12967-018-1401-2.

12. Vandenbroeck K, Comabella M, Tolosa E, et al. United Europeans for development of pharmacogenomics in multiple sclerosis network. *Pharmacogenomics*. 2009;10(5):885-894. DOI: 10.2217/pgs.09.33.

13. Sobocki P, Pugliatti M, Lauer K, et al. Estimation of the cost of MS in Europe: extrapolations from a multinational cost study. *Mult Scler*. 2007;13(8):1054-1064. DOI: 10.1177/1352458507077941.

14. Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes Project (U-BIOPRED). <https://europeanlung.org/en/projects-and-campaigns/past-projects/u-biopred> (14 September 2021).

15. Craig BM, Han G, Munkin MK, et al. Simulating the contribution of a biospecimen and clinical data repository in a phase II clinical trial: a value of information analysis. *Statistical methods in medical research*. 2016;25(4):1303-1312. DOI:10.1177/0962280213480282.

16. Consortium "Genetics of Cardiovascular Diseases". <https://cardiogenetics.ru> (14 September 2021). In Russian [Консорциум «Генетика сердечно-сосудистых заболеваний». <https://cardiogenetics.ru> (14.09.2021)].

Информация об авторах:

Сычев Дмитрий Алексеевич, д.м.н., профессор, профессор РАН, чл.-корр. РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии имени академика Б. Е. Вотчала, ректор ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Мирзаев Карин Бадавиевич, к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии имени академика Б. Е. Вотчала, заведующий НИЛ геномных предикторов нежелательных лекарственных реакций НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Денисенко Наталья Павловна, к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии имени академика Б. Е. Вотчала, заведующий отделом персонализированной медицины НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Абдуллаев Шерзод Пардабоевич, к.б.н., заведующий отделом молекулярной медицины НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Гришина Елена Анатольевна, д.б.н., доцент, директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

PHARMACOGENETIC BIOMARKER FACTORY: HOW DOES IT WORK?

**Sychev D. A., Mirzaev K. B., Denisenko N. P., Abdullaev S. P.,
Grishina E. A.**

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Corresponding author:

Denisenko Natalia P.,
Russian Medical Academy of Continuous
Professional Education,
st. Barrikadnaya, 2/1, str. 1, Moscow,
Russia, 125993.
E-mail: natalypilipenko3990@gmail.com

Received 17 September 2021; accepted
20 October 2021.

ABSTRACT

Despite the strides made in the study of -omics data, including pharmacogenomic data, there is still a lack of reliable, reproducible, sensitive, specific and, most importantly, clinically useful biomarkers for predicting response to drug treatment in real clinical practice. An important impact in the development and implementation of new pharmacogenetic biomarkers can be made by the creation of an appropriate ecosystem around biomarkers by uniting capacities of academic and research centers, biomedical laboratories and pharmaceutical companies, IT and artificial intelligence companies into consortiums. The article provides an overview of the so-called “biomarker factory”, which allows to build and systematize the process of introducing a pharmacogenomic biomarker into clinical practice.

Key words: biomarkers, consortiums, omics technologies, personalized medicine, pharmacogenetics, scientific groups.

For citation: Sychev DA, Mirzaev KB, Denisenko NP, et al. Pharmacogenetic biomarker factory: how does it work? Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):33-42.

INTRODUCTION

Over the past decade, various strategies for the development of personalized medicine have been implemented and implemented at the state level in many developed countries, including the financing of large research projects for the development and implementation of new omics technologies in clinical practice. Examples of such programs are: Order of the Ministry of Health of Russia of February 1, 2019

42 (as amended on August 24, 2020) “On approval of the departmental target program “Development of Fundamental, Translational and Personalized Medicine”, “The Concept of Predictive, preventive and personalized medicine in the Russian Federation until 2025” and the priority direction of scientific and technological development until 2035 -

“Transition to personalized medicine, high-tech healthcare and health saving technologies, including through the rational use of drugs (primarily antibacterial) in the Russian Federation, The Precision Medicine Initiative in the United States of America, The 100000 Genomes Project in the United Kingdom, National Strategy for Personalized Medicine in Denmark, “The MeDeA (Medicina Personalizada Aplicada, Applied Personalized Medicine)” in Spain, Horizon 2020 in the EU as a whole, and many others [1—6]. One of the most dynamically developing omics technologies of personalized medicine is genomics and, in particular, pharmacogenomics, which studies the role of the patient’s genetic characteristics in the disorder of response to a drug [7]. At the same time, despite considerable achievements in the field of genomic technologies, the reduction in the cost of sequencing and testing by polymerase chain reaction, the creation of national programs for the development of personalized medicine, the evaluation of pharmacogenetic biomarkers for individualization of treatment has not yet been widely implemented in clinical practice. In addition to regulatory,

administrative and financial barriers that were previously well described [8], the reasons for such a “failure” between advanced scientific achievements in the field of pharmacogenetics and real clinical practice is the lack of a solid system: the discovery of a new biomarker — the development of a test system — laboratory and clinical validation — the development of recommendations for use — clinical use; that is, the so-called “biomarker factory”. The “biomarker factory” in this case refers to the division of the process of studying pharmacogenetic biomarkers into modules, where each participant or group of participants in the consortium is responsible for a certain stage. At the same time, all stages are closely linked and are part of one continuous process.

THE ROLE OF THE ASSOCIATION OF ACADEMIC CENTERS, CLINICS, BIOMEDICAL LABORATORIES, PHARMACEUTICAL COMPANIES AND OWNERS OF BIOBANKS IN BUILDING “BIOMARKER FACTORIES”

According to the Food and Drug Administration (FDA) Biomarkers, EndPoints and other Tools (BEST) glossary of terms, a biomarker is a characteristic measured as an indicator of pathological or normal biological processes or response to exposure or intervention [9]. Among the various types of biomarkers proposed by the FDA and the European Medical Agency (EMA), the following are primarily applicable to drugs: sensitivity (susceptibility) or risk biomarkers, prognostic biomarkers, monitoring biomarkers, pharmacodynamic biomarkers or response biomarkers, safety biomarkers. Biomarker development is a systematic multi-stage process in which the degree of reliability of evidence confirming the possibility of using a biomarker increases on the way from research in laboratory conditions towards clinical trials and actual clinical practice [10]. Schematically, the process of developing and introduc-

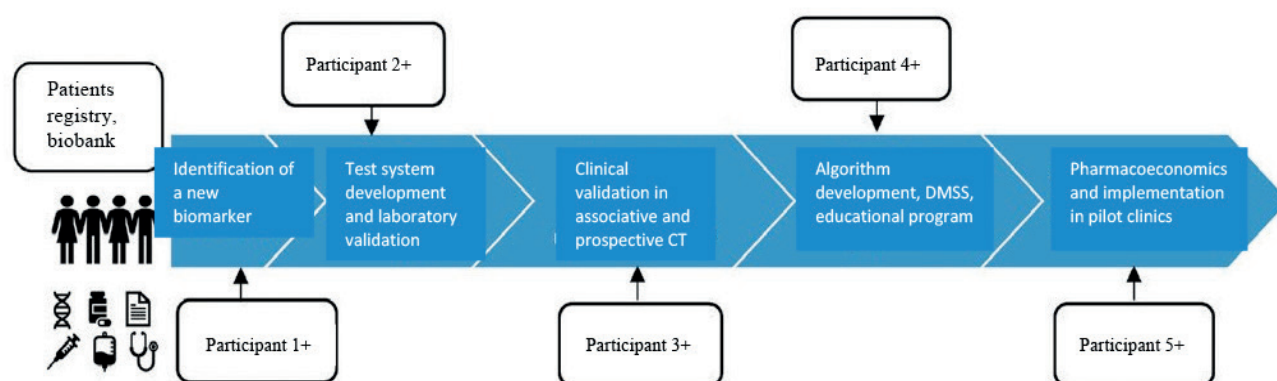


Fig.1. The structure of a “Biomarker Factory”

ing pharmacogenetic biomarkers, including new ones, consists of the following stages:

1. Justification of the need/demand for a biomarker.
2. Development of a reliable and reproducible methodology and test systems for biomarker measurement.
3. Biomarker validation on test and then on native patient samples.
4. Development of an algorithm/scheme for using a biomarker to personalize therapy.
5. Prospective validation with an assessment of sensitivity, specificity, positive prognostic value, negative prognostic value.

After confirming the clinical usefulness of a biomarker for further implementation into clinical practice, it is necessary to develop computerized decision-making support systems (DMSS), educational programs, conduct pharmacoeconomic research (Fig.1).

Currently, in the context of the development of omics biomarkers and the collection of big data, the development and patent protection of individual biomarkers or the creation of paid separate databases of biomarkers (for example, genetic) without accompanying comprehensive clinical information about patients are increasingly less valuable, both for science and for the biomedical industry. Taking into account the growing number of open depersonalized databases with a huge array of omics patient data, the creation of an appropriate ecosystem around biomarkers by combining academic and scientific centers, biomedical laboratories and pharmaceutical companies, IT development companies and artificial intelligence into consortia plays an important role in the development and implementation of new pharmacogenetic biomarkers. Concurrently, academic centers with their infrastructure (genomic laboratories, collection of samples and databases of clinical data), clinical centers and educational competencies are increasingly becoming the most important component in the process of developing and implementing omics biomarkers [11]. At the same time, funding restrictions, the lack of the ability to quickly scale the infrastructure when new technological opportunities arise, the lack of strict regulatory requirements and advanced opportunities for the promotion of test systems at academic centers are effectively compensated by biomedical laboratories and pharmaceutical companies as part of the consortium.

Such associations of research groups can be formed around a specific problem or nosology. An example is the United Europeans multi-center research initiative for the development of pharmacogenomics in the treatment of multiple sclerosis (UEPHA*MS), a group of 11 research groups from 5 countries (Spain, Germany,

France, Netherlands, Russia) to study biomarkers for the effectiveness of therapy for multiple sclerosis [12]. The European Union has allocated funding for UEPHA*MS in the amount of 2.3 million euros within the framework of the 7th Framework Program for Support and Promotion of Research in the European Research Area. UEPHA*MS was coordinated by the University of the Basque Country, Spain.

The prerequisites for the formation of UEPHA*MS were data for 2007 on 380 000 people suffering from multiple sclerosis, among 466 million people living in 28 European countries. At the same time, the total cost of patients with multiple sclerosis in Europe, as of 2005, was 12.5 billion Euros, of which 20% (2.5 billion Euros) was the cost of drugs [13]. Since treatment of multiple sclerosis with both first-line drugs (interferon beta and glatiramer acetate) and second-line natalizumab is effective only in some patients, there is a need to identify predictors of response to therapy. This need is also due to the significant economic and social burden of this disease for Europe, which affects mainly young people aged 20-40 years.

The UEPHA*MS team included experts in molecular biology, neurology, immunology, bioinformatics and computer modeling to study pharmacogenetic biomarkers of the effectiveness of interferon beta and glatiramer acetate drugs in the treatment of multiple sclerosis, as well as for the search for new biomarkers or targets for therapeutic effects in multiple sclerosis.

The main areas of work of the interdisciplinary network of experts in the field of pharmacogenomics in relation to multiple sclerosis UEPHA*MS were the following:

- development of clinical criteria and a collection of biomaterial; bases: clinics, including those at universities, interacting with each other;
- research in the field of genetics, transcriptomics, proteomics, cell biology; bases: research institutes and universities, as well as a biotechnology company developing diagnostic genetic tests, immunological tests for monitoring biological products, etc. ;
- statistical modeling and development of systemic approaches; bases: clinic where it is possible to analyze the response to immunotherapy, university (transcriptomic prognostic markers of therapy multiple sclerosis) and research institute (statistical analysis of the relationship between genes in the pharmacogenetics of drugs used in multiple sclerosis);
- experimental models and clinical trials; bases: research institutes and universities.

The primary task of UEPHA*MS, along with the scientific aspect, was to train young researchers in a new supradisciplinary field, which includes genomics, transcriptomics, proteomics, "clinical science" and

“systems” biology. It is noted that training under the UEPHA*MS program will promote interaction and mutual exchange between fundamental and clinical translational research, between the academic environment and industry, as well as between laboratories in individual European countries. Eventually, students will gain skills that contribute to changes in the field of personalized therapy for multiple sclerosis.

In the future, the association within the framework of UEPHA*MS will form the basis of an interdisciplinary network of experts in the field of pharmacogenomics in relation to multiple sclerosis, which will allow participants to interact more easily to exchange knowledge and ideas. Experts note that despite the fact that most of the UEPHA*MS participants have already had experience of interaction with each other, their co-operation was previously spontaneous, since it was not systematized in the single network. This consortium, as planned, will combine within itself a collection of biomaterial of the required capacity, infrastructure, know-how and experienced scientists with the necessary set of competencies. Similar measures are presented in other areas: pulmonology — “Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes” (U-BIO-PRED) [14], oncology — “Oncology” Research Information Exchange Network” (ORIEN) [15] and others.

Examples of the creation of such consortia have become increasingly common in the Russian Federation — the Consortium “Genetics of Cardiovascular Diseases” [16].

CONCLUSION

Taking into account the multicomponent character and complexity of the process of developing omics biomarkers, including pharmacogenomic ones, the need to create large repositories of samples with an accompanying database of clinical data, the need for flexible and scalable infrastructure, laboratory, clinical, educational and IT competencies, currently the most effective model for studying and launching new biomarkers on the market can be the creation of an ecosystem — a “biomarker factory” allowing to accelerate and systematize the path from the development of a new pharmacogenomic biomarker to its introduction into clinical practice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Order of the Ministry of Health of Russia dated 01.02.2019 No. 42 (revised from 24.08.2020) “On approval of the departmental program” Development of

fundamental, translational and personalized medicine”. https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/042/771/original/Приказ_№_42_ВЦП. pdf?1549880974 (12 September 2021). In Russian [Приказ Минздрава России от 01.02.2019 г. № 42 (ред. от 24.08.2020) «Об утверждении ведомственной целевой программы “Развитие фундаментальной, трансляционной и персонализированной медицины”» https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/042/771/original/Приказ_№_42_ВЦП. pdf?1549880974 (12.09.2021)].

2. Decree of the Government of Russia dated May 21, 2013 No. 426 “On the federal target program” Research and development in priority areas of development of the scientific and technological complex of Russia for 2014–2021”. <https://fcpir.ru/business/priority-nauchno-tekhnologicheskogo-razvitiya/> (12 September 2021). In Russian [Постановление Правительства России от 21 мая 2013 г. № 426 «О федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2021 годы»». <https://fcpir.ru/business/priority-nauchno-tekhnologicheskogo-razvitiya/> (12.09.2021)].

3. The precision medicine initiative. <https://obamawhitehouse.archives.gov/precision-medicine> (13 September 2021).

4. The 100,000 Genomes Project. <https://www.genomicsengland.co.uk/about-genomics-england/the-100000-genomes-project> (13 September 2021).

5. Health research and innovation of European Commission. Personalised medicine. https://ec.europa.eu/info/research-and-innovation/research-area/health-research-and-innovation/personalised-medicine_en (13 September 2021).

6. The project Clinical Implementation of Personalized Medicine in Health Services (Personalized Medicine Applied-MedeA). <https://www.proyectomedeas.es/en/home/> (13 September 2021).

7. Sychev DA. Applied pharmacogenetics. Tver: Izdatel'stvo Triada, 2021. p. 496. In Russian [Прикладная фармакогенетика: монография / под ред. Д. А. Сычева. М. Тверь: Издательство «Триада», 2021. с. 496].

8. Whitcomb DC. Barriers and research priorities for implementing precision medicine. *Pancreas*. 2019;48(10):1246–1249. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001415.

9. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> (14 September 2021).

10. Davis KD, Aghaeepour N, Ahn AH, et al. Discovery and validation of biomarkers to aid the development of safe and effective pain therapeutics: challenges and opportunities. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(7):381–400. DOI: 10.1038/s41582-020-0362-2.

11. Silva PJ, Schaibley VM, Ramos KS. Academic medical centers as innovation ecosystems to address

population — omics challenges in precision medicine. *J Transl Med.* 2018;16(1):28. DOI: 10.1186/s12967-018-1401-2.

12. Vandenbroeck K, Comabella M, Tolosa E, et al. United Europeans for development of pharmacogenomics in multiple sclerosis network. *Pharmacogenomics.* 2009;10(5):885-894. DOI: 10.2217/pgs.09.33.

13. Sobocki P, Pugliatti M, Lauer K, et al. Estimation of the cost of MS in Europe: extrapolations from a multinational cost study. *Mult Scler.* 2007;13(8):1054–1064. DOI: 10.1177/1352458507077941.

14. Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes Project (U-BIOPRED). <https://europeanlung.org/en/projects-and-campaigns/past-projects/u-biopred> (14 September 2021).

15. Craig BM, Han G, Munkin MK, et al. Simulating the contribution of a biospecimen and clinical data repository in a phase II clinical trial: a value of information analysis. *Statistical methods in medical research.* 2016;25(4):1303–1312. DOI: 10.1177/0962280213480282.

16. Consortium “Genetics of Cardiovascular Diseases”. <https://cardiogenetics.ru> (14 September 2021). In Russian [Консорциум «Генетика сердечно-сосудистых заболеваний». <https://cardiogenetics.ru> (14.09.2021)].

Author information:

Sychev Dmitry A., MD, PhD, Professor, Professor of the Russian Academy of Sciences (RAS), Corresponding Member of RAS, Head of B. E. Votchal Department of Clinical Pharmacology and Therapy, President of Russian medical academy of continuous professional education;

Mirzaev Karin B., MD, PhD, Assistant Professor of B. E. Votchal Department of Clinical Pharmacology and Therapy, Head of Adverse Drug Reactions Genomic Predictors Research Laboratory in Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian medical academy of continuous professional education;

Denisenko Natalia P., MD, PhD, Assistant Professor of B. E. Votchal Department of Clinical Pharmacology and Therapy, Head of the Department of Personalized Medicine in Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian medical academy of continuous professional education;

Abdullaev Sherzod P., PhD (Biol.), Head of the Department of Molecular Medicine in Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian medical academy of continuous professional education;

Grishina Elena A., PhD (Biol.), Assistant Professor, Director of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian medical academy of continuous professional education.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-05

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА — ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ КОНЦЕПЦИИ И ПУТИ ПРАКТИЧЕСКОЙ ЕЕ РЕАЛИЗАЦИИ

Мокрышева Н. Г., Мельниченко Г. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Контактная информация:

Мельниченко Галина Афанасьевна,
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»
Минздрава России,
ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, Москва,
Россия, 117292.
E-mail: pr_melnichenko@mail.ru

Статья поступила в редакцию
02.09.2021 и принята к печати
11.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Персонализированная медицина — новая парадигма в здравоохранении, основанная на понимании значимости индивидуального подхода в лечении и базирующаяся на знаниях о геномных предикторах и постгеномных маркерах различных заболеваний. Дополняющая концепцию доказательной медицины, персонализированная медицина открывает перед врачами и исследователями новые возможности более эффективного лечения пациентов и одновременно ставит множество медицинских, этических и правовых вопросов.

В настоящей статье приводится описание текущего состояния проблемы с конкретными примерами реализации данного подхода ведущими учреждениями Российской Федерации (в т.ч. в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России).

Ключевые слова: доказательная медицина, орфанные заболевания, персонализированная медицина, трансляционная медицина, фармакогенетика, эндокринология.

Для цитирования: Мокрышева Н.Г., Мельниченко Г.А. Персонализированная медицина — этапы формирования концепции и пути практической ее реализации. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):43-58.

ВВЕДЕНИЕ

Персонализированная медицина — новая парадигма в здравоохранении, предупредительная, профилактическая медицина, построенная на геномных предикторах и постгеномных маркерах, одними из первых в нашей стране концепцию персонализированной медицины начали разрабатывать эндокринологи, и уже в далеком 2011 году И. И. Дедов выступил с программным докладом на эту тему на Президиуме РАМН. Пленарная лекция академика И. И. Дедова через год на Съезде эндокринологов была посвящена рассказу о важности и, самое главное, потенциальной практической пользе, вполне достижимой в ближайшем будущем, реализации этой концепции. В том же году авторитетнейшие российские ученые И. И. Дедов, В. П. Чехонин, А. Арчаков и другие выступили с программной статьей о необходимости развития персонализированной медицины в журнале «Вестник РАМН» [1].

Разумеется, сама идея персонализации в медицине не нова, и концепция «лечить не болезнь, а человека», идущая от Гиппократов, классика русской терапевтической школы.

Но в настоящее время эта идея обретает новый смысл, и ее развитие поддерживается на государственном уровне. Разработка и внедрение технологий персонализированной медицины регламентированы в Стратегии развития медицинской науки в России до 2025 года и Стратегии научно-технологического развития России до 2035 года, утвержденной указом Президента РФ в декабре 2016 года.

В настоящей публикации авторы предлагают рассмотреть этапы формирования концепции персонализированной медицины и опыт ее практической реализации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Конкретные инструменты персонализации различны в разные периоды развития технологий.

В эндокринологии всегда подчеркивалась персонализация выбора лечения, даже в те далекие годы, когда и выбор-то по сути был мал. Достаточно вспомнить чрезвычайно важные для обучения врачей «Алгоритмы лечения больных с диабетом», издававшиеся с 2002 по 2020 год, в которых предельно тщательно разбиты принципы максимально индивидуализированного подхода — от массы тела и стажа диабета до учета осложнений [2, 3].

Уже в начале развития концепции персонализированной медицины были попытки противопоставления ее идеям медицины, построенной на доказанном, при этом последняя снисходительно именовалась

«медициной статистических данных», «поваренной книгой», старым анекдотом из XVIII века (намек на требования энциклопедистов о доказательствах в науке), а персонализация скорее ассоциировалась с так называемой трансляционной медициной, или медициной, базирующейся на скорейшем внедрении новейших достижений науки в практику, и рассматривалась сквозь призму мощных технологий машинного обучения и искусственного интеллекта.

Действительно, философская основа медицины, построенной на доказательствах (далее сокращено ЕВМ, evidence based medicine), хотя и сформулирована в 80-х годах прошлого века, восходит к XVIII веку, поскольку концепция требует проведения правильных исследований для ответа на правильно сформулированный вопрос. ЕВМ и сегодня остается темой горячих дебатов между клиницистами, организаторами здравоохранения и населением.

Как определяет ЕВМ D. Sackett [4], это добросовестное, ясное и подробное, базирующееся на здравом смысле, обдуманное применение наилучших на сегодня клинических данных для принятия решения о лечении конкретного пациента. Практика ЕВМ соединяет опыт конкретного клинициста с наилучшими доказанными данными, полученными из систематических, корректно построенных исследований, и для хорошего клинициста важны эти две составные части в принятии решения по лечению. Сама концепция доказательств многогранна и не всегда безупречно выявляет причинно-следственные отношения, те самые, которые так важны для клинициста с позиций профилактической работы.

Но если доказательств требуется много, и они не всегда очевидно однонаправлены, то чем интересна сегодня, в XXI веке, медицина, построенная на доказанном? Хотя мы поддерживаем принципы ЕВМ, полностью ли мы можем решить с ее помощью все проблемы? Предполагается, что ЕВМ направлена на преодоление пропасти между хорошим качеством клиническими исследованиями и клинической практикой, но всегда ли это удастся? Популяционные исследования решают многие задачи, важные для оптимального подхода к здоровью групп населения, но вряд ли могут решить индивидуальные задачи. Увы, не все исследования одинакового качества, и данные вполне могут быть противоречивыми их. Тем не менее доказательная медицина дает нам опору в принятии клинически важного решения, объединяет наши личные знания, знания других экспертов, позволяя учесть предпочтения пациентов, улучшает медицинскую практику и снижает вероятность ошибок. Но как бы ни хороши были наши сегодняшние представления об оптимальном лечении, ему не хватает индивидуализации, и допу-

шение о том, что все базирующиеся на принципах ЕВМ методы лечения всегда напоминают идеально смазанную работающую машину, наивны.

Может быть, нашей первоочередной задачей является максимальное ускорение развития так называемой «трансляционной медицины» — нового направления в биомедицине, обеспечивающего максимально быструю передачу полученных с помощью хорошо спланированных фундаментальных исследований данных в клиническую практику?

Важную роль в развитии этого направления в нашей стране сыграли работы академика РАН Е. В. Шляхто, подчеркивающие, что огромные достижения медицинской и биологической науки в настоящее время не находят должного применения в практике врача, и это проблема мировой медицины [5]. Научная мысль развивается стремительнее, чем ее реальные результаты успевают быть адаптированными в практической медицинской сфере. Преодолению пропасти между фундаментальными науками и клиникой поможет направление, называемое «трансляционной медициной», цель которого в ускоренном внедрении новейших технологий в реальную практику. Что очень важно — трансляционная медицина «заточена» на решение конкретных практических задач, это «технологический штурм», проводимый по заказу из клиники. Даже сегодня есть некоторая путаница в понимании того, что трансляционная медицина — не телемедицина, не дистанционное обучение в передовых клиниках [6].

Трансляционная медицина — это четко сформулированная клиническая задача, решаемая в тесном контакте между специалистами в области фундаментальной биологии, физики, химии и клиницистами, при этом результат должен быть получен максимально быстро и с наименьшими затратами. Академиком РАН Е. В. Шляхто была предложена форма кластерного объединения специалистов фундаментальной медицины и клиницистов с приобщением бизнеса, и в Центре Алмазова начато в 2017 году издание журнала «Трансляционная медицина».

Разумеется, и клиническая, и доказательная, и трансляционная медицина — различные ипостаси одной и той же медицины, в которой строгое следование оптимальным научным принципам построения клинических исследований позволяет, оценивая «респондеров» и «нореспондеров», выделять таргетные группы для поиска оптимальных методов лечения, максимально быстро находить принципиально новые методы лечения и профилактики, и в дальнейшем, сопоставляя с индивидуальными данными, в том числе с геномными предикторами, исполнить мечту всех поколений врачей, найдя способ обеспечить каждого человека пра-

вильным лечением в правильное время, избегая побочных явлений и неудач в лечении. Основные отрасли медицины, где применяются новые принципы, — онкология, фармация и фармакогеномика. Последняя занимается изучением реакций организма на медицинские препараты в зависимости от индивидуальных наследственных факторов.

Однако развитие персонализированной медицины происходит и по другим направлениям, и не удивительно, что сразу в лидеры развития персонализированной медицины вырвалась фармакогеномика. Неслучайно еще в 2017 году, когда ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России начал издавать электронный журнал *World of Personalized Medicine*, главный редактор академик И. И. Дедов предложил открыть журнал редакционной статьей чл.-корр. РАН Д. А. Сычева, крупнейшему специалисту в области фармакогеномики. Эта статья, озаглавленная «Этапы разработки и внедрения технологий персонализированной медицины в клиническую практику: роль Минздрава России и Российской академии наук» [7], содержала актуальные и сегодня постулаты о путях развития реальной персонализации лечебного процесса, разработке и внедрению технологий персонализированной медицины. По мнению Д. А. Сычева, «персонализированная медицина — это новая доктрина современного здравоохранения, в основе которой лежит использование новых методов молекулярного анализа (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика, микробиомика) для улучшения оценки предрасположенности (прогнозирование) к болезням и управления ими». Иными словами, уже в первых публикациях прозвучала крайне интересная мысль — концепция персонализированной медицины требует не только привлечения научных ресурсов, но и организационных усилий, поскольку является «доктриной здравоохранения». «Сутью внедрения методологии персонализированной медицины в клиническую практику», пишет Д. А. Сычев, «является подход к оказанию медицинской помощи на основе индивидуальных характеристик пациентов, для чего они должны быть распределены в подгруппы в зависимости от предрасположенности к болезням и ответа на то или иное вмешательство, которое должно быть применено у тех, кому оно действительно пойдет на пользу, для кого будет безопасно и приведет к экономии затрат».

В передовой статье подчеркивалась необходимость этапного развития концепции персонализации в медицине, необходимость накопления данных, в том числе с помощью биобанков, и разработка алгоритмов / моделей персонализации на основе биоинформационных технологий с их клинической валидизацией, использование в реаль-

ной клинической практике персонализированных подходов при применении профилактических и лечебных мероприятий путем формирования и поддержания электронного регистра пациентов, которым проводилась персонализация, с периодической оценкой изменений клинического состояния (в т. ч. исходов), а также сохранение биоматериала этих пациентов.

Эта важная «дорожная карта», естественно с внесенными временем коррективами, исполняется сейчас. Первый номер журнала включал обзоры литературы о фармакогенетических исследованиях эффективности и безопасности антипсихотических лекарственных средств, позволивших выделить несколько наиболее значимых полиморфизмов, которые оказывают выраженное влияние на возникновение нежелательных лекарственных реакций при приеме антипсихотических лекарственных средств, и об индивидуализации использования тамоксифена в лечении рака молочной железы [8, 9], при этом сопоставление этих обзоров, выполненных на высоком методическом уровне, дает четкое представление о том, что не только геномные исследования определяют персонализированный подход к лечению, но и необходимо использование еще других «омиксных» технологий для безупречной индивидуализации лечения. Клинические примеры, регулярно публиковавшиеся в журнале, в основном из Института детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, рассказывали об уникальных клинических наблюдениях. Еще недавно казавшееся фантастикой лечение препаратами сульфонилмочевины младенцев с сахарным диабетом. Особая форма — неонатальный сахарный диабет — не требует, как оказалось, лечения инсулином, и большинство больных с мутациями в генах АТФ-зависимых К-каналов могут быть успешно компенсированы на фоне лечения препаратами сульфонилмочевины. Так, из 70 больных с неонатальным сахарным диабетом компенсация углеводного обмена на фоне монотерапии глибенкламидом была достигнута в 22/35 (65,7 %) случаях. При этом авторы подтвердили ранее известные по зарубежной литературе сведения о диагностической ценности обнаружения мутаций в гене KCNJ11, и обнаружили важное наличие ассоциации между локализацией мутации в гене KCNJ11, тяжестью клинических проявлений заболевания и чувствительностью пациентов к препаратам сульфонилмочевины. Также было подтверждено повышение потребности в глибенкламиде у пациентов с длительным течением неонатального диабета. В последние годы Институт клинической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и Институт детской

эндокринологии много и успешно работают в сфере изучения костной ткани и как акцептора, и как продуцента гормонов, и патологические состояния вследствие мутации в гене FGF23, равно как и изучение опухолей, продуцирующих фосфатурический фактор роста фибробластов 23 и ассоциированные с этой патологией гипофосфатемические состояния. Уникальный, первый в России случай аутосомно-доминантного гипофосфатемического рахита представила К. Куликова и соавторы из ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России [10], диагноз был подтвержден обнаружением гетерозиготной мутации c.536G>A:p.R179Q в гене FGF23. Жизнь журнала (его вышедшие номера доступны по ссылке <https://www.wjpm-endojournals.ru/jour/index>) оказалась нелегкой, и можно приветствовать инициативу Центра Алмазова по организации нового «Российского журнала персонализированной медицины», доступного как в электронной форме, так и на бумажных носителях, объединяющего ученых и врачей разных специальностей, и привлечению к работе в этом новом журнале всех обладателей грантов по работе в области персонализированной медицины, при этом важно сохранение баланса между фундаментальными работами, описаниями уникальных клинических случаев и обсуждением биоэтики персонализации и цифровизации.

Именно у больных с орфанными заболеваниями сегодня наиболее ярко проявляют себя преимущества персонализированного лечения, и эти больные дают толчок для изучения геномной патологии и позволяют выявить менее агрессивные формы заболевания у родственников. Поэтому важной функцией нового журнала, по нашему мнению, должна стать еще и библиотека клинических наблюдений, позволяющая «перебросить мостик» от лабораторий молекулярной генетики к постели больного.

Геномные предикторы позволяют предсказывать риски заболеваний, а постгеномные маркеры, лежащие в основе диагностического поиска, позволяют вести индивидуальный мониторинг здоровья человека, находить и нивелировать патологические процессы на самой ранней стадии и/или назначать сугубо индивидуальное лечение.

В настоящее время четыре медицинских центра получили грантовое финансирование на развитие модели персонализированной медицины. И хотя начало работы над грантами пришлось на трудные годы, когда силы врачей и средства были отвлечены на борьбу с пандемией новой коронавирусной инфекции, несомненным прогрессом является развитие новых лабораторных структур и цифровизации медицины ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России — многопрофильного исследо-

вательского медицинского центра, не имеющего аналогов в мире, состоящего из пяти клинических институтов: диабета, клинической эндокринологии, детской эндокринологии, репродуктивной эндокринологии, онкоэндокринологии, а также Института высшего и дополнительного профессионального образования и Института персонализированной медицины. Уникальный клинический опыт ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России сформировал воспроизводимую систему обучения врачей технологиям диагностики различных эндокринопатий, от социально значимых (диабет в его различных формах с многообразными осложнениями и любым стажем заболевания) до редчайших (орфанных) заболеваний, но сейчас, когда предстоит создание новых направлений и новых лабораторий, необходимо будет изменять учебные программы. В соответствии с указом Президента Российской Федерации от 7 мая 2018 года № 204 ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава России как учреждение, совмещающее медицинскую, лечебную и научную деятельность с важнейшей педагогической функцией подготовки квалифицированных кадров для здравоохранения, получило право реализовать программу по созданию «Национального центра персонализированной медицины эндокринных заболеваний» (НМЦПМЭЗ). Центром предложено уникальное интегративное решение проблемы персонализации диагностики и лечения путем сопоставления геномных данных с метаболомными и гормональными в группах «природных моделей» первичных и вторичных нарушений в одной из основных интегративных систем организма — эндокринной системе. Фундаментальные исследования, проводимые на базе НМИЦЭ, будут расширены за счет создаваемых *de novo* лабораторий, в частности лаборатории общей, молекулярной и популяционной генетики, клеточных технологий, биоинформатики, метаболомных и протеомных исследований с лабораторией микробиоты, лаборатории редактирования генома, иммунологии и аутоиммунных заболеваний, неинвазивных технологий диагностики эндокринопатий, клэмп-технологий и фармакокинетики, фармакогеномики, интеллектуальных математических технологий и персонализации диагностики и прогнозирования, эмбриологии и сравнительной эндокринологии, молекулярной онкоэндокринологии.

При всех сложностях работы в 2020–2021 годах, когда центр был частично перепрофилирован под клинику для лечения больных с COVID-19, начата работа над реализацией заложенных в основу центра проектов, причем большинство из них работает

на основе заблаговременно созданной базы данных в первую очередь больных с опухолями гипофиза, синдромами множественных эндокринных опухолей, опухолями паращитовидных желез и болезнями скелета. За год работы можно уверенно говорить о существенном продвижении в изучении молекулярных основ патологии околощитовидных желез и публикации из ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России 2020–2021 годов, в которых уже подведены предварительные итоги, выявили важность и раннего выявления гиперкальциемии и важность оценки гиперпаратиреоза не только как изолированного синдрома, но как возможного дебюта генетически детерминированного заболевания [11–13], при этом важным базисом стало создание базы данных больных гиперпаратиреозом [14]. И уже мы рассматриваем возможности создания новых клеточных продуктов для лечения состояния с дефицитом гормонов, в том числе выращивание в чашке Петри аутентичной околощитовидной железы из собственных клеток пациента. На наш взгляд, очень важны и полученные за эти два года данные о роли посттранскриптомной системы сайленсинга ДНК-миРНК в дифференциальной диагностике различных форм гиперкортизолизма [15]. Эти работы по изучению роли некодирующих миРНК при эндокринопатиях в Центре ведутся давно, но мы полагаем, что в новых условиях мы сможем систематизировать полученные ранее сведения и транслировать их в практику [16–18], также продолжились в центре и разработки предикторных моделей для оценки ремиссии / выздоровления после удаления кортикотропином [19].

Если траектория организационных и научных перспектив персонализации в здравоохранении при всей сложности ясна, то биоэтические и экономические вопросы мало обсуждаются.

Сегодня мы пока широко не задумываемся над этическими вопросами расширения наших знаний о предикторах болезней, о том бремени, который получает человек и его семья по итогам полногеномного скрининга новорожденных, когда будут сформулированы риски заболеваний, которые проявятся на четвертом-пятом десятке лет, о психологических последствиях сведений о «роковой неизбежности болезни». При этом возникает вопрос о риске распространения личной информации, полученной на основании знаний генотипа. Как будет соблюден баланс научного интереса, интересов социума и личности?

Разумеется, сама идея замены «одного размера для всех» как недостатка EBM [20] на идею «правильного лекарства для правильного пациента в правильное время» как лозунга персонализации лечения была бы немыслима без достижений генетики

и завершения проекта «Геном Человека — Human Genome Project». Хотя вариабельность постгеномных изменений и стиля жизни никем не отрицается, максимально быстрое получение геномной информации необходимо для решения вопросов фармакогеномики в первую очередь по мнению FDA [21]. Это, по сути, обязует нас в будущем подтверждать специфичность болезни и выбирать оптимальное лечение на молекулярном уровне, транслировать геномную информацию в практику медицины и общественного здоровья.

С первого взгляда преимущества очевидны — знание рисков дает стратегию их предотвращения / преодоления, ускорение диагностики облегчает поиск лечения, увеличивая его эффективность и снижая опасность нежелательных явлений.

Скептики же подчеркивают, что персонализированная медицина породит, как и многие другие достижения человечества, новые этические вызовы — начиная с генетических тестов неясного значения без очевидной цели [22].

Трезвая оценка возможностей реальной персонализации на каждом новом этапе развития общества может обеспечить долгую и эффективную жизнь парадигме персонализации, чрезмерный восторг и «хайп», используя глоссарий сегодняшнего дня, — породить ошибки и погубить важное направление, и понимание этики персонализации также должно быть предметом обсуждения на страницах наших журналов.

Какие же очевидные проблемы обсуждаются уже сегодня?

Бесспорно, беспокоит высокая стоимость генетических исследований, неравенство в доступе к ресурсам здравоохранения, противопоставление личных и общественных прав на доступ к информации, дискриминация и генетическая стигматизация, вторжение в глубоко личное пространство, случайные находки, новый статус, близкий к исследовательскому, генетическому консультированию, негативное бесспорное влияние на взаимоотношения врача и пациента — искупается ли все это улучшением качества медицинской помощи для каждого и для всех в обществе?

Бесспорно, как мы уже подчеркивали, главное ожидание общества — безопасная фармакогенетика, эффективные лекарства без побочных эффектов (что, кстати, противоречит старому медицинскому правилу «без побочных эффектов не бывает эффективных лекарств»), конечно, это будут более дорогие лекарства, но лекарства сами по себе — не самая дорогая расходная часть бюджета здравоохранения, и, кроме того, акцент на безопасности крайне рациональный подход, поскольку именно генетические

факторы — одни из важнейших предикторов нежелательных побочных явлений, особенно тяжелых.

Серьезным возражением для мирового сообщества применительно к идее развития генетических тестов является их экономическая недоступность для многих стран [23].

Трудно возразить против генетического тестирования в группах риска, но в дальнейшем тесты будут удешевляться и становиться все доступнее, что позволит изменять и дизайн клинических исследований, с селекцией генетически наиболее благоприятных когорт, уменьшением их объема, ускорением времени исследований и снижением стоимости, возможно, исчезнет необходимость в 1–2 фазах, и новая модель клинических исследований на подходе.

Есть серьезная обеспокоенность и в отношении готовности фармбизнеса производить препараты, которые будут близки по предназначению к препаратам для орфанных заболеваний. В самом деле, если мы выявим некие генетические подгруппы среди весьма распространенных болезней, которым не нужны банальные и хорошо продающиеся лекарства, а нужны редкие препараты — поддержано ли будет такое производство? Как общество поддержит возможную расовую или социальную «окраску» диспропорции в потребности в таких лекарствах при однотипных болезнях?

Пока еще нам не приходится решать эти проблемы, но одна из важнейших этических организационных сторон касается так называемых биобанков и их функции. Работая в этом направлении уже несколько лет, мы столкнулись с этическими проблемами организации биобанков, включая необходимость сочетания доступности образцов и сохранения медицинской тайны при обязательном наличии информированного согласия.

Не меньший скептицизм вызывает и изменение взаимоотношений врача и больного при появлении генетической информации. На сегодня лечащие врачи, таргетно исследующие панель генов в поисках ответа на вопрос о точном диагнозе, прибегают к помощи генетиков для ответов на вопросы пациентов, получающих генетическую информацию. Ошибочная интерпретация сложных и неоднозначных данных может сводить на нет все заложенные в персонализации бонусы.

Казалось бы, очевидно замечательная идея — базирующийся на генетических данных отбор пациентов подразумевает доступность генетических баз данных больных фармфирмам, равно как и доступность личных данных из историй болезни.

Биоэтика генетических исследований потребует и максимально полного разъяснения ограниченно-

сти наших сегодняшних (и, может быть, завтрашних и послезавтрашних) знаний о генетической информации и ее реализации на уровне организма, ясного указания на пути использования и хранения биообразцов, кодирования и сохранения анонимности, способов изъятия образцов и отзыва результатов исследования, возможности использования широкой / ограниченной сети национальных / международных баз. Очевидны риски знакомства с этими базами страховых компаний и работодателей. Таким образом, защита персональных данных как никогда актуальна применительно к персонализированной медицине, и персонализированная медицина может создать кризис доверия между различными учреждениями здравоохранения, эта озабоченность высказывается с момента реализации Human Genome Project.

Сегодня идеальные взаимоотношения врача и пациента включают, насколько это возможно, сотрудничество и понимание пациентом целей лечения, а врачом — пожеланий и приоритетов пациента... Насколько это будет достижимо в цифровую эпоху персонализированной медицины!

И, наконец, последние, но от этого не менее значимые возражения — уже сегодня стоимость уникальных препаратов для лечения орфанных заболеваний зашкаливает, будут ли финансовые возможности страховых компаний обеспечивать всех больных, например онкологическими заболеваниями, необходимыми лекарствами и тестами?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, реализация концепции персонализированной медицины сопряжена не только с большими надеждами и успехами исследователей и врачей, но и с определенными трудностями. Вероятно, все эти дискуссионные вопросы, как и научные проблемы, тоже станут предметом обсуждения на страницах нового журнала, которому автор статьи желает успеха и долгой жизни!

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dedov II, Tyul'pakov AN, Chekhonin VP, et al. Personalized medicine: State-of-the-art and prospects. *Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2012;67(12):4–11. DOI: 10.15690/vramn.v67i12.474. In Russian [Дедов И.И., Тюльпаков А.Н., Чехонин В.П.

и др. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. Вестник Российской академии медицинских наук. 2012;67(12):4–11. DOI: 10.15690/vramn.v67i12.474].

2. Dedov II, Shestakova MV, Maksimova MA. Federal target program "Diabetes mellitus" (guidelines). M.: Izdatel'stvo Media Sfera; 2002. 88 p. In Russian [Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет» (методические рекомендации). М.: Издательство Медиа Сфера; 2002. 88 с.].

3. Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AYU. Standards of specialized diabetes care (9th Edition). *Diabetes Mellitus*. 2019;22(1S1):1–144. DOI: 10.14341/DM221S1. In Russian [Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом (9-й выпуск). Сахарный диабет. 2019;22(1S1):1–144. DOI: 10.14341/DM221S1].

4. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, et al. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ*. 1996;312(7023):71–72. DOI: 10.1136/bmj.312.7023.71.

5. Shlyakhtov EV. Translational medicine. SPb.: Severo-Zapadnyj federal'nyj medicinskij issledovatel'skij centr im. V. A. Almazova, 2010. 415 p. In Russian [Шляхто Е.В. Трансляционная медицина. СПб.: Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, 2010. 415 с.].

6. Mediouni M, Schlatterer DR, Madry H, et al. A review of translational medicine. The future paradigm: how can we connect the orthopedic dots better? *Curr Med Res Opin*. 2018;34(7):1217–1229. DOI: 10.1080/03007995.2017.1385450.

7. Sychev DA. Stages of development and implementation of personalized medicine technologies in clinical practice. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):1–4. In Russian [Sychev D.A. Stages of development and implementation of personalized medicine technologies in clinical practice. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):1–4].

8. Zastrozhin MS, Sychev DA, Grishina EA, et al. Pharmacodynamic gene polymorphism and adverse drug reaction then applying antipsychotic drugs. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):5–12. DOI: 10.14341/WJPM9265. In Russian [Застрожин М.С., Сычев Д.А., Гришина Е.А. и др. Фармакодинамические полиморфизмы генов и нежелательные побочные реакции при применении антипсихотических лекарственных средств. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):5–12. DOI: 10.14341/WJPM9265].

9. Savelyeva MI, Panchenko YuS, Urvantseva IA, et al. Perspectives of pharmacogenetics approach to personalized tamoxifen therapy. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):27–35. DOI: 10.14341/

WJPM9274. In Russian [Савельева М.И., Панченко Ю.С., Урванцева И.А. и др. Перспективы фармакогенетического подхода к персонализированной терапии тамоксифеном. *World Journal of Personalized Medicine*. 2017;1(1):27–35. DOI: 10.14341/WJPM9274].

10. Kulikova KS, Vasiliev EV, Petrov VM, et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23 gene in child from Russia. *World Journal of Personalized Medicine*. 2018;2(1):5–9. DOI: 10.14341/pm9661. In Russian [Куликова К.С., Васильев Е.В., Петров В.М. и др. Аутосомно-доминантный гипофосфатемический рахит обусловленный мутацией в гене FGF23 — первый клинический случай в России. *World Journal of Personalized Medicine*. 2018;2(1):5–9. DOI: 10.14341/pm9661].

11. Voronkova IA, Eremkina AK, Krupinova YA, et al. Neuroendocrine markers in parathyroid tumors. *Arkh Patol*. 2020;82(6):70–78. DOI: 10.17116/patol20208206170.

12. Eremkina A, Krupinova J, Dobрева E, et al. Denosumab for management of severe hypercalcemia in primary hyperparathyroidism. *Endocr Connect*. 2020;9(10):1019–1027. DOI: 10.1530/EC-20-0380.

13. Gorbacheva AM, Eremkina AK, Mokrysheva NG. Hereditary syndromal and nonsyndromal forms of primary hyperparathyroidism. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 2020;66(1):23–34. DOI: 10.14341/probl10357.

14. Gronskaja G, Melnichenko L, Rozhinskaya T, et al. A registry for patients with chronic hypoparathyroidism in Russian adults. *Endocr Connect*. 2020;9(7):627–636. DOI: 10.1530/EC-20-0219.

15. Belaya Z, Khandaeva P, Nonn L, et al. Circulating PlasmamicroRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:331. DOI: 10.3389/fendo.2020.00331.

16. Lutsenko AS, Belaya ZE, Przhiyalkovskaya EG, et al. Expression of plasma microRNA in patients with acromegaly. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 2019;65(5):311–318. DOI: 10.14341/probl10263.

17. Mamedova EO, Dimitrova DA, Belaya ZE, et al. The role of non-coding RNAs in the pathogenesis of multiple endocrine neoplasia syndrome type 1. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 2020;66(2):4–12. DOI: 10.14341/probl12413.

18. Lapshina AM, Khandaeva PM, Belaya ZE, et al. Role of microRNA in oncogenesis of pituitary tumors and their practical significance. *Ter Arkh*. 2016;88(8):115–120. DOI: 10.17116/terarkh2016888115-120.

19. Nadezhdina EY, Rebrova OY, Grigoriev AY, et al. Prediction of recurrence and remission within 3 years in patients with Cushing disease after successful transnasal adenectomy. *Pituitary*. 2019;22(6):574–580. DOI: 10.1007/s11102-019-00985-5.

20. Freddi G, Romàn-Pumar JL. Evidence-based medicine: what it can and cannot do. *Ann Ist Super*

Sanita. 2011;47(1):22–25. DOI: 10.4415/ANN_11_01_06.

21. Meadows M. Genomics and personalized medicine. *FDA Consum*. November–December 2005;39(6):12–17.

22. Bunnik EM, Schermer MHN, Janssens AC. Personal genome testing: test characteristics to clarify the discourse on ethical, legal and societal issues. *BMC Med Ethics*. 2011;12:11. DOI: 10.1186/1472-6939-12-11.

23. Salari P, Larijani B. Ethical Issues Surrounding Personalized Medicine: A Literature Review. *Acta Medica Iranica*. 2017;55(3):209–217.

Информация об авторах:

Мокрышева Наталья Георгиевна, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России;

Мельниченко Галина Афанасьевна, академик РАН, д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России по научной работе.

PERSONALIZED MEDICINE — STAGES OF CONCEPT FORMATION AND WAYS OF ITS PRACTICAL IMPLEMENTATION

Mokrysheva N. G., Mel'nichenko G. A.

National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Corresponding author:

Mel'nichenko Galina A.,
National Medical Research Center for
Endocrinology,
st. Dmitry Ulyanov, 11, Moscow, Russia,
117292.
E-mail: pr_melnichenko@mail.ru

Received 02 September 2021; accepted
11 October 2021.

ABSTRACT

Personalized medicine is a new paradigm in healthcare, based on understanding of the importance of an individual treatment approach and based on knowledge about genomic predictors and post-genomic markers of various diseases. Complementing the concept of evidence-based medicine, personalized medicine opens up new opportunities for doctors and researchers to treat patients more effectively. At the same time it raises many medical, ethical and legal issues.

This article describes the current state of the problem with specific examples of the implementation of this approach by the leading institutions of the Russian Federation (including the Endocrinology Research Center).

Key words: endocrinology, evidence-based medicine, pharmacogenetics, precision medicine, rare diseases, translational medical research.

For citation: Mokrysheva NG, Mel'nichenko GA. Personalized medicine — stages of concept formation and ways of its practical implementation. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):43-58.

INTRODUCTION

Personalized medicine is a new paradigm in health-care — preventive medicine built on genomic predictors and postgenomic markers. Endocrinologists were among the first in our country who started to develop the concept of personalized medicine, and as far back as in 2011 I. I. Dedov already presented his keynote paper on this subject at the Presidium of the Russian Academy of Medical Sciences. A year later, plenary lecture by Academician I. I. Dedov at the Congress of Endocrinologists was focused on speaking about the importance and, most importantly, the potential practical benefits of the implementation of this concept, quite achievable in the near future. In the same year, the most authoritative Russian scientists I. I. Dedov, V. P. Chekhonin, A. Archakov and others presented a keynote article on the need for the development of personalized medicine in the journal “*Ve — stnik RAMN*” [1].

Of course, the very idea of personalization in medicine is not new, and the concept of “treating not a disease, but a person”, coming from Hippocrates, is a classic of the Russian therapeutic school.

But now this idea is taking on a new meaning, and its development is supported at the state level. The development and implementation of personalized medicine technologies are regulated in the Strategy for the Development of Medical Science in Russia until 2025 and the Strategy for Scientific and Technological Development of Russia until 2035 approved by decree of the President of the Russian Federation in December 2016. In this publication, the authors propose to consider the stages of forming the concept of personalized medicine and the experience of its practical implementation.

MAIN CONTENT

Specific personalization tools vary in different periods of technology development.

Endocrinology has always emphasized the personalization of the treatment choice, even in those distant years, when the choice was in fact small. Suffice it to recall the extremely important for the training of doctors “Algorithms for the treatment of patients with diabetes”, published from 2002 to 2020, where the principles were thoroughly based on individualized approach — from body weight and diabetes experience to taking into account complications [2, 3].

Already at the beginning of the development of the concept of personalized medicine, there were attempts to oppose it to the ideas of evidence-based medicine, while the latter was indulgently defined as “statistical data medicine”, “cookbook”, an old anecdote from the XVIII century (a hint of encyclopedists’ requirements

for evidence in science), while personalization was rather associated with the so called translational medicine, or medicine based on the early implementation of the latest scientific achievements into practice, and was considered through the prism of powerful machine learning technologies and artificial intelligence.

Indeed, the philosophical basis of evidence-based medicine (hereinafter abbreviated EBM), although formulated in the 80s of the last century, dates back to the XVIII century, since the concept requires proper research to answer a correctly formulated question. EBM still remains a topic of heated debate between clinicians, health care organizers and the public today.

EBM, as determined by Sackett [4], is the conscientious, explicit and judicious use of current best evidence in making decisions about the care of individual patients, based on common sense. The practice of EBM combines the experience of a particular clinician with the best proven data obtained from systematic, correctly constructed trials, and for a good clinician these two components are important parts in making a treatment decision. The concept of evidence itself is multifaceted and does not always flawlessly reveal cause-and-effect relationships, the ones that are so important for the clinician from the standpoint of preventive work.

But if it takes a lot of evidence and they are not always obviously unidirectional, then why is the evidence-based medicine still interesting today, in the XXI century? Although we support the principles of EBM, can we fully solve all problems with it? EBM is supposed to be aimed at bridging the gap between good quality clinical trials and clinical practice, but is it always possible? Population studies solve many problems that are important for an optimal approach to the health of population groups, but are unlikely to solve individual problems. Alas, not all studies are of the same quality, and the data may well be contradictory. Nevertheless, evidence-based medicine gives us the support in making clinically important decisions, combines our personal knowledge, the knowledge of other experts, allowing us to take into account the preferences of patients, improves medical practice and reduces the likelihood of errors. But no matter how good our current ideas about optimal treatment are, it lacks

individualization, and the assumption that all EBM-based treatments always resemble a perfectly lubricated machine, are naive.

Perhaps our first priority is to accelerate the development of the so-called “translational medicine” — a new direction in biomedicine that provides the fastest possible transferring data from well-planned basic trials to clinical practice?

An important role in the development of this direction in our country was played by Academician of

the Russian Academy of Sciences V. Shlyakhto, whose works emphasized that the huge achievements of medical and biological science currently do not find proper application in the practice of a doctor, and this is a problem of world medicine [5]. Scientific thought is developing more rapidly than its real results have time to be adapted in the practical medical field. Bridging the gap between fundamental sciences and the clinic will be helped by a direction called “translational medicine”, whose goal is to accelerate the introduction of the latest technologies into real practice. What is very important is that translational medicine is “sharpened” to solve specific practical problems, this is a “technological assault” carried out by order from the clinic. Even today there is some confusion in understanding that translational medicine is not telemedicine, not distance learning in advanced clinics [6].

Translational medicine is a clearly formulated clinical task that is solved in close contact between specialists in the field of fundamental biology, physics, chemistry and clinicians, while the result should be obtained as quickly as possible and at the lowest cost. Academician of the Russian Academy of Sciences E. V. Shlyakhto proposed a form of cluster association of fundamental medicine specialists and clinicians with the incorporation of business, and the Almazov Center launched the publication of the Translational Medicine journal in 2017.

Of course, both clinical, evidence-based, and translational medicine are different aspects of the same medicine, where strict adherence to the optimal scientific principles of building clinical trials with the evaluation of “responders” and “nonresponders” allows to identify target groups for finding optimal treatment methods, finding fundamentally new methods of care and prevention as quickly as possible, and in the future, by comparing with individual data, including genomic predictors, to fulfill the dream of all generations of doctors by finding a way to provide each person with the right treatment at the right time, avoiding side effects and treatment failures. The main branches of medicine where new principles are applied are oncology, pharmacy and pharmacogenomics. The latter studies the body’s reactions to medications, depending on individual hereditary factors.

However, the development of personalized medicine is also taking place in other areas, and it is not surprising that pharmacogenomics immediately became the leader in the development of personalized medicine. It is no coincidence that back in 2017, when the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia began publishing the online journal *World of Personalized Medicine*, editor-in-chief Academician I. I. Dedov proposed to open the journal with an

editorial by associate member of the Russian Academy of Sciences D. A. Sychev, the foremost scholar in the field of pharmacogenomics. This article, entitled

“Stages of development and implementation of personalized medicine technologies in clinical practice: the role of the Ministry of Health of Russia and the Russian Academy of Sciences” [7], contained current postulates about ways of evolution of developing real personalization of the treatment process, the development and implementation of technologies for personalized medicine. According to D. A. Sychev, “personalized medicine is a new doctrine of modern health care, which is based on the use of new methods of molecular analysis (genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, microbiomics) to improve the assessment of predisposition (prediction) to diseases and their management.” In other words, an extremely interesting idea was already voiced in the first publications — the concept of personalized medicine requires not only the involvement of scientific resources, but also organizational efforts, since it is a “health doctrine”.

“The essence of implementing the methodology of personalized medicine in clinical practice,” writes D. A. Sychev, “is an approach to providing medical care based on the individual characteristics of patients, for which they should be divided into subgroups depending on the predisposition to disease and the response to an intervention that should be applied to those who will really benefit from it, for whom it will be safe and will lead to cost saving”. The leading article emphasized the need for a step-by-step development of the concept of personalization in medicine, the need to accumulate data, also by using biobanks, and the development of personalization algorithms/models based on bioinformatics technologies with their clinical validation, the use of personalized approaches in real clinical practice when applying preventive and curative measures by creating and maintaining an electronic register of patients who underwent personalization, with a periodic assessment of changes in the clinical status (including outcomes), as well as preservation of the biomaterial of these patients.

This important road map, of course with the amendments made by time, is being implemented now. The first issue of the journal included reviews of the literature on pharmacogenetic studies of the efficacy and safety of antipsychotic drugs, which made it possible to identify several of the most significant polymorphisms that have a pronounced effect on the occurrence of adverse drug reactions when receiving antipsychotic drugs, and on the individualization of the use of tamoxifen in the treatment of breast cancer [8, 9], while a comparison of these reviews performed at a high methodological level gives a clear idea that not

only genomic studies determine a personalized approach to treatment, but it is also necessary to use other “omics” technologies for flawless individualization of treatment. Clinical examples that were regularly published in the journal, mainly from the Institute of Pediatric Endocrinology of the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia, told about unique clinical observations. Not long ago, treatment with sulfonylureas of infants with diabetes mellitus seemed fantastic. As it turned out, a special form — neonatal diabetes mellitus — does not require insulin treatment, and most patients with mutations in the genes of ATP-dependent K-channels can be successfully compensated against the background of treatment with sulfonylureas. Thus, out of 70 patients with neonatal diabetes mellitus, compensation of carbohydrate metabolism during monotherapy with glibenclamide was achieved in 22/35 (65.7%) cases. At the same time, the authors confirmed information previously known in foreign literature on the diagnostic value of detecting mutations in the KCNJ11 gene, and found an important association between the localization of the mutation in the KCNJ1 gene, the severity of clinical manifestations of the disease and the sensitivity of patients to sulfonylureas. It was also confirmed that the need for glibenclamide increased in patients with long-term neonatal diabetes. In recent years, the Institute of Clinical Endocrinology of the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia and the Institute of Pediatric Endocrinology have been working extensively and successfully in the field of studying bone tissue both as an acceptor and as a producer of hormones, and pathological conditions due to a mutation in the FGF23 gene, as well as the study of tumors producing phosphaturic fibroblast growth factor 23 and hypophosphatemic conditions associated with this pathology. The unique, first case of autosomal dominant hypophosphatemic rickets in Russia was presented by K. Kulikova et al. from the

National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia [10], the diagnosis was confirmed by the detection of a heterozygous mutation of c.536g>A:P.r179Q in the FGF23 gene. The life of the journal (its published issues are available at <https://www.wjpm-endojournals.ru/jour/index>) was not easy, and we welcome the initiative of the Almazov Center to organize the new Russian Journal for Personalized Medicine, available both electronically and on paper, bringing together scientists and doctors of various specialties, and to involve all grantees working in the field of personalized medicine, while maintaining a balance between fundamental works, descriptions of unique clinical cases and discussion of bioethics of personalization and digitalization.

It is in patients with orphan diseases that the benefits of personalized treatment are most clearly manifested today, and these patients propel the study of genomic pathology and make it possible to identify less aggressive forms of the disease in relatives. Therefore, in our opinion, another important function of the new journal should be a library of clinical observations allowing to “build a bridge” between molecular genetics laboratories and the patient’s bed.

Genomic predictors make it possible to foretell the risk of diseases, and post-genomic markers, which form the basis of diagnostic search, allow individual monitoring of human health, to find and level out pathological processes at the earliest stage and/or prescribe a purely individual treatment.

Currently, four medical centers have received grant funding for the development of a model of personalized medicine. Although the beginning of work on grants took place during hard years, when the efforts of doctors and funds were diverted to the fight against the pandemic of the new coronavirus infection, undoubted progress is the development of new laboratory structures and digitalization of medicine of the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia, a multidisciplinary research medical center that has no analogues in the world, consisting of five clinical institutes specialized in: diabetes, clinical endocrinology, pediatric endocrinology, reproductive endocrinology, oncoendocrinology, as well as the Institute of Higher and Additional Professional education and the Institute for Personalized Medicine. The unique clinical experience of the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia has formed a reproducible system of training doctors in technologies for diagnosing individual endocrinopathies, from socially significant (diabetes in its various forms with various complications and any history of the disease) to the rarest (orphan) diseases, but now, when new directions and new laboratories are to be created, training programs will have to be updated. In accordance with the Decree of the President of the Russian Federation dated May 7, 2018 No. 204, the National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia as an institution combining medical, medicinal and scientific activities with the most important pedagogical function of training qualified personnel for health care, received the right to implement a program for the creation of the National Center for Personalized medicine of endocrine diseases (NCPMED). The Center proposed a unique integrative solution to the problem of personalization of diagnosis and treatment by comparing genomic data with metabolic and hormonal data in the groups of “natural models” of primary and secondary disorders in one of the

main integrative systems of the body — the endocrine system. Fundamental research conducted on the basis of the National Medical Research Center of Endocrinology will be expanded through *de novo* laboratories, in particular laboratories of general, molecular and population genetics, cellular technologies, bioinformatics, metabolomic and proteomic studies with a microbiota laboratory, genome editing laboratories, immunology and autoimmune diseases, non-invasive technologies for the diagnosis of endocrinopathy, clamp technologies and pharmacokinetics, pharmacogenomics, intelligent mathematical technologies and personalization of diagnostics and forecasting, embryology and comparative endocrinology, molecular oncoendocrinology.

Despite all the difficulties of work in 2020-2021, when the center was partially repurposed as a clinic for the treatment of patients with COVID-19, work began on the implementation of the projects laid down in the basis of the center, and most of them work on the basis of a pre-created database of patients, primarily with pituitary tumors, multiple endocrine tumors, parathyroid tumors and skeletal diseases. During the year of work, we can confidently talk about significant progress in the study of the molecular foundations of the pathology of the parathyroid glands and the publications of National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia issued in 2020—2021, in which preliminary results have already been summed up, revealed the importance of early detection of hypercalcemia and the importance of assessing hyperparathyroidism not only as an isolated syndrome, but as a possible debut of a genetically determined disease [11—13], while an important basis was the creation of a database of patients with hyperparathyroidism [14]. We are already considering the possibility of creating new cellular products for the treatment of a hormone-deficient condition, including growing an authentic parathyroid gland from the patient's own cells in a Petri dish. In our opinion, the data obtained over these two years on the role of the post-transcriptomic DNA-miRNA silencing system in the differential diagnosis of various forms of hypercortisolism are also very important [15]. These studies on the role of non-coding miRNAs in endocrinopathies have been conducted at the Center for a long time, but we believe that in the new conditions we will be able to systematize the previously obtained information and translate it into practice [16-18], the center also continued to develop predictor models for assessing remission/ recovery after removal of corticotropinomas [19].

If the trajectory of organizational and scientific perspectives of personalization in healthcare is clear, despite all the complexity, then bioethical and economic issues are not much discussed.

Today we are not yet thinking much about the ethical issues of expanding our knowledge about disease predictors, about the burden that a person and his family receive based on the results of genome-wide screening of newborns, when the risks of diseases that will manifest in the fourth or fifth decade will be formulated, about the psychological consequences of information regarding the “fatal inevitability of the disease”. This raises the question of the risk of spreading personal information obtained on the basis of knowledge of the genotype. How will the balance of scientific interest, interests of society the individual be maintained?

Of course, the very idea of replacing “one size for all” as a disadvantage of EBM [20] with the idea of “the right medicine for the right patient at the right time” as the slogan for personalized treatment would be unthinkable without the achievements of genetics and the completion of the Human Genome Project. Although no one denies the variability of post-genomic changes and lifestyle, the fastest possible acquisition of genomic information is necessary for solving pharmacogenomics issues, in the first place, according to FDA [21]. This, in fact, obliges us in the future to confirm the specificity of the disease and choose the optimal treatment at the molecular level, to translate genomic information into the practice of medicine and public health.

At first glance, the advantages are obvious — knowledge of risks provides a strategy for preventing/ overcoming them, speeding up diagnosis facilitates the search of treatment, increasing its effectiveness and reducing the risk of adverse events.

Skeptics emphasize that personalized medicine will generate, like many other achievements of mankind, new ethical challenges — starting with genetic tests of obscure significance with no obvious purpose [22].

A sober assessment of the possibilities of real personalization at each new stage of development of society can ensure a long and effective life for the personalization paradigm. Excessive enthusiasm and “hype” (using today's glossary) can generate mistakes and ruin an important area, so understanding the ethics of personalization should also be a matter of discussion on the pages of our journals.

What obvious problems are already being discussed today?

Undoubtedly, major concerns are the high cost of genetic research, inequality in access to health resources, the opposition of personal and public rights to access information, discrimination and genetic stigmatization, invasion of totally personal space, accidental findings, a new status close to research, genetic counseling, a negative undeniable impact on the relationship between a doctor and a patient — is all this redeemed

by improving the quality of medical care for everyone and for everyone in society?

Undoubtedly, as we have already emphasized, the main expectation of society is safe pharmacogenetics, effective drugs without side effects (which, by the way, contradicts the old medical rule “there are no effective drugs without side effects”). Of course, these will be more expensive drugs, but drugs alone are not the most expensive part of the health budget. In addition, the emphasis on safety is an extremely rational approach, since it is genetic factors that are among the most important predictors of undesirable side effects, especially severe ones.

A serious objection for the world community in relation to the idea of developing genetic tests is their economic inaccessibility for many countries [23].

It is difficult to object to genetic testing in risk groups, but in the future tests will become cheaper and more accessible, which will allow changing also the design of clinical trials, with the selection of the most genetically favorable cohorts, reducing their volume, accelerating research time and reducing costs. Perhaps the need for phases 1-2 will disappear, and a new model of clinical research is on the way.

There are also serious concerns about the readiness of the pharmaceutical business to produce drugs that will be close in their intended use to drugs for orphan diseases. In fact, if we identify certain genetic subgroups among very common diseases that do not need banal and well-selling medicines, but need rare drugs — will such production be supported? How will society support the possible racial or social “coloring” of the disproportion in the need for such medicines for diseases of the same type?

We don't have to solve these problems yet, but one of the most important ethical organizational aspects concerns the so-called biobanks and their functions. Working in this direction for several years, we faced ethical problems of organizing biobanks, including the need to combine the availability of samples and the preservation of medical confidentiality when it is mandatory to have informed consent.

No less skepticism is caused by a change in the relationship between the doctor and the patient when genetic information appears. Today, attending doctors who are specifically examining the panel of genes in search of an answer to the question of an accurate diagnosis, resort to the help of geneticists to answer the questions of patients receiving genetic information. Erroneous interpretation of complex and ambiguous data can negate all the bonuses inherent in personalization.

It would seem to be an obviously wonderful idea — the selection of patients based on genetic data implies the availability of genetic databases of patients to phar-

maceutical companies, as well as the availability of personal data from case histories.

The bioethics of genetic research will also require the fullest possible explanation of the limitations of our current (and maybe tomorrow and the day after tomorrow) knowledge about genetic information and its implementation at the level of the organism, a clear indication of the ways to use and store biological samples, coding and maintaining anonymity, ways to withdraw samples and recall research results, the possibility of using a wide / limited network of national / international databases. The risks of getting acquainted with these databases of insurance companies and employers are obvious. Thus, the protection of personal data is more relevant than ever in relation to personalized medicine, and personalized medicine can create a crisis of trust between various healthcare institutions, this concern has been expressed since the implementation of the Human Genome Project.

Today, the ideal doctor-patient relationship includes, as far as possible, cooperation and understanding of the treatment goals by the patient, and understanding the patient's wishes and priorities by the doctor... How achievable it will be in the digital age of personalized medicine!

And, finally, the last, but no less significant objections: already today the cost of unique drugs for the treatment of orphan diseases is off the scale. Will the financial capabilities of insurance campaigns provide all patients, for example, with oncological diseases, with the necessary medicines and tests?

CONCLUSION

Thus, the implementation of the concept of personalized medicine is associated not only with great hopes and successes of researchers and doctors, but also with certain difficulties. Probably, all these discussion issues, as well as scientific problems, will also become the subject of discussion on the pages of the new journal, to which the author of the article wishes success and a long life!

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Dedov II, Tyul'pakov AN, Chekhonin VP, et al. Personalized medicine: State-of-the-art and prospects. *Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2012;67(12):4–11. DOI: 10.15690/vramn.v67i12.474. In Russian [Дедов И.И., Тюльпаков А.Н., Чехонин В.П. и др. Персонализированная медицина: современ-

ное состояние и перспективы. Вестник Российской академии медицинских наук. 2012;67(12):4–11. DOI: 10.15690/vramn.v67i12.474].

2. Dedov II, Shestakova MV, Maksimova MA. Federal target program “Diabetes mellitus” (guidelines). M.: Izdatel'stvo Media Sfera; 2002. 88 p. In Russian [Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет» (методические рекомендации). М.: Издательство Медиа Сфера; 2002. 88 с.].

3. Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AY. Standards of specialized diabetes care (9th Edition). Diabetes Mellitus. 2019;22(1S1):1–144. DOI: 10.14341/DM221S1. In Russian [Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом (9-й выпуск). Сахарный диабет. 2019;22(1S1):1–144. DOI: 10.14341/DM221S1].

4. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, et al. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. BMJ. 1996;312(7023):71–72. DOI: 10.1136/bmj.312.7023.71.

5. Shlyakhtov EV. Translational medicine. SPb.: Severo-Zapadnyy federal'nyy medicinskij issledovatel'skiy centr im. V. A. Almazova, 2010. 415 p. In Russian [Шляхто Е.В. Трансляционная медицина. СПб.: Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, 2010. 415 с.].

6. Mediouni M, Schlatterer DR, Madry H, et al. A review of translational medicine. The future paradigm: how can we connect the orthopedic dots better? Curr Med Res Opin. 2018;34(7):1217–1229. DOI: 10.1080/03007995.2017.1385450.

7. Sychev DA. Stages of development and implementation of personalized medicine technologies in clinical practice. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):1–4. In Russian [Sychev D.A. Stages of development and implementation of personalized medicine technologies in clinical practice. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):1–4].

8. Zastrozhin MS, Sychev DA, Grishina EA, et al. Pharmacodynamic gene polymorphism and adverse drug reaction then applying antipsychotic drugs. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):5–12. DOI: 10.14341/WJPM9265. In Russian [Застрожин М.С., Сычев Д.А., Гришина Е.А. и др. Фармакодинамические полиморфизмы генов и нежелательные побочные реакции при применении антипсихотических лекарственных средств. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):5–12. DOI: 10.14341/WJPM9265].

9. Savelyeva MI, Panchenko YuS, Urvantseva IA, et al. Perspectives of pharmacogenetics approach to personalized tamoxifen therapy. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):27–35. DOI: 10.14341/WJPM9274. In Russian [Савельева М.И., Панченко

Ю.С., Урванцева И.А. и др. Перспективы фармакогенетического подхода к персонализированной терапии тамоксифеном. World Journal of Personalized Medicine. 2017;1(1):27–35. DOI: 10.14341/WJPM9274].

10. Kulikova KS, Vasiliev EV, Petrov VM, et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23 gene in child from Russia. World Journal of Personalized Medicine. 2018;2(1):5–9. DOI: 10.14341/pm9661. In Russian [Куликова К.С., Васильев Е.В., Петров В.М. и др. Аутосомно-доминантный гипопаратиреоз обусловленный мутацией в гене FGF23 — первый клинический случай в России. World Journal of Personalized Medicine. 2018;2(1):5–9. DOI: 10.14341/pm9661].

11. Voronkova IA, Eremkina AK, Krupinova YA, et al. Neuroendocrine markers in parathyroid tumors. Arkh Patol. 2020;82(6):70–78. DOI: 10.17116/patol20208206170.

12. Eremkina A, Krupinova J, Dobrova E, et al. Denosumab for management of severe hypercalcemia in primary hyperparathyroidism. Endocr Connect. 2020;9(10):1019–1027. DOI: 10.1530/EC-20-0380.

13. Gorbacheva AM, Eremkina AK, Mokrysheva NG. Hereditary syndromal and nonsyndromal forms of primary hyperparathyroidism. Probl Endokrinol (Mosk). 2020;66(1):23–34. DOI: 10.14341/probl10357.

14. Gronskaja G, Melnichenko L, Rozhinskaya T, et al. A registry for patients with chronic hypoparathyroidism in Russian adults. Endocr Connect. 2020;9(7):627–636. DOI: 10.1530/EC-20-0219.

15. Belaya Z, Khandaeva P, Nonn L, et al. Circulating PlasmamicroRNA to Differentiate Cushing's Disease From Ectopic ACTH Syndrome. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:331. DOI: 10.3389/fendo.2020.00331.

16. Lutsenko AS, Belaya ZE, Przhiyalkovskaya EG, et al. Expression of plasma microRNA in patients with acromegaly. Probl Endokrinol (Mosk). 2019;65(5):311–318. DOI: 10.14341/probl10263.

17. Mamedova EO, Dimitrova DA, Belaya ZE, et al. The role of non-coding RNAs in the pathogenesis of multiple endocrine neoplasia syndrome type 1. Probl Endokrinol (Mosk). 2020;66(2):4–12. DOI: 10.14341/probl12413.

18. Lapshina AM, Khandaeva PM, Belaya ZE, et al. Role of microRNA in oncogenesis of pituitary tumors and their practical significance. Ter Arkh. 2016;88(8):115–120. DOI: 10.17116/terarkh201688115-120.

19. Nadezhdina EY, Rebrova OY, Grigoriev AY, et al. Prediction of recurrence and remission within 3 years in patients with Cushing disease after successful transnasal adenomectomy. Pituitary. 2019;22(6):574–580. DOI: 10.1007/s11102-019-00985-5.

20. Freddi G, Romàn-Pumar JL. Evidence-based medicine: what it can and cannot do. Ann Ist Super Sanita. 2011;47(1):22–25. DOI: 10.4415/ANN_11_01_06.

21. Meadows M. Genomics and personalized medicine. FDA Consum. November-December 2005;39(6):12–17.
22. Bunnik EM, Schermer MHN, Janssens AC. Personal genome testing: test characteristics to clarify the discourse on ethical, legal and societal issues. BMC Med Ethics. 2011;12:11. DOI: 10.1186/1472-6939-12-11.
23. Salari P, Larijani B. Ethical Issues Surrounding Personalized Medicine: A Literature Review. Acta Medica Iranica. 2017;55(3):209–217.

Author information:

Mokrysheva Natalia G., PhD, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the National Medical Research Center for Endocrinology;
Melnichenko Galina A., PhD, Academician of the Russian Academy of Sciences, Medical Doctor,
Deputy Director for Scientific Work of the National Medical Research Center for Endocrinology.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-056.527

ОЖИРЕНИЕ КАК ПРЕДИКТОР МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И ЦЕЛЬ ДЛЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Бабенко А. Ю., Голикова Т. И.

Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Бабенко Алина Юрьевна,
НЦМУ «Центр персонализированной
медицины»,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: babenko_ayu@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
07.09.2021 и принята к печати
25.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Настоящий обзор посвящен описанию факторов, на основании которых выделяются различные фенотипы ожирения, их взаимосвязи, предикторной роли в прогнозе метаболического здоровья, его сохранении, в отчете на различные варианты терапевтических вмешательств. Обзор охватил лишь ключевые параметры: роль локализации и морфологии жировой ткани в ее метаболической активности и характеристиках секретома, роль основных адипокинов и гормонов, вовлеченных в регуляцию нутритивного метаболизма, регуляцию аппетита и пищевого поведения и чувствительности к ним в развитии ожирения различных фенотипов. Обозначена роль немодифицируемых факторов (возраст и пол), кратко описаны перспективы использования этих данных в борьбе с эпидемией ожирения.

Ключевые слова: адипокины, гормоны желудочно-кишечного тракта, жировая ткань, ожирение, секретом, фенотипы.

Для цитирования: Бабенко А.Ю., Голикова Т.И. Ожирение как предиктор метаболических нарушений и цель для персонифицированных воздействий. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):59-94.

Список сокращений: TNF — tumor necrosis factor, АГ — артериальная гипертензия, АД — артериальное давление, БЖТ — белая жировая ткань, БуЖТ — бурая жировая ткань, ВЖТ — висцеральная жировая ткань, ВО — висцеральное ожирение, ГИП — глюкозозависимый инсулиноотропный пептид, ГПП1 — глюкагоноподобный пептид 1, ГЧЛ — гормон-чувствительная липаза, ДЛП — дислипидемия, ЖК — жирные кислоты, ЖТ — жировая ткань, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИЛ — интерлейкин, ИМТ — индекс массы тела, ИР — инсулинорезистентность, ИФР — инсулиноподобный фактор роста, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ЛПЛ — липопротеинлипаза, ЛР — лептинорезистентность, МЗ — метаболическое здоровье, МЗО — метаболически здоровое ожирение, МНО — метаболически нездоровое ожирение, МС — метаболический синдром, НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени, НУО — нарушения углеводного обмена, ОБ — объем бедер, ОТ — окружность талии, ПЖТ — подкожная жировая ткань, рРцЛ — растворимые рецепторы лептина, СД2 — сахарный диабет 2 типа, СЖК — свободные жирные кислоты, СН — сердечная недостаточность, СС — сердечно-сосудистые, ТГ — триглицериды, ФП — фибрилляция предсердий, ХБП — хроническая болезнь почек, ХЦК — холецистокинин.

ВВЕДЕНИЕ

1. Ожирение как проблема современной цивилизации

Ожирение — гетерогенное состояние, характеризующееся избыточным накоплением жира в различных жировых депо. В норме депонирование жира происходит преимущественно в подкожном жировом депо. В условиях избытка энергии (питательных веществ) ее излишки накапливаются в белых адипоцитах подкожной жировой ткани (ПЖТ), становясь и запасом, который может быть израсходован в условиях энергетического дефицита, и защитой от охлаждения. Между тем в условиях современной жизни данные функции ПЖТ перестали быть актуальными для большинства людей, и, так как расходования запаса жира из депо практически не происходит из-за отсутствия дефицита энергии, его запасы становятся чрезмерными, превышая депонирующую способность клеток. Роль генетической предрасположенности в распространении эпидемии ожирения существенно уступает вкладу образа жизни, поскольку максимальное увеличение частоты ожирения отмечено в последние 40 лет. Как отметил Джослин еще сто лет назад, «генетика, ве-

роятно, заряжает ружье, в то время как образ жизни в нашей способствующей развитию ожирения среде нажимает на курок для распространения эпидемии ожирения». Помимо переизбытка и гиподинамии, ряд дополнительных экологических, поведенческих и социально-экономических факторов влияет на потребление калорий и/или их расход, вызывая увеличение веса [1]. В норме на ПЖТ приходится более 80 % всей жировой прослойки, тогда как висцеральная жировая ткань (ВЖТ) составляет около 10 % у женщин и 20 % у мужчин [2]. Однако продолжающееся избыточное поступление питательных веществ приводит к тому, что энергия начинает накапливаться в других депо — в висцеральной жировой ткани и в периорганных и внутриорганных областях. Несомненно, такая схема последовательности развития различных вариантов ожирения чрезвычайно упрощена, и на этом вопросе стоит остановиться подробнее.

2. Ожирение и метаболическое здоровье — что определяет последнее? Различные фенотипы ожирения — определения метаболически здорового ожирения. Динамика представлений

На локализацию накопления жировой ткани (ЖТ) в тех или иных областях тела (глютеофemorальное, абдоминальное) и жировых депо (подкожное, висцеральное) влияет множество факторов. Наиболее выраженные сдвиги в продукции биологически активных веществ, вовлеченных в регуляцию метаболических процессов, отмечаются при висцеральном ожирении (ВО), которое обычно является метаболически нездоровым. Между тем различия в эффектах на метаболическое здоровье (МЗ) и сердечно-сосудистые (СС) риски имеет не только ВЖТ и ПЖТ, но и локализация ПЖТ (глютеофemorальная, абдоминальная). Адипоциты абдоминальной ПЖТ характеризуются быстрым захватом и сохранением энергии после приема пищи, высокой скоростью обмена липидов (липолиз), тогда как жировые отложения нижней части тела имеют низкую скорость обмена липидов и изолируют липиды, которые в ином случае поступили бы в нежировые ткани (эктопия ЖТ). Таким образом, ПЖТ нижней части тела имеет более высокую способность к депонированию и сохранению липидов [3]. По мере увеличения индекса массы тела (ИМТ) скорость обмена липидов замедляется. Исследования последних лет показали, что отличия имеются не только для ЖТ, локализованной в различных областях тела, но и для расположенной на разной глубине от кожи. Более глубокие слои ПЖТ имеют структурные и функциональные отличия: более вы-

сокую экспрессию провоспалительных, липогенных и липолитических генов, более низкий уровень метилирования ДНК PPAR- γ , и содержит более высокую долю маленьких адипоцитов. То есть более глубокие слои ПЖТ имеют больший адипогенный потенциал. Морфология ЖТ также влияет на МЗ. Хотя ожирение обычно характеризуется сочетанием гипертрофии и гиперплазии адипоцитов, преобладание гипертрофии связано с неблагоприятным кардиометаболическим профилем [4]. Большой размер адипоцитов ассоциирован с низкой скоростью обмена липидов в них и наличием негативных кардиометаболических изменений. При этом существуют противоречия в данных о том, гипертрофия адипоцитов какой локализации (висцеральной или подкожной) определяет кардиоваскулярные риски. В одних исследованиях установлена взаимосвязь гипертрофии клеток ВЖТ с инсулинорезистентностью (ИР) и кардиоваскулярными заболеваниями [5], в других гипертрофия висцеральных адипоцитов была связана с дислипидемией (ДЛП), тогда как гипертрофия подкожных адипоцитов — с инсулинорезистентностью [6, 7] и развитием сахарного диабета 2 типа (СД2) [8], а нормализация их объема при снижении веса сопровождалась нормализацией чувствительности к инсулину [9].

Однако перечисленные особенности далеко не всегда учитываются в оценке метаболически здорового/нездорового ожирения. Под метаболически здоровым ожирением (МЗО) в целом понимается ожирение, при котором отсутствуют какие-либо значимые метаболические нарушения [ДЛП, нарушения углеводного обмена (НУО), гиперурикемия и др.], артериальная гипертензия (АГ), либо имеется не более одного такого нарушения. Дополнительно включают неблагоприятный воспалительный профиль (уровень СРБ > 3 г/л), резистентность к инсулину (НОМА-IR $< 2,5$), однако рекомендации по критериям МЗО очень вариабельны, как и оценки его распространенности (от 6 до 40 %) [10]. Большинство исследований включают наличие основных компонентов метаболического синдрома (МС) [артериальное давление (АД) $\geq 130/85$ мм рт. ст., холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) $< 1,04$ ммоль/л у мужчин, $< 1,3$ у женщин, триглицериды (ТГ) $\geq 1,7$ ммоль/л, глюкозу плазмы натощак $\geq 5,6$ ммоль/л] в определении МЗО/МНО. Менее половины включают оценку инсулинорезистентности, обычно при помощи суррогатной гомеостатической модели резистентности к инсулину (НОМА-IR) [11], в некоторых небольших исследованиях использовался гиперинсулинемический-эугликемический клэмп [12–14]. Ряд авторов полагает, что не ИР, а гиперинсулинемия определяет мета-

болически нездоровое ожирение (МНО) [14, 15]. Оценка уровня других гормонов не входит в стандартные определения.

Между тем текущие определения МЗО не являются оптимальными, так как недавние продольные исследования показали, что большая часть пациентов с МЗО со временем переходит в метаболически нездоровую категорию [16–21]. Предикторы потери МЗ включают пожилой возраст [22] и более «плохие» исходные метаболические параметры, включая более низкий уровень ЛПВП [18, 20], более высокий — ТГ [20], более «центральное» ожирение [20] и ИР [18, 20]. Развитие новых методов для оценки количества и локализаций различных видов ЖТ (подкожной глутеофemorальной или абдоминальной, висцеральной, ЖТ печени, поджелудочной железы, эпикардиальной и т. д.) позволили сформировать новые компоненты МЗО — предикторы его сохранения. Так, в недавнем проспективном исследовании пациентов с инсулин-чувствительным и инсулинорезистентным ожирением (оценка чувствительности к инсулину методом эугликемического гиперинсулинемического клэмпа) было показано, что предикторами сохранения/утраты МЗ, помимо нормальной чувствительности к инсулину, были фенотип ожирения, идентифицированный по объему ВЖТ и окружности талии (ОТ), тощая масса тела, индекс массы тела, диастолическое АД, уровень инсулина сыворотки натощак и содержание жира в печени [14]. При этом динамическая оценка через 5 лет в группе с исходно ИР-ожирением содержание жира в андройдном регионе значительно увеличилось ($p = 0,0087$) как и объем ВЖТ ($p_{\text{время}} < 0,001$) [14].

В недавнем исследовании Zembic, et al. (2021) было показано, что только пациенты с ожирением, не имевшие АГ и НУО [систолическое АД < 130 мм рт. ст., без гипотензивной терапии, отсутствие СД (плазменная глюкоза < 110 мг/дл) без антидиабетической терапии] и имевшие периферический тип ожирения [отношение ОТ к объему бедер (ОБ) $< 0,95$ для женщин и $< 1,03$ для мужчин], не имели повышения риска СС-событий и смертности, причем независимо от массы тела [23]. Неожиданным было отсутствие связи ДЛП с СС-прогнозом в данном исследовании. Из интересных особенностей этой работы стоит отметить оценку именно отношения ОТ/ОБ, а не ОТ для оценки фенотипа ожирения и индекса QUICKI, а не НОМА-IR для оценки ИР. Хотя ОТ позволяет подтвердить центральный (андройдный) характер ожирения, оценивая количество ВЖТ, локализованной в брюшной полости, однако при оценке ОТ в значение также включается и подкожный абдоминальный жир, у которо-

го имеется меньшее неблагоприятное воздействие на метаболизм, чем у висцерального [24]. Напротив, ОБ отражает количество ПЖТ, локализованной на нижней половине тела, которая имеет как минимум нейтральные, а возможно и защитные эффекты на метаболизм [24–26]. Другие исследования также показали большую предикторную мощь ОТ/ОБ по сравнению с ОТ в отношении оценки риска смерти, чем ОТ при ожирении [27]. Использование индекса QUICKI, который более сильно связан с метаболическими рисками, чем индекс НОМА, также позволило улучшить предикторную ценность исследования. Это исследование еще раз подчеркнуло высокое значение локализации ЖТ в формировании СС-рисков. Отсутствие взаимосвязи ДПП с риском смерти (СС и общей) в этом исследовании может объясняться тем, что среди причин смерти у пациентов с ожирением доминируют сердечная недостаточность (СН), хроническая болезнь почек (ХБП) и онкология, для которых ДПП не является ключевым фактором риска.

Важным причинным фактором развития различных кардиометаболических заболеваний при ожирении является накопление ЖТ в целевых органах и периорганном пространстве. Эктопия ЖТ в различные органы представляет собой значительный фактор в формировании гетерогенных по последствиям фенотипов ожирения. При этом каждый вариант органной эктопии ЖТ: эпикарди-

альный, мезентериальный (вокруг кишечника), ретроперитонеальный (в том числе околопочечный), гонадальный, оментальный (желудок, селезенка), печеночный, панкреатический жир, вносит особенности в клиническое течение [28] (рис. 1). Так, накопление ЖТ в области ворот почек коррелирует с АД и альбуминурией, накопление в эпикардальной области ассоциировано с повышенным риском АГ, ишемической болезни сердца (ИБС), фибрилляции предсердий (ФП) и СН, в области гонад (в мошонке) — с нарушением продукции тестостерона у мужчин и нарушением фертильности, накопление жира в области поджелудочной железы обратно коррелирует с секреторной функцией бета-клеток, а в области печени ассоциировано с печеночной ИР, повышением продукции фетуина-А, развитием неалкогольной болезни печени НАЖБП. Кроме того, стеатоз печени тоже вносит вклад в нарушение секреторной активности эндокриноцитов поджелудочной железы [28] и является еще одной сильной детерминантой чувствительности к инсулину при ожирении [29]. При этом у разных пациентов может очень значимо варьировать накопление жира в различных сайтах. Причинные факторы этих отличий до конца не установлены и их определение является ключевой задачей, решение которой позволит разработать персонифицированный подход к профилактике целого ряда метаболических заболеваний.

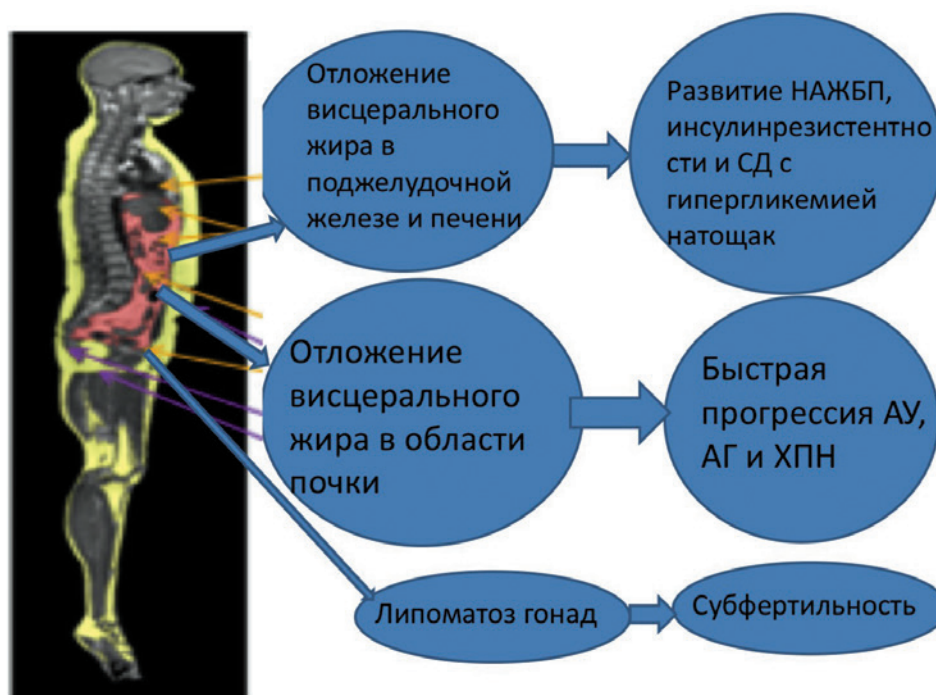


Рис. 1. Примеры связи локализации накопления эктопированной ВЖТ с клиническими проявлениями

Сложность учета этих изменений при оценке рисков у различных пациентов определена высокой стоимостью обследования, позволяющего оценивать эктопированную ЖТ (магнитно-резонансная томография, протонная спектроскопия, денситометрия).

Еще один тип ЖТ, оценка которого мало доступна в рутинной практике, но интерес к которой в научных исследованиях не ослабевает, — бурая жировая ткань (БуЖТ). В отличие от белой ЖТ (БЖТ), БуЖТ вырабатывает тепло, увеличивая расход энергии, вместо того, чтобы депонировать энергию в виде жира. У человека она представлена двумя типами — «истинная» БуЖТ, которая выявляется лишь у младенцев и локализована в межлопаточной области и «индуцибельная термогенная» БуЖТ, локализованная большей частью в надключичной области [30]. Эту ЖТ также называют бежевой, так как она содержит и белые и бурые адипоциты и характеризуется способностью к ре-дифференцировке — «переключению» между белыми и бежевыми адипоцитами путем активации белка несцепления 1 [uncoupling protein 1(UCP1)]. Этот процесс (ре-дифференцировку белых адипоцитов в бурые) называют браунингом БЖТ. Уменьшение как массы, так и активности БуЖТ, может играть роль в развитии ожирения и СД2, и ее метаболическая активность обратно пропорциональна толщине жировой прослойки [31] и положительно коррелирует с чувствительностью к инсулину [32]. Увеличение содержания ТГ в области локализации БуЖТ также является негативным метаболическим предиктором и ассоциировано в высокой степени с развитием ИР и НУО [33].

ИР при ожирении тесно связана не только с увеличением количества ВЖТ, но и с потерей мышечной массы, особенно в пожилом возрасте [34], дефицит которой можно рассматривать как маркер ИР и предиктор развития МНО [29]. Даже при нормальной массе тела дефицит мышечной массы приводит к развитию ИР.

Подводя итог, ведущими критериями определения МЗО можно считать увеличение количества ВЖТ и отношение количества ВЖТ к тощей массе тела. Самым простым, доступным в рутинной практике, методом оценки количества ВЖТ является оценка ОТ и отношения ОТ/ОБ. Более сложным является таргетное определение риска развития отдельных метаболических расстройств и заболеваний. Для развития НУО такими факторами являются повышение содержания ТГ в печени и поджелудочной железе, для сердечно-сосудистых заболеваний (АГ, ИБС, ФП, СН) — утолщение эпикардиальной ЖТ, для развития хронической болезни почек — накопление ЖТ в воротах почек. Оно требует использования сложных, дорогостоящих инструментальных методов ис-

следования, поэтому в исследованиях последний лет предпринимаются попытки идентифицировать лабораторные маркеры, которые могли бы стать удобной и доступной альтернативой инструментальному обследованию. Кроме того, оценка биомаркеров помогает лучше понять механизмы формирования различных нарушений, лежащих в основе перехода МЗО в МНО, и в основе развития отдельных метаболических расстройств.

3. Отличия гормонального и биомаркерного профиля при различных фенотипах ожирения — анализ крови для предикции метаболического здоровья — миф или реальность?

К настоящему времени не вызывает сомнений наличие эндокринных функций у ЖТ, которая вырабатывает более 50 гормонов (адипоцитокинов, адипокинов) и биологически активных веществ с разнообразными функциями [35] (рис. 2). Они оказывают свои эффекты через паракринные, аутокринные и эндокринные механизмы, влияя на метаболические процессы, воспаление, коагуляцию, гомеостаз глюкозы и липидов. К ним относятся: адипонектин, лептин, свободные жирные кислоты (СЖК), фактор некроза опухоли- α (tumor necrosis factor (TNF)- α), интерлейкин (ИЛ)-6, интерлейкин (ИЛ)-8, MCP 1, висфатин, фетуин А, инсулиноподобный фактор роста (ИФР), ингибитор активатора плазминогена-I (PAI-1), ангиотензиноген, ангиотензин-II, простагландины, эстрогены, резистин и многие другие. Изменение уровня гормонов и биомаркеров — продуктов ЖТ в крови — в определенной степени отражает функциональный дисбаланс как клеток ЖТ, так и других органов, вовлеченных в формирование типичных для МНО нарушений (печень, почки, поджелудочная железа, нейроэндокринные клетки ЖКТ).

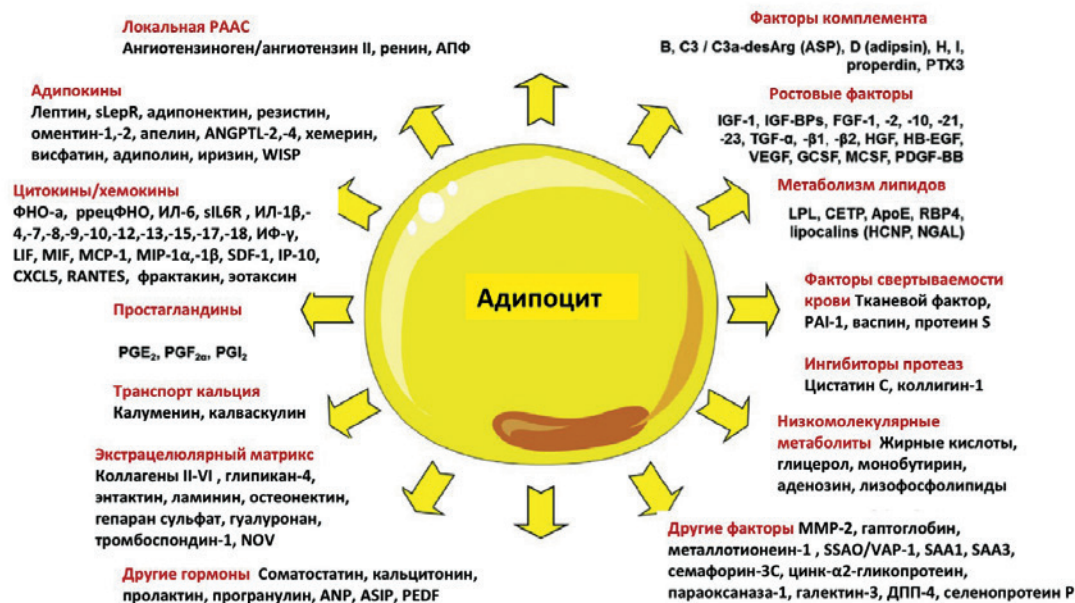
Одним из типичных отличий, отмеченных при висцеральном ожирении (МНО), является изменение баланса адипоцитокинов — адипонектина (снижение), лептина (повышение) и других продуктов секреции жировой клетки. Это сопровождается модуляцией провоспалительных и метаболических процессов. Физиологически именно ПЖТ предназначена для депонирования избытка калорий, и генетически детерминированная ее высокая способность к депонированию позволяет длительно сохранять хорошее МЗ. Как отмечено выше, максимальной депонирующей способностью обладает ПЖТ глютеофеморальной области. Считается, что важное значение в особенностях секретора ЖТ имеет ее кислородная обеспеченность, которая

в высокой степени детерминирована ангиогенезом. Основные регуляторы депонирования жировой ткани включают составляющие.

ВОЗРАСТ

Жировая ткань является динамической системой, эффекты которой на модуляцию системного метаболизма и воспаления меняются в разные возрастные

периоды [36]. В детстве и у юных ЖТ обладает высокой пластичностью, приспособляясь к изменениям окружающей среды и быстро изменяя свои эндокринные, воспалительные и метаболические функции [37]. С возрастом снижается способность к дифференцировке преадипоцитов из-за снижения экспрессии и активности ССАТ/энхансер-связывающего белка альфа (С/ЕВР α) и пероксисом-активируемого пролифератора гамма-рецептора (PPAR γ)



Адаптировано из Gerst F. et al. MOLECULAR METABOLISM 25 (2019) 1-10

Рис. 2. Профиль секреторной активности белого адипоцита

АПФ — ангиотензин-преобразующий фермент; ANGPTL — ангиопоэтин-подобный белок; ANP — предсердный натрийуретический пептид; Apo — аполипопротеин; ASIP — агути сигнальный белок; ASP — ацилирование-стимулирующий белок; CETP — белок передачи сложных эфиров холестерина; ДПП — дипептидил пептидаза; FGF — фактор роста фибробласта; GCSF — колоний-стимулирующий фактор гранулоцитов; HBEGF — гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста; HCNP — гиппокампаальный холинергический нейростимулирующий пептид; HGF — фактор роста гепатоцита; ИФ — интерферон; IGF — инсулиноподобный фактор роста; IGF-BP — IGF-связывающий-белок; IL — интерлейкин; IP-10 — индуцирующий белок 10; LIF — лейкемия ингибирующий фактор; LPL — липаза липопротеина; MCP — белок хемоаттрактант моноцита; MCSF — колоний-стимулирующий фактор макрофагов; MIF — фактор ингибирующий миграцию макрофагов; MIP — макрофаги индуцирующий белок; MMP — матричная металлопротеиназа; MW — молекулярная масса; NGAL — желатиниза-связанный липокалин нейтрофилов; NOV — аденосаркомой почки суперэкспрессируемый белок; PAI — ингибитор активатора профибринолизина; PDGF — полученный из тромбоцитов фактор роста; PEDF — полученный из пигментного эпителия фактор; PG — простагландин; PTX — пентраксин-связанный белок; RANTES — отрегулированный на активации нормальных клеток экспрессируемый и секретируемый белок; PAC — система ангиотензина ренина; RBP — связывающий белок ретинола; SDF — стромально-клеточный фактор; sIL6R — растворимый рецептор ИЛ-6; sLepR — растворимый рецептор лептина; ррцеФНО — растворимый рецептор ФНО; SSAO — чувствительная к семикарбазиду оксидаза амина; TGF — трансформирующий фактор роста; ФНО- α — фактор некроза опухоли; VAP — сосудистый белок прилипания; VEGF — сосудистый фактор эндотелиального роста; WISP — белок WNT1-индуцибельного сигнального пути

[38, 39], преимущественно в ПЖТ, замедляется скорость обмена липидов и происходит перераспределение липидов в депо ВЖТ [40]. С возрастом под воздействием клеточных стрессовых реакций, вызванных липотоксичностью, гипоксией и / или нарушениями репликации [41, 42] может изменяться генная экспрессия с формированием клеточных фенотипов, напоминающих активированные макрофаги [43]. Старение также способствует инфильтрации иммунных клеток в ЖТ, приводит к увеличению популяций Т-клеток преимущественно в ВЖТ [44]. Кроме того, прогрессию дисфункции ЖТ с возрастом связывают с накоплением стареющих клеток [45], которые являются провоспалительными и развивают фенотип, характеризующийся секретомом с продукцией цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ и факторов роста, индуцирующих воспалительные процессы в преадипоцитах, ингибирующих дифференцировку и стимулирующих инфильтрацию иммунных клеток. С увеличением возраста в организме происходит множество гормональных и метаболических изменений. После 40–50 лет отмечается постепенное снижение уровня половых гормонов (эстрадиола, тестостерона), гормона роста, тироксина и, напротив, повышение уровня лептина и кортизола, секс-стероид-связывающего протеина. Эти изменения достигают пика после 60 лет. Основными, постоянно действующими факторами, лежащими в основе этих изменений, являются уменьшение как количества многих эндокриноцитов вследствие повышения активности апоптоза с возрастом, так и их секреторной активности, уменьшение амплитуды пульсаторной секреции многих гормонов, изменение числа и чувствительности рецепторов. В частности, увеличение возраста — значимый фактор повышения риска развития интолерантности к глюкозе, т. к. с возрастом отношение пролиферация/апоптоз бета-клеток все больше смещается в сторону преобладания апоптоза [46]. Из-за увеличения апоптоза бета-клеток растормаживается пролиферация альфа-клеток — процентное соотношение эндокриноцитов сдвигается в сторону продуцирующих глюкагон альфа-клеток с развитием относительного дефицита инсулина, что облегчает развитие НУО. Клеточное старение может играть центральную роль и в патогенезе возрастной резистентности к инсулину и СД2 [41]. Возрастная саркопения вносит вклад в нарастание с возрастом ИР [34]. Высока вероятность того, что существует прямая связь между провоспалительным секретомом при возрастной дисфункции ЖТ и скелетных мышц. Кроме того, с возрастом увеличивается влияние таких непостоянно действующих факторов, как развитие соматических заболеваний (ХПН, патология

печени и т. п.), питание, алкоголь, курение, возрастающая частота ожирения, усугубляющих вышеописанные изменения. Таким образом, возрастные изменения затрагивают клеточность, реакцию на инсулин, секретом и воспалительный статус ЖТ, что приводит к ее дисфункции. Возраст детерминирует сдвиг депонирования жира из подкожного в висцеральное депо с переходом МЗО в МНО.

ПОЛ

Функция и преимущественная локализация ЖТ различаются в зависимости от пола, что детерминировано различиями в профиле половых гормонов. У женщин, нормальный уровень эстрогенов обеспечивает отложение жира в глутеофemorальной области, высокую продукцию лептина с высокой же к нему чувствительностью. Мужчины накапливают больше ВЖТ, что приводит к формированию андроида (центрального) фенотипа ожирения, который сильно коррелирует с повышением сердечно-сосудистого риска. Женщины репродуктивного возраста накапливают больше жира в подкожном депо, но после развития менопаузы, уровень эстрогенов снижается и отложение жира смещается в висцеральное депо. Таким образом, эффекты пола определяются различиями в эффектах половых гормонов, которые будут обсуждены далее.

ГОРМОНЫ

Половые гормоны

Эффекты половых гормонов на депонирование жировой ткани в значительной степени определяются генетическим полом. Так, у женщин повышенный уровень андрогенов ассоциирован с ИР, усилением депонирования жира в висцеральном депо, развитием НУО. В то же время у мужчин высокий уровень тестостерона обеспечивает дифференцировку плюрипотентных клеток-предшественников в миоциты и изменение композиции тела в сторону преобладания мышечной ткани над жировой [48]. В условиях дефицита тестостерона у мужчин, напротив, усиливается депонирование жира в висцеральном депо и уменьшается миогенез. Тестостерон в норме активизирует гормон-чувствительную липазу (ГЧЛ) в адипоцитах, активирует липолиз и таким образом уменьшает массу жира. Активность липопротеин-липазы (ЛПЛ) ограничивает скорость накопления жира, и она выше в ПЖТ глутеофemorальной области по сравнению с ВЖТ у женщин, что обеспечивает накопление жира по гиноидному типу. Напротив, у мужчин активность ЛПЛ выше в ВЖТ. Эти половые различия в распределении ЖТ усиливаются под

воздействием тестостерона, супрессирующего ЛПЛ в ПЖТ глютеофеморальной области у мужчин. При ожирении увеличивается экспрессия и активность фермента ароматазы, обеспечивающего конверсию тестостерона в эстрадиол. Вследствие этого резко возрастает ароматизация тестостерона в эстрадиол и его количество снижается. Эстрадиол ингибирует в гипофизе выработку лютеинизирующего гормона (ЛГ), что сопровождается снижением продукции тестостерона в яичках и еще большим снижением его уровня в крови [49]. Лептин также ингибирует функцию яичек у взрослых, но в пубертатный период способствует развитию яичек [50]. В условиях изменения продукции адипоцитокинов в ЖТ нарастает ИР и уровень инсулина. В условиях гиперлептинемии и гиперинсулинемии уровень секс-стероид-связывающего глобулина и тестостерона еще больше снижается. В условиях дефицита тестостерона активируется липопротеиновая липаза в ЖТ и повышается захват адипоцитами ТГ, что способствует прогрессии ожирения [49]. В то же время высокий уровень тестостерона подавляет продукцию лептина [50]. Возраст вносит существенный вклад в характер взаимоотношений лептина и функции гонад у мужчин. Так, в препубертате уровень лептина у мальчиков повышается, и это способствует развитию тестикул. В период пубертата уровень лептина снижается под воздействием нарастающих уровней андрогенов. Соответственно, у взрослых мужчин, уровни лептина значительно ниже, чем у женщин, и повышение уровня лептина под воздействием каких-то факторов, включая ожирение, ингибирует функцию тестикул, приводя к снижению тестостерона [47, 50].

Эстрогены, как уже отмечено, способствуют депонированию жира в ПЖТ у женщин, преимущественно в глютеофеморальной области и в области груди. Это объясняется гендер-зависимыми различиями в экспрессии рецепторов к лептину и эстрогенам. Эстрогены непосредственно или через активацию их рецепторов на адипоцитах [рецепторы эстрогенов альфа ($ER\alpha$) и бета ($ER\beta$)] облегчают депонирование жира и активируют функции ЖТ. Липолитический эффект эстрогенов, в основном опосредован через $ER\alpha$, а $ER\beta$ может действовать как репрессор [51, 52]. Распределение рецепторов эстрогенов в различных депо ЖТ отличается у мужчин и женщин, внося существенный вклад в половой диморфизм фенотипов ожирения. У женщин более высокое соотношение $ER\alpha/\beta$ в ВЖТ ограничивает накопления жира в этом депо, тогда как более низкое соотношение $ER\alpha/ER\beta$ в глютеофеморальной ПЖТ обеспечивает его накопление. У мужчин значительно меньше количество $ER\alpha$ в ВЖТ, и низкое

соотношение $ER\alpha/ER\beta$ повышает депонирование жира в висцеральном депо [52]. Активация $ER\alpha$ улучшает функцию ЖТ за счет уменьшения ее воспаления и улучшения чувствительности к инсулину. Эстрогены могут регулировать (увеличивать) ангиогенез ЖТ, тем самым снижая выраженность гипоксии [53]. Гипоксия является ключевым индуктором оксидативного стресса, воспаления и гипертрофии ЖТ. Это позволяет рассматривать эффекты эстрогенов на ангиогенез как важный механизм, с помощью которого эстрогены уменьшают воспаление и фиброз ЖТ. Половой диморфизм также затрагивает активность и распределение липолитических $\beta 1$ -2 и антилиполитических $\alpha 2$ -адренергических рецепторов. Эстрадиол увеличивает число $\alpha 2$ -адренорецепторов в ПЖТ, но не оказывает влияния на них в ВЖТ [54], дифференцированно увеличивая симпатический тонус в различных депо ЖТ. В результате усиливается накопление липидов в ПЖТ у женщин и в ВЖТ — у мужчин [55]. Эстрогены могут модулировать способность жировых клеток увеличивать объем, усиливая ее в подкожном депо и ингибируя в висцеральном. Адипоциты молочных желез обладают самой высокой пластичностью. Они де-дифференцируются во время беременности и остаются в состоянии де-дифференцировки во время кормления грудью. После прекращения кормления, они пролиферируют и повторно дифференцируются в адипоциты. Эстрадиол модулирует активность ряда гормонов, вовлеченных в регуляцию чувства голода/насыщения, усиливает эффекты таких анорексигенных веществ, как холецистокинин, аполиппротеин A-IV, лептин, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), и уменьшает активность орексигенных гормонов, таких как меланокортин и грелин [55]. Эстрогены также защищают от увеличения веса, увеличивая расход энергии путем активации своих рецепторов в вентральном медиальном ядре гипоталамуса [53]. Эстрогены усиливают метаболическую активность ЖТ и потенцируют браунинг. В результате скорость метаболизма ЖТ выше у женщин вследствие большего количества бурой ЖТ и более высокой экспрессии генов, участвующих в функции митохондрий, включая разьединяющий белок (UCP-1) [55].

Женский мозг более чувствителен к воздействию лептина на регулирование потребления пищи и расхода энергии, что указывает на сильную синергию между гормоном ожирения лептином и эстрогенами в регуляции размножения и энергетического гомеостаза [53]. Между лептином и эстрогенами существует двусторонняя взаимосвязь. При снижении уровня лептина или чувствительности к нему происходит подавление секреции ксипептина

и через него — снижение выработки и нарушение циркадности гонадотропинов. Кроме того, лептин стимулирует производство рецепторов к гонадотропинам и гонадотропин-релизинг гормону. С другой стороны, высокий уровень эстрогенов (нарастание их продукции в динамике менструального цикла) стимулирует повышение уровня лептина, который достигает максимума к середине цикла [50].

Гормоны ЖТ и ЖКТ, вовлеченные в депонирование энергетических веществ

В обсуждении роли таких гормонов, как инсулин, адипоцитокينات, инкретины, грелин следует остановиться на двух аспектах — изменение уровня этих гормонов и чувствительности к ним. Роль инсулина и чувствительности к нему в развитии метаболических нарушений, входящих в МС, не вызывает сомнений. Хотя до последнего времени индикация именно ИР различными методами считалась ключевым методом оценки риска метаболических нарушений, недавние исследования показали, что гиперинсулинемия натощак (н/т) (уровень инсулина н/т выше 15 пг/мл при нормогликемии) тоже является достаточно надежным маркером [56].

Гормоны жировой ткани

Лептин, гормон ЖТ, имеющий системные эффекты, опосредованные его связыванием со специфичным рецептором. Ключевым эффектом лептина является контроль за аппетитом [57]. В нормальных физиологических условиях лептин обеспечивает наступление чувства насыщения, снижая потребление калорий, оказывает глюкозоснижающее действие, уменьшает эктопическое накопление жира через центральные и периферические механизмы, что должно благоприятно сказываться на метаболическом здоровье. Величина эффектов лептина зависит от ткани, пола и условий действия [58]. Секретция лептина увеличивается под влиянием целого ряда гормонов (эстрогены, гормон роста, тироксин, глюкокортикоиды и инсулин), изменения глюкозы, при приеме пищи, при ожирении, а снижается натощак, под воздействием катехоламинов, железа, СЖК, тестостерона. Он проявляет множество метаболических эффектов на различные ткани, и его эффекты при нормальной чувствительности к нему включают: а) в ЦНС — снижение потребления калорий, повышение расхода энергии, улучшение когнитивных функций и памяти; б) в печени — уменьшение аккумуляции липидов и глюкозы; в) в поджелудочной железе — ингибирование секреции глюкагона и инсулина; г) в мышцах — повышение окисления жирных кислот и метаболизма глюкозы; д) в ЖТ — в БуЖТ увеличивает утилизацию

глюкозы, в БЖТ активирует липолиз и тормозит липогенез; е) в костях ускоряет метаболизм. Глюкозоснижающие эффекты лептина частично обеспечиваются его прямым действием в периферических тканях, однако основной эффекторный путь лептина — через ЦНС, преимущественно через модуляцию активности нейронов ядер гипоталамуса. Это может объясняться значительно более высокой экспрессией рецепторов лептина в ЦНС. Многие эффекты лептина зависят от наличия инсулина и/или чувствительности к нему. Так, в условиях нормоинсулинемии лептин стимулирует липолиз, уменьшая депонирование жира в белой ЖТ и увеличивая расход энергии, однако в условиях дефицита инсулина и/или его эффектов (ИР) — напротив, ингибирует липолиз. У инсулинорезистентных пациентов с СД 2 типа введение лептина не улучшало гомеостаз глюкозы [59], что может быть следствием как ИР, так и лептинорезистентности (ЛР) [60, 61]. Инсулин может действовать на ЖТ, стимулируя синтез и секрецию лептина [62, 63], в то время как лептин ингибирует секрецию инсулина. Между тем лептин и инсулин, при нормальной чувствительности ЖТ к ним, действуют на нее синергично, увеличивая браунинг белых адипоцитов и способствуя тем самым увеличению расхода энергии [64]. Помимо ЖТ, лептин и его рецептор были идентифицированы в слизистой желудка [65, 66]. Его секретция в желудке происходит под воздействием холецистокинина (ХЦК), пентагастрина и секретина [65, 66], также как адипоцитарный лептин участвует в регулировании аппетита, действуя непосредственно в гипоталамусе или совместно с ХЦК через вагус [66].

Развитие лептинорезистентности и ИР аннулирует эти эффекты при ожирении, меняя вектор направленности эффектов лептина. Взаимоотношения лептин, масса ЖТ и метаболические эффекты лептина носят сложный характер и определяются такими факторами, как уровень лептина, выраженность его рецепторных эффектов, детерминируемая чувствительностью рецепторов лептина и нерецепторными эффектами. При этом способность лептина понижать глюкозу и оказывать антилипогенетические эффекты независима от регулирования лептином массы тела [58]. Высока вероятность, что именно чувствительность к лептину, а не его абсолютный уровень, является индикатором МЗ. Однако четких критериев их дифференциации не разработано.

Ожирение всегда характеризуется развитием гиперлептинемии, как и некоторые другие патологические состояния. Это подтверждает лабораторная оценка уровня лептина, который при ожирении всегда выше, чем у людей с нормальной массой

тела. Однако выявить наличие резистентности к лептину значительно сложнее. Термином ЛР можно обозначить состояние, при котором уровень лептина хронически высок, но эффекты его ослаблены и гиперлептинемия не вызывает подавления чувства голода и потерю массы ЖТ. Развитие ЛР при ожирении связано с множественными механизмами: нарушением транспорта через гематоэнцефалический барьер, ослаблением сигналинга лептина, стрессом эндоплазматического ретикулума, воспалением, дефицитом аутофагии. Можно полагать, что при ожирении развитие ЛР — постепенный динамический процесс, в ходе которого под влиянием избытка лептина, количество которого увеличивается пропорционально количеству ЖТ, постепенно снижается количество рецепторов к лептину, так как концентрация лептина регулирует и их производство, и их деградацию [67, 68]. Соответственно, метод индикации ЛР на основании уровня этого гормона натошак неточен, так как высокий уровень лептина объединяет состояния гиперлептинемии и ЛР. Современные подходы к выявлению ЛР используют оценку индексов и математических моделей, включающих, кроме определения лептина, оценку растворимых рецепторов лептина (рРцЛ) в циркуляции, соотношения лептина, рРцЛ и ИМТ. Между тем точный метод оценки ЛР — вопрос будущих исследований.

Адипонектин — адипокин, продуцируемый почти исключительно в ЖТ и высоко экспрессируемый в клетках БЖТ здоровых людей с нормальной массой тела. При патологических состояниях, характеризующихся хроническим неинфекционным воспалением, включая ожирение, уровень адипонектина снижается [69]. Высоковероятной причиной являются морфологические и функциональные изменения БЖТ, происходящие при ожирении. Из-за избыточного накопления ТГ адипоциты у тучных людей увеличиваются в размере. Гормональная активность адипоцитов БЖТ зависит от их размера, и более крупные адипоциты, типичные для людей с ожирением, производят значительно меньше адипонектина, но значительно больше провоспалительных цитокинов, таких как $\text{TNF-}\alpha$ [70]. При этом адипонектин и провоспалительные цитокины ($\text{TNF-}\alpha$ и IL-6) взаимно ингибируют секрецию друг друга [71, 72]. Отрицательная регуляция экспрессии адипонектина также является результатом гипоксии и окислительного стресса [73, 74]. Снижение экспрессии и секреции адипонектина в ЖТ при ожирении может рассматриваться как индуцирующий фактор в развитии сопровождающего ожирение воспаления и влечет за собой активацию множества патологических процессов, включая развитие

ИР [75]. Таким образом, адипонектин опосредует защитные эффекты при метаболических и сосудистых заболеваниях, связанных с ожирением, в основном через противовоспалительное действие. Интересной экспериментальной находкой явилось то, что хроническая гиперэкспрессия адипонектина сопровождается увеличением массы ПЖТ и защищает от индуцированной гиперкалорийным питанием резистентности к инсулину [76]. По нашим данным, при резком снижении массы ПЖТ у пациентов, перенесших бариатрическую операцию, экспрессия адипонектина в ПЖТ, напротив, снижается, в то время как его уровень в циркуляции возрастает [77].

Гормоны ЖКТ

При изучении пациентов с ожирением, мы отметили не только дисбаланс адипоцитокинов (лептина и адипонектина), но и дисбаланс инкретинов [глюкагоноподобного пептида 1 (ГПП-1) и глюкозозависимого инсулиноотропного пептида (ГИП)] и грелина. Эти гормоны вырабатываются Л- и К-клетками кишечника в ответ на стимуляцию пищей. Поэтому в норме их уровень очень низок натошак и повышается постпрандиально. ГПП-1 глюкозозависимым путем увеличивает секрецию инсулина, нормализует секрецию глюкагона, снижает апоптоз и увеличивает репликацию бета-клеток. Изучая уровень инкретинов при ожирении, мы отметили повышение уровня ГПП-1 натошак, что вероятно объясняется резистентностью к этому гормону, так как динамика его уровня в постпрандиальном статусе была ослаблена, а уровень ГИП, напротив, был значимо снижен как натошак, так и постпрандиально, что свидетельствует о его дефиците [77–80].

Роль ГИП в регуляции накопления энергии в ЖТ и развитии метаболических нарушений не вполне определена. ГИП оказывает эффекты на все ключевые ткани, важные для контроля гомеостаза глюкозы и липидов, стимулирует биосинтез и секрецию инсулина и увеличивает жизнеспособность клеток островков. Кроме того, ГИП непосредственно через свой рецептор (GIPRs) на адипоцитах регулирует метаболизм липидов (модулируя липолиз и липогенез в зависимости от уровня инсулина). Эффект ГИП на жировую ткань частично отрегулирован посредством активации ЛПЛ. Усиление секреции инсулина после выброса ГИП ингибирует липолиз в адипоцитах и стимулирует адипогенез при сохранной чувствительности к инсулину его рецептора (INSR) [81].

Натошак ГИП стимулирует секрецию глюкагона и липолиз в ПЖТ. В постпищевом статусе (повышение уровня глюкозы и инсулина), он ингибирует

секрецию глюкагона, стимулирует секрецию инсулина и адипогенез в ПЖТ, увеличивает поступление ТГ в ПЖТ. Считается, что ГИП отвечает за депонирование избытка энергии именно в ПЖТ. Соответственно, дефицит ГИП может способствовать перераспределению жира из ПЖТ в висцеральную. Эффекты ГИП на ЛПЛ опосредованы резистином, который также нарушает сигналинг инсулина и способствует развитию окислительного стресса в сосудистых клетках человека. С другой стороны, есть исследования, продемонстрировавшие, что ГИП стимулирует экспрессию провоспалительных факторов и хемокинов, способствуя ухудшению чувствительности адипоцитов к инсулину и формированию воспаления ЖТ. Между тем нельзя исключить, что эти эффекты были отмечены при нарушении чувствительности тканей к ГИП (ГИП-резистентность) — явлении, малоизученном в настоящее время.

Эффекты ГИП модулируются метаболическим окружением, в частности уровнем и чувствительностью к другим гормонам, вовлеченным в метаболизм ЖТ, уровнем глюкозы и липидов в кровотоке. У здоровых людей без ожирения уровень ГИП низкий натощак, не меняется при эугликемии, повышается при гипогликемии и снижается при гипергликемии (инсулиновый клэмп). У здоровых ГИП увеличивает секрецию лептина и грелина, усиливает кровоток в ЖТ, снижает уровень липидов (ЛПНП и ТГ) в крови благодаря их депонированию в ПЖТ, у женщин также повышает ЛПВП [82]. То есть в норме эффекты ГИП направлены на сохранение МЗ. У пациентов с МЗО уровень ГИП низкий натощак, но его постпищевой пик на высокожировом питании усилен. По мере увеличения ИМТ уровень ГИП увеличивается [82]. В то же время при МНО уровень ГИП повышен также и натощак, а его эффекты ослаблены, так как поступление ТГ в ПЖТ под влиянием ГИП снижено при МНО по сравнению с людьми без ожирения. При гиперинсулинемии и ИР резко возрастает депонирование жира в ВЖТ. При этом ГИП в большей степени способствует перераспределению ТГ и жирных кислот (ЖК) в ВЖТ у мужчин, чем у женщин. Несмотря на депонирование ТГ в ВЖТ, высокий уровень ГИП при гиперинсулинемии и гипергликемии был связан с увеличенными уровнями ТГ в кровотоке [81]. Однако по мнению других авторов, уровень ГИП натощак повышается лишь при НУО. Учитывая выявленные различия при МЗО и МНО, уровень ГИП может зависеть от ИР, а не от ИМТ. Таким образом, факторами, модулирующими уровень ГИП, могут быть чувствительность тканей к инсулину, уровень гликемии, а в постпищевом статусе также соотношение различных нутриентов в пище.

Высока вероятность, что при МНО развивается резистентность ПЖТ к ГИП прежде всего у мужчин, так как у них в два раза более высокий уровень ГИП после еды был связан с меньшим отложением жира в ПЖТ и большим в ВЖТ. У пациентов с СД уровень ГИП натощак повышен и не изменяется постпрандиально, а его эффекты нарушены: при повышении ГИП не повышается секреция инсулина, не тормозится секреция глюкагона и снижено поступление ТГ в ПЖТ.

Кроме ГПП-1 и ГИП, целый ряд других гормонов, продуцируемых нейроэндокринными клетками ЖКТ (холецистокинин, пептид YY (PYY), соматостатин) вовлечен в пищевой метаболизм. Практически все они характеризуются наличием анорексигенного эффекта, исключение составляет орексигенный гормон грелин.

Грелин

Грелин — гормон, вырабатываемый в основном нейроэндокринными клетками дна желудка (около 65 %) [83]. Небольшое количество продуцирующих грелин-клеток обнаружено в тонкой и толстой кишке, гипофизе [84]; α - [85], β - [86], и дельта-клетках [87] островков Лангерганса и нейронах дугообразного ядра гипоталамуса [88, 89]. Незначительная экспрессия грелина была также обнаружена в почках, яичках, плаценте [90–92] и иммунocyтах [93]. Секреция грелина в желудке регулируется пищевыми и гормональными факторами [94]. Она ингибируется соматостатином, интерлейкином 1 β (IL-1 β), СТГ, едой с высоким содержанием жира, повышением активности вагуса, тогда как голод и низкобелковое питание стимулирует экспрессию и секрецию грелина. Соответственно, уровень грелина в норме наиболее высок натощак и снижается после еды в отличие от других гормонов, вовлеченных в регуляцию усвоения и депонирования нутриентов. Сообщения об эффектах лептина на продукцию грелина носят противоречивый характер [95, 96], что может определяться сохранностью чувствительности к эффектам лептина и воздействием других факторов. Сопряженные эффекты лептина и грелина могут обеспечивать регуляторную систему обратной связи, вовлекающую ЖКТ и ЦНС, и выступать в роли интерфейса между регулируемыми центрами аппетита в гипоталамусе и функциями ЖКТ в управлении метаболизмом и ростом [97].

Этот гормон играет важную роль как в регуляции пищевого поведения, так и в регуляции инсулиновой секреции и чувствительности к инсулину. Грелин идентифицирован как эндогенный лиганд для рецепторов соматотропина (GHS). Он функционирует как орексигенный (стимулирующий ап-

петит) сигнал от желудка [98]. Основные эффекты грелина включают: острое снижение чувствительности к инсулину; регуляцию, в антагонистической манере к лептину, синтеза и секреции нескольких нейропептидов в гипоталамусе, а именно повышение аппетита через стимуляцию выработки нейропептида Y (NPY) и агутин-пептида (AgRP); стимуляцию секреции контррегулирующих гормонов (кортизол, глюкагон, катехоламины), в основном через центральные механизмы, супрессию секреции адипонектина и инсулина; снижение печеночной чувствительности к инсулину путем блокады печеночной передачи сигнала инсулина на уровне phosphatidylinositol-3-kinase; стимуляцию депонирования жира (адипогенез); повышение активности лактотрофов и кортикотрофов; усиление моторики желудка и секреции соляной кислоты.

Многие исследователи отмечают, что при ожирении уровень грелина значительно ниже натошак, чем у людей с нормальной массой тела, и отрицательно коррелирует с ИМТ, содержанием жира, уровнем инсулина и лептина н/т [99]. Наши данные, как и результаты других исследований, указывают на более значимое повышение лептина и менее выраженное снижение грелина, чем у мужчин [47]. При попытках нормализации веса грелин препятствует его потере, так как потеря веса сопровождается увеличением уровня грелина, который позитивно коррелирует со степенью потери веса [100] и усиливает чувство голода. В постпищевом статусе у большей части пациентов с ожирением не происходит дополнительного снижения его уровня, в отличие от здоровых людей, что, во-первых, может быть признаком развития грелин-резистентности, во-вторых, может способствовать увеличенному потреблению пищи [101].

Логично предположить, что раз первой гормональной реакцией при поступлении пищи на количество и качественный состав нутриентов является секреция инкретинов и грелина, то именно их дисбаланс первичен. Между тем при развитии инсулинорезистентности (повышение НОМА-IR) развивается снижение чувствительности рецепторов ГИП в тканях. Гипотетически последовательность изменений можно выразить в виде схемы, представленной на рис. 3.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ

Как было отмечено в начале, генетическая детерминация имеет значительно меньший вклад в формирование как самого ожирения, так и его метаболических осложнений, чем образ жизни. Очень красивым примером этого являются данные, представленные

в статье Ligthart S, et al. (2021), авторы которой оценили полигенный риск развития СД 2 типа у пациентов с нормальной массой тела и ожирением у 8 243 человек, включенных в исследование ARIC, и 7 428 участников, включенных в Роттердамское исследование (RS)[102], основываясь на полигенной оценке 403 общих вариантов последовательности ДНК, идентифицированных как факторы риска диабета 2 типа [103]. Авторы сначала оценили полигенный риск и распределили обследованных на группы низкого, умеренного и высокого риска. Пожизненный риск развития СД2 среди лиц в возрасте 45 лет составил 22,8 % (95 % ДИ 18,4–27,3) в категории низкого генетического риска; 30,6 % (95 % ДИ 27,9–33,4) в категории промежуточного генетического риска и 35,5 % (95 % ДИ 30,6–40,5) в категории высокого генетического риска в когорте RS и 32,6 % (95 % ДИ 27,8–37,4) в категории низкого генетического риска; 41,1 % (95 % ДИ 38,9–43,2) в категории промежуточного генетического риска и 47,6 % (95 % ДИ 44,3–50,8) в категории высокого генетического риска в когорте ARIC. Участники с ожирением имели более чем в два раза повышенный риск развития диабета по сравнению с людьми с нормальным весом в категориях умеренного и высокого риска. При этом среди участников с высоким генетическим риском нормальный вес был связан с 56 % более низким риском развития диабета в исследовании ARIC и на 55 % более низким риском при RS по сравнению с ожирением.

В исследованиях последних лет молекулярно-генетические исследования самой жировой ткани привлекли к себе внимание. Большинство исследований, как и наши собственные более ранние результаты, демонстрируют более высокую экспрессию гена и мРНК лептина в ПЖТ по сравнению с таковой в ВЖТ у людей с ожирением [77]. У людей без ожирения экспрессия лептина в обоих сайтах ниже [104] или сопоставима [105] с таковой при ожирении. Более высокая экспрессия гена лептина в ПЖТ отмечается у женщин, коррелируя с его уровнем в циркуляции, в отличие от мужчин, что может объясняться особенностями формирования ожирения: для мужчин характерно более раннее и приоритетное накопление жира в ВЖТ с характерным для нее дисбалансом продукции адипокинов [106]. Экспрессия гена и мРНК адипонектина снижена при ожирении в ЖТ, но, в отличие от лептина, изменения его экспрессии более выражены в ВЖТ [107]. Наконец, недавнее исследование, изучившее вклад экспрессии различных адипокинов в отдельных сайтах ЖТ (ВЖТ и ПЖТ) в их уровень в циркуляции, показало, что лишь экспрессия гена лептина в ПЖТ оказывает существенное влияние на его уро-

вень в циркуляции, а значит, может определять его системные эффекты [108].

Между тем проведение полногеномных исследований позволяет обнаружить новые пути реализации механизмов формирования различных фенотипов ожирения, изменения гормонального и биомаркерного фона, причины различий в прогнозе и ответе на терапии. Формирование из огромного числа генов, для которых показана связь с риском развития ожирения, изменением различных метаболических параметров, уже сегодня позволяет сформировать генетические панели, детерминирующие развитие

МЗО или МНО, НУО и СД, АГ, ДЛП с высокой точностью. Подробное описание этих исследований — тема для отдельной статьи.

Представленный в этом обзоре анализ показал, что поддержание метаболического здоровья требует сохранения/восстановления нормальной чувствительности к лептину, ГПП, грелину, что неотделимо от нормализации морфологии ЖТ и чувствительности к инсулину. Поддержание уровня половых гормонов на уровне репродуктивного возраста также способно существенно сдерживать развитие изменений в сторону МНО.

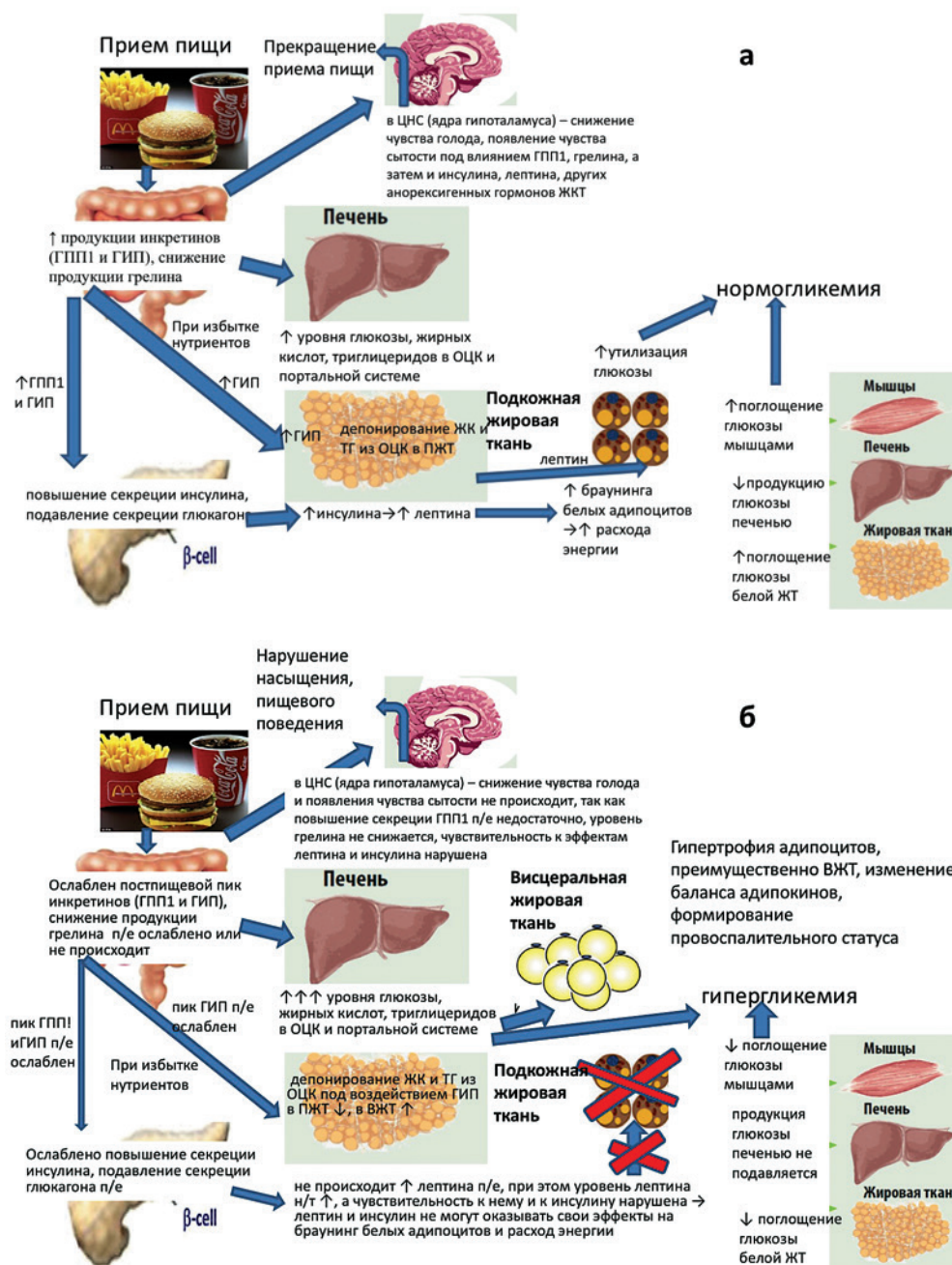


Рис. 3. Регуляция метаболизма нутриентов в норме (а) и при переедании (б)

Оптимальным всегда является вмешательство, направленное на устранение причинных факторов. Как было отмечено в начале данного обзора, ключевыми причинными факторами ожирения и утраты метаболического здоровья являются переизбыток и гиподинамия, которые дополняются нарушениями сна, воздействием социопатогенных факторов внешней среды, стрессом. Тем не менее различия в воздействиях уже сейчас могут быть персонифицированы на основе гендерных различий: ответ на диету с высоким содержанием жира кардинально различается у мужчин и женщин. У мужчин кетогенные диеты вызывают неблагоприятные метаболические изменения (повышение уровня ненасыщенных ЖК и маркеров воспаления), которые не наблюдаются у женщин [109]. Возраст также влияет на выбор вмешательств — выбор терапии в пользу препаратов, замедляющих клеточное старение, таких как метформин, позволяет модулировать скорость этих процессов. Привлечение заместительной терапии половыми гормонами также способно значительно замедлить скорость возрастных изменений. Длительность ожирения, НУО также детерминируют ответ. У пациентов с коротким анамнезом ожирения при снижении массы тела отмечалась нормализация объема адипоцитов, в то время как у пациентов с большой длительностью даже бариатрические вмешательства не позволяли устранить гипертрофические изменения [2]. Снижение веса на 10 % и более и уменьшение содержания ТГ в печени у пациентов с коротким анамнезом (до 6 лет) СД 2 типа позволяло добиться ремиссии СД [110], в то время как при длительности заболевания (более 10 лет) ремиссия маловероятна даже после бариатрических вмешательств.

Будущие направления персонификации терапии ожирения предполагают использование препаратов, таргетно уменьшающих накопление жира в ВЖТ и его избыточное эктопическое накопление. Использование в качестве мишеней активности ангиогенеза, фиброза, модуляцию активности рецепторов/уровня гормонов, вовлеченных в депонирование жира в различных жировых депо, может помочь в решении этих задач. Перспективным представляется модуляция чувствительности к ГИП, резистентность к которому перенаправляет липиды из подкожного в висцеральное депо. Активация браунинга ЖТ с повышением метаболической активности адипоцитов также выглядит привлекательно. Уже сегодня способность влиять на его активность обсуждается у ряда препаратов (арГПП1, глифлозины, редуксин), продемонстрировавших способность не только снижать массу тела, но и улучшать метаболические параметры. Уточнение молекулярно-генетических путей формирования различных

фенотипов ожирения поможет в разработке новых препаратов для индивидуального выбора в терапии.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(11):1585–1594. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803326.
2. Morigny P, Bouche J, Arner P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(5):276–295. DOI: 10.1038/s41574-021-00471-8.
3. Chen GC, Arthur R, Iyengar NM, et al. Association between regional body fat and cardiovascular disease risk among postmenopausal women with normal body mass index. *Eur Heart J*. 2019;40(34):2849–2855. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz391.
4. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, et al. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(6):301–313. DOI: 10.3109/10408363.2015.1041582.
5. Tandon P, Wafer R, Minchin JEN. Adipose morphology and metabolic disease. *J Exp Biol*. 2018;221(Pt Suppl 1):jeb164970. DOI: 10.1242/jeb.164970.
6. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia*. 2010;53(12):2496–2503. DOI: 10.1007/s00125-010-1889-3.
7. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noel S, et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011;60(5):1504–1511. DOI: 10.2337/db10-1039.
8. Lonn M, Mehlig K, Bengtsson C, et al. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J*. 2010;24(1):326–331. DOI: 10.1096/fj.09-133058.
9. Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315(2):284–295. DOI: 10.1152/ajpregu.00257.2017.
10. Jung CH, Lee WJ, Song KH. Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *Korean J Intern Med*. 2017;32(4): 611–621. DOI: 10.3904/kjim.2016.259.
11. Rey-López JP, de Rezende LF, Pastor-Valero

M, et al. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obes Rev.* 2014;15(10):781–790. DOI: 10.1111/obr.12198

12. Bo S, Musso G, Gambino R, et al. Prognostic implications for insulin-sensitive and insulin-resistant normal-weight and obese individuals from a population-based cohort. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(5):962–969. DOI: 10.3945/ajcn.112.040006.

13. Kloting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(3):E506–515. doi: 10.1152/ajpendo.00586.2009.

14. Tang A, Coster ACF, Tonks KT, et al. Longitudinal changes in insulin resistance in normal weight, overweight and obese individuals. *J Clin Med.* 2019;8(5):623. DOI: 10.3390/jcm8050623.

15. Packer M. Differential pathophysiological mechanisms in heart failure with a reduced or preserved ejection fraction in diabetes. *JACC Heart Fail.* 2021;9(8):535–549. DOI: 10.1016/j.jchf.2021.05.019.

16. Roos V, Elmståhl S, Ingelsson E, et al. Metabolic syndrome development during aging with special reference to obesity without the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2017;15(1):36–43. DOI: 10.1089/met.2016.0082.

17. Zheng R, Liu C, Wang C, et al. Natural course of metabolically healthy overweight/obese subjects and the impact of weight change. *Nutrients.* 2016;8(7):430. DOI: 10.3390/nu8070430.

18. Khan UI, Wang D, Karvonen-Gutierrez CA, et al. Progression from metabolically benign to at-risk obesity in perimenopausal women: a longitudinal analysis of Study of Women Across the Nation (SWAN). *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2516–2525. DOI: 10.1210/jc.2013-3259.

19. Kabat GC, Wu WY-Y, Bea JW, et al. Metabolic phenotypes of obesity: frequency, correlates and change over time in a cohort of postmenopausal women. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(1):170–177. DOI: 10.1038/ijo.2016.179.

20. Hwang Y-C, Hayashi T, Fujimoto WY, et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int J Obes.* 2015;39(9):1365–1370. DOI: 10.1038/ijo.2015.75.

21. Bell JA, Hamer M, Sabia S, et al. The natural course of healthy obesity over 20 years. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(1):101–102. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.09.077.

22. Appleton SL, Seaborn CJ, Visvanathan R, et al. Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care.* 2013;36(8):2388–2394. DOI: 10.2337/dc12-1971.

23. Zembic A, Eckel N, Stefan N, et al. An empirically derived definition of metabolically healthy obesity based on risk of cardiovascular and total mortality. *JAMA Netw Open.* 2021;4(5):e218505. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.8505.

24. Stefan N. Causes, consequences, and treatment of metabolically unhealthy fat distribution. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(7):616–627. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30110-8.

25. Lotta LA, Wittemans LBL, Zuber V, et al. Association of genetic variants related to gluteofemoral vs abdominal fat distribution with type 2 diabetes, coronary disease, and cardiovascular risk factors. *JAMA.* 2018;320(24):2553–2563. DOI: 10.1001/jama.2018.19329.

26. Neeland IJ, Poirier P, Despres JP. Cardiovascular and metabolic heterogeneity of obesity: clinical challenges and implications for management. *Circulation.* 2018;137(13):1391–1406. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029617

27. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med.* 2008;359(20):2105–2120. DOI: 10.1056/NEJMoa0801891

28. Haring HU. Novel phenotypes of prediabetes? *Diabetologia.* 2016;59(9):1806–1818. DOI: 10.1007/s00125-016-4015-3.

29. Lee MJ, Kim E-H, Bae SJ, et al. Protective role of skeletal muscle mass against progression from metabolically healthy to unhealthy phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;90(1):102–113. DOI: 10.1111/cen.13874.

30. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist LO, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013;19(5):631–634. DOI: 10.1038/nm.3017.

31. Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, et al. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)* 2014;38(6):812–817. DOI: 10.1038/ijo.2013.206.

32. Orava J, Nuutila P, Noponen T, et al. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(11):2279–2287. DOI: 10.1002/oby.20456.

33. Raiko J, Holstila M, Virtanen KA, et al. Brown adipose tissue triglyceride content is associated with decreased insulin sensitivity independent of age and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(5):516–519. DOI: 10.1111/dom.12433.

34. Cleasby ME, Jamieson PM, Atherton PJ. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J Endocrinol.* 2016;229(2):R67–R81. DOI: 10.1530/JOE-15-0533.

35. Gerst F, Wagner R, Oquendo MB, et al. What role do fat cells play in pancreatic tissue? *Mol Metab.* 2019;25:1–10. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.05.001.

36. Stout MB, Tchkonian T, Kirkland JL. The aging adipose organ: lipid redistribution, inflammation, and cellular senescence. In: *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, edited by Fantuzzi G, Braunschweig C. New York: Humana. 2014;69–80.
37. Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, et al. Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest*. 2006;116(11): 2945–2954. DOI: 10.1172/JCI28721.
38. Karagiannides I, Tchkonian T, Dobson DE, et al. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(6):R1772–1780. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.6.R1772.
39. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plastic Surg*. 2008;60(5):538–544. DOI: 10.1097/SAP.0b013e3181723bbe.
40. Stout MB, Justice JN, Nicklas BJ, et al. Physiological aging: links among adipose tissue dysfunction, diabetes, and frailty. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(1):9–19. DOI: 10.1152/physiol.00012.2016.
41. Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, et al. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNF α exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(3):735–748. DOI: 10.1152/ajpendo.90851.2008.
42. Tchkonian T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9(5):667–684. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x.
43. Zhu Y, Tchkonian T, Stout MB, et al. Inflammation and the depot-specific secretome of human preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(5):989–999. DOI: 10.1002/oby.21053.
44. Lumeng CN, Liu J, Geletka L, et al. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J Immunol*. 2011;187(12):6208–6216. DOI: 10.4049/jimmunol.1102188.
45. Xu M, Palmer AK, Ding H, et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. 2015;4:e12997. DOI: 10.7554/eLife.12997.
46. Lee PG, Halter JB. The pathophysiology of hyperglycemia in older adults: clinical considerations. *Diabetes Care*. 2017;40(4): 444–452. DOI: 10.2337/dc16-1732.
47. Babenko AY, Matveev GA, Alekseenko TI, et al. Interrelations of components of metabolic syndrome with the level of the hormones involved in regulation of adipose tissue metabolism. *Arterial Hypertension*. 2019;25(6):639–652. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-6-639-652.
48. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*. 2003;144(11):5081–5088. DOI: 10.1210/en.2003-0741.
49. Buvat J, Maggi M, Guay A, et al. Testosterone deficiency in men: systematic review and standard operating procedures for diagnosis and treatment. *J Sex Med*. 2013;10(1):245–284. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2012.02783.x.
50. Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, et al. The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology*. 2021;162(2):bqaa204. DOI: 10.1210/endo/bqaa204.
51. Gavin KM, Cooper EE, Raymer DK, et al. Estradiol effects on subcutaneous adipose tissue lipolysis in premenopausal women are adipose tissue depot specific and treatment dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(11):1167–1174. DOI: 10.1152/ajpendo.00023.2013.
52. Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, et al. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*. 2006;55(4):978–987. DOI: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339.
53. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, et al. Silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(7):2501–2506. DOI: 10.1073/pnas.0610787104.
54. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(1):E155–E162. DOI: 10.1152/ajpendo.00257.2004.
55. Nookaew I, Svensson P-A, Jacobson P, et al. Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):E370–E378. DOI: 10.1210/jc.2012-2764.
56. Kolb H, Kempf K, Röhling M, et al. Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC Medicine*. 2020;18(1):224. DOI: 10.1186/s12916-020-01688-6.
57. Schnurbein J, Manzoor J, Brandt S, et al. Leptin is not essential for obesity-associated hypertension. *Obes Facts*. 2019;12(4):460–475. DOI: 10.1159/000501319.
58. Pereira S, Cline DL, Glavas MM, et al. Tissue-specific effects of leptin on glucose and lipid metabolism. *Endocr Rev*. 2021;42(1):1–28. DOI: 10.1210/endo/bnaa027.
59. Mittendorfer B, Horowitz JF, DePaoli AM, et al. Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes.

- Diabetes. 2001;60(5):1474–1477. DOI: 10.2337/db10-1302.
60. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996;348(9021):159–161. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)03173-x.
 61. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 1996;97(5):1344–1347. DOI: 10.1172/JCI118551.
 62. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, et al. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1997;138(10):4463–4472. DOI: 10.1210/endo.138.10.5451.
 63. Saladin R, DeVos P, Guerre-Millo M, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 1995;377(6549):527–529. DOI: 10.1038/377527a0.
 64. Dodd GT, Descherf S, Loh K, et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell*. 2015;160(1-2):88–104. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.022.
 65. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. 2000;47(2):178–183. DOI: 10.1136/gut.47.2.178.
 66. Sobhani I, Buyse M, Goiot H, et al. Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology*. 2002;122(2):259–263. DOI: 10.1053/gast.2002.31385.
 67. Martin RL, Perez E, He YJ, et al. Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism*. 2000;49(11):1479–1484. DOI: 10.1053/meta.2000.17695.
 68. Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, et al. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(2):492–495. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7622.
 69. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79–83. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0255.
 70. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005;96(9):939–949. DOI: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
 71. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(4):1045–1050. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00090-1.
 72. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes*. 2003;52(4):942–947. DOI: 10.1507/endocrj.K07-032.
 73. Hattori Y, Akimoto K, Gross SS, et al. Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1066–1074. DOI: 10.1007/s00125-005-1766-7.
 74. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901–911. DOI: 10.2337/db06-0911.
 75. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8(7):731–737. DOI: 10.1038/nm724.
 76. Kim J-Y, Van De Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2621–2637. DOI: 10.1172/JCI31021.
 77. Vasileva LB, Artemyeva MS, Ma Y, et al. The effect of obesity, impaired carbohydrate metabolism and bariatric surgery on adiponectin and leptin mRNA levels in different adipose tissue depots. *Arterial Hypertension*. 2019;25(5):568–576. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-568-576.
 78. Anandhakrishnan A, Korbonits M. Glucagon-like peptide-1 in the pathophysiology and pharmacotherapy of clinical obesity. *World J Diabetes*. 2016;7(20):572–598. DOI: 10.4239/wjd.v7.i20.572.
 79. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Takahira N, et al. Elevated circulating levels of an incretin hormone, glucagon-like peptide-1, are associated with metabolic components in high-risk patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:17. DOI: 10.1186/1475-2840-9-17.
 80. Cho YM, Fujita Y, Kieffer TJ. Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:535–559. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170315.
 81. Møller CL, Vistisen D, Færch K, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is Associated With Lower Low-Density Lipoprotein But Unhealthy Fat Distribution, Independent of Insulin: The ADDITION-PRO Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):485–493. DOI: 10.1210/jc.2015-3133.
 82. Gasbjerg LS, Gabe MBN, Hartmann B, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor antagonists as anti-diabetic agents. *Peptides*. 2018;100:173–181. DOI: 10.1016/j.peptides.2017.11.021.
 83. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4753–47538. DOI: 10.1210/jcem.86.10.7885.

84. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):881–887. DOI: 10.1210/jcem.86.2.7190.
85. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes.* 2002;51(1):124–129. DOI: 10.2337/diabetes.51.1.124.
86. Volante M, Allia E, Gugliotta P, et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1300–1308. DOI: 10.1210/jcem.87.3.8279.
87. Wierup N, Svensson H, Mulder H, et al. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept.* 2002;107(1-3):63–69. DOI: 10.1016/s0167-0115(02)00067-8.
88. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656–660. DOI: 10.1038/45230.
89. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 2004;18(3):439–456. DOI: 10.1096/fj.03-0641rev.
90. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* 2000;486(3):213–216. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)02308-5.
91. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology.* 2002;143(2):717–725. DOI: 10.1210/endo.143.2.8646.
92. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology.* 2001;142(2):788–794. DOI: 10.1210/endo.142.2.7987.
93. Hattori N, Saito T, Yagyu T, et al. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4284–4291. DOI: 10.1210/jcem.86.9.7866.
94. Pinkney J, Williams G. Ghrelin gets hungry. *Lancet.* 2002;359(9315):1360–1361. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08387-3.
95. Lee H-M, Wang G, Englander EW, et al. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology.* 2002;143(1):185–190. DOI: 10.1210/endo.143.1.8602.
96. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, et al. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(5):1220–1225. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4518.
97. Lindqvist A, Erlanson-Albertsson C. Fat Digestion and its Role in Appetite Regulation and Energy Balance -The Importance of Enterostatin and Tetrahydrolipstatin. *Curr Med Chem — Central Nervous System Agents.* 2003;3:157–175. DOI: 10.2174/1568015033477712.
98. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from stomach. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(8):551–560. DOI: 10.1038/35086018.
99. Tschoop M, Weyer C, Tataranni PA, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 2001;50(4):707–709. DOI: 10.2337/diabetes.50.4.707.
100. Hansen TK, Dall R, Hosoda H, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56(2):203–206. DOI: 10.1046/j.0300-0664.2001.01456.x.
101. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, et al. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2984–2987. DOI: 10.1210/jcem.87.6.8738.
102. Ligthart S, Hasbani NR, Ahmadizar F, et al. Genetic susceptibility, obesity and lifetime risk of type 2 diabetes: The ARIC study and Rotterdam Study. *Diabet Med.* 2021;38(10):e14639. DOI: 10.1111/dme.14639.
103. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet.* 2018;50(11):1505–1513. DOI: 10.1038/s41588-018-0241-6.
104. Tinahones FJ, Coín-Aragüez L, Mayas MD, et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* 2012;12:4. DOI: 10.1186/1472-6793-12-4.
105. Tsiotra PC, Boutati E, Dimitriadis G, et al. High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells. *Biomed Res Int.* 2013;2013:487081. DOI: 10.1155/2013/487081.
106. Pereira-Fernandes A, Dirinck E, Dirtu AC, et al. Expression of obesity markers and Persistent Organic Pollutants levels in adipose tissue of obese patients: reinforcing the obesogen hypothesis? *PLoS One.* 2014;9(1):e84816. DOI: 10.1371/journal.pone.0084816.
107. Cano-Martínez LJ, Marroquín C, Coral-Vázquez RM, et al. Expression of adipokines and their receptors in adipose tissue of women with class 3 obesity with or without hypertension. *Gene.* 2019;702:148–152. DOI: 10.1016/j.gene.2019.03.070.

108. Konigorski S, Janke J, Drogan D, et al. Prediction of circulating adipokine levels based on body fat compartments and adipose tissue gene expression. *Obes Facts*. 2019;12(6):590–605. DOI: 10.1159/000502117.

109. Morselli E, Fuente-Martin E, Finan B, et al. Hypothalamic PGC-1 α protects against high-fat diet exposure by regulating ER α . *Cell Rep*. 2014;9(2):633–645. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.025.

110. Taylor R. Calorie restriction for long-term remission of type 2 diabetes. *Clin Med (Lond)*. 2019;19(1):37–42. DOI: 10.7861/clinmedicine.19-1-37.

Информация об авторах:

Бабенко Алина Юрьевна, д.м.н., руководитель НИО генетических рисков и персонифицированной профилактики НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Голикова Татьяна Игоревна, младший научный сотрудник НИЛ предиабета и других метаболических нарушений НИО генетических рисков и персонифицированной профилактики НЦМУ «Центр персонализированной медицины».

OBESITY AS A PREDICTOR OF METABOLIC DEVIATIONS AND THE PURPOSE FOR THE PERSONIFIED IMPACT

Babenko A. Yu., Golikova T. I.

World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Babenko Alina Yu.,
World-Class Research Centre for
Personalized Medicine,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: babenko_ayu@almazovcentre.ru

Received 07 September 2021; accepted
25 October 2021.

ABSTRACT

This review is devoted to a description of the factors that underlie various phenotypes of obesity, their interrelationships, a predictor role in predicting metabolic health, maintaining it, in response to various options for therapeutic interventions. The review covered only key parameters: the role of the localization and morphology of adipose tissue in its metabolic activity and secretome characteristics, the role of the main adipokines and hormones involved in the regulation of nutritional metabolism, regulation of appetite and eating behavior and sensitivity to them in the development of obesity of various phenotypes. The role of unmodifiable factors (age and gender) is outlined, and the prospects for using these data in the fight against the obesity epidemic are briefly described.

Key words: adipokines, adipose tissue, gastrointestinal hormones, obesity, phenotypes, secretom.

For citation: Babenko AYu, Golikova TI. Obesity as a predictor of metabolic deviations and the purpose for the personified impact. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1): 59-94.

Abbreviations: TNF — tumor necrosis factor, AH — arterial hypertension, BP — blood pressure, WAT — white adipose tissue, BAT — brown adipose tissue, VAT — visceral adipose tissue, VO — visceral obesity, GIP — glucose-dependent insulinotropic peptide, GLP1 — glucagon-like peptide 1, HSL — hormone-sensitive lipase, DLP — dyslipidemia, FA — fatty acids, AT — adipose tissue, CHD — coronary heart disease, IL — interleukin, BMI — body mass index, IR — insulin resistance, IGF — insulin-like growth factor, LH — luteinizing hormone, HDL — high-density lipoproteins, LPL — lipoprotein lipase, LR — leptino resistance, MH — metabolic health, MHO — metabolically healthy obesity, MUO — metabolically unhealthy obesity, MS — metabolic syndrome, NAFLD — non-alcoholic fatty liver disease, CMD — carbohydrate metabolism disorder, TV — thigh volume, WC — waist circumference, SAT — subcutaneous adipose tissue, sLR — soluble leptin receptors, DM2 — type 2 diabetes mellitus, FFA — free fatty acids, HF — heart failure, CV — cardiovascular, TG — triglycerides, AF — atrial fibrillation, CKD — chronic kidney disease, CCK — cholecystokinin.

INTRODUCTION

1. Obesity as a problem of modern civilization

Obesity is a heterogeneous condition characterized by excessive accumulation of fat in various fat depots. Normally, fat is deposited mainly in the subcutaneous fat depot. In conditions of excess energy (nutrients), its excess accumulates in white adipocytes of subcutaneous adipose tissue (SAT), becoming both a reserve that can be consumed under conditions of energy deficiency and protection against cooling. Meanwhile, in the conditions of modern life, these functions of SAT have ceased to be relevant for most people, and since the consumption of fat from the depot practically does not occur due to the lack of energy deficiency, its reserves become excessive, exceeding the depositing capacity of cells. The role of genetic predisposition in the spread of the obesity epidemic is significantly inferior to the contribution of lifestyle, since the highest increase in the frequency of obesity has been observed in the last 40 years. As Joslin described a hundred years ago, “genetics probably loads the gun, while lifestyle in our obesogenic environment pulls the trigger for the spreading of the obesity epidemic.” In addition to overeating and hypodynamia, a number of additional environmental, behavioral and socio-economic factors affect calorie intake and/or consumption, causing weight gain [1]. Normally, SAT accounts for more than 80% of the entire fat layer, while visceral adipose tis-

sue (VAT) accounts for about 10% in women and 20% in men [2]. However, the continued excess supply of nutrients leads to the fact that energy begins to accumulate in other depots — in the visceral adipose tissue and in the periorgan and intraorgan areas. Undoubtedly, this scheme of the sequence of development of various obesity options is extremely simplified, and this issue should be discussed in more detail.

2. Obesity and metabolic health — what determines the latter?

Different phenotypes of obesity are definitions of metabolically healthy obesity.

Dynamics of understanding

The localization of the accumulation of adipose tissue (AT) in certain areas of the body (gluteofemoral, abdominal) and fat depots (subcutaneous, visceral) is influenced by many factors. The most pronounced shifts in the production of biologically active substances involved in the regulation of metabolic processes are noted in visceral obesity (VO), which is usually metabolically unhealthy. Meanwhile, the differences in the effects on metabolic health (MH) and cardiovascular (CV) risks are not only in VAT and SAT, but also in the localization of SAT (gluteofemoral, abdominal). Adipocytes of abdominal SAT are characterized by rapid capture and conservation of energy after eating, high lipid metabolism rate (lipolysis), whereas fat deposits of the lower body have a low lipid metabolism rate and isolate lipids that would otherwise enter non-fat tissues (ectopia of AT). Thus, SAT of the lower body has a higher ability to deposit and preserve lipids [3]. As the body mass index (BMI) increases, the rate of lipid metabolism slows down. Recent studies have shown that there are differences not only for AT localized in different areas of the body, but also for those located at different depths from the skin. The deeper layers of SAT have structural and functional differences: a higher expression of pro-inflammatory, lipogenic and lipolytic genes, a lower methylation level of DNA PPAR- γ , and contain a higher proportion of small adipocytes. That is, deeper layers of SAT have a greater adipogenic potential. The morphology of AT also affects MH. Although obesity is usually characterized by a combination of hypertrophy and hyperplasia of adipocytes, the prevalence of hypertrophy is associated with an unfavorable cardiometabolic profile [4]. The large size of adipocytes is associated with a low rate of lipid metabolism in them and the presence of negative cardiometabolic changes. At the same time, there are contradictions in the data on which localization of adipocyte hypertrophy (visceral or subcutaneous) determines cardiovascular risks. In some studies, the relationship of hypertrophy of VAT cells with insulin resistance (IR) and cardiovascular

diseases was established [5], in others, hypertrophy of visceral adipocytes was associated with dyslipidemia (DLP), while hypertrophy of subcutaneous adipocytes was associated with insulin resistance [6, 7] and the development of type 2 diabetes mellitus (DM2) [8], and normalization of their volume with weight loss was accompanied by normalization of insulin sensitivity [9].

However, these features are not always taken into account in the assessment of metabolically healthy/unhealthy obesity. Metabolically healthy obesity (MHO) is generally understood as obesity, in which there are no significant metabolic disorders [DLP, carbohydrate metabolism disorders (DOE), hyperuricemia, etc.], arterial hypertension (AH), or there is no more than one such disorder. Additionally, an unfavorable inflammatory profile (CRP level 3 g/l) and insulin resistance (HOMA-IR < 2.5) are included, however, recommendations for MHO criteria are very variable, as well as assessments of its prevalence (from 6% to 40%) [10]. Most studies include the presence of the main components of metabolic syndrome (MS) [blood pressure (BP) $\geq$ 130/85 mmHg, high-density lipoprotein cholesterol (HDL) 1.04 mmol/L in men, 1.3 in women, triglycerides (TG) $\geq$ 1.7 mmol/L, fasting plasma glucose $\geq$ 5.6 mmol/L] in the determination of MHO/MUO. Less than half include an assessment of insulin resistance, usually using a surrogate homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) [11], in some small studies hyperinsulinemic-eugenic clamp was used [12–14]. A number of authors believe that hyperinsulinemia, not IR, determines metabolically unhealthy obesity (MUO) [14, 15]. Assessment of the level of other hormones is not included in standard definitions.

However, the current definitions of MHO are not optimal, as recent longitudinal studies have shown that most patients with MHO eventually shift into the metabolically unhealthy category [16–21]. Predictors of MH loss include older age [22] and more “poor” baseline metabolic parameters, including lower HDL level [18, 20], higher TG [20], more “central” obesity [20] and IR [18, 20]. Development of new methods for assessing the number and localization of various types of AT (subcutaneous gluteofemoral or abdominal, visceral, liver, pancreas, epicardial AT, etc.) made it possible to form new components of the MHO — predictors of its preservation. Thus, in a recent prospective study of patients with insulin-sensitive and insulin-resistant obesity (assessment of insulin sensitivity by the method of euglycemic hyperinsulinemic clamp), it was shown that the predictors of the preservation/loss of MH, in addition to normal insulin sensitivity, were the phenotype of obesity identified by the volume of VAT and waist circumference (VC), lean body mass, body mass index, diastolic BP, fasting serum insulin level and fat

in the liver [14]. At the same time, the dynamic assessment after 5 years in the group with initially IR-obesity, the fat content in the android region increased significantly ($p = 0.0087$), as did the volume of VAT ($p_{\text{time}} < 0,001$) [14].

A recent study by Zembic, et al. (2021) showed that only obese patients who did not have AH and CMD [systolic BP = 130 mmHg, without antihypertensive therapy, no diabetes (plasma glucose 110 mg/dL) without antidiabetic therapy] and having peripheral obesity type [WC to thighs volume (TV) ratio < 0.95 for women and 1.03 for men] did not have an increased risk of CV events and mortality, regardless of body weight [23]. Unexpectedly, there was no link between DLP and CV prognosis in this study. Of the interesting features of this work, it is worth noting the evaluation of the WC/TV ratio rather than WC for assessing the obesity phenotype, and the QUICKI index instead of HOMA-IR for the assessment of IR. Although WC allows confirming the central (androidic) nature of obesity by estimating the amount of VAT localized in the abdominal cavity, however, when assessing WC, subcutaneous abdominal fat is also included in the value, which has less adverse effects on metabolism than visceral fat [24]. On the contrary, TV reflects the amount of SAT localized in the lower half of the body, which has at least neutral and possibly protective effects on metabolism [24–26]. Other studies have also shown a higher predictor power of WC/TV compared to WC for assessing the risk of death than WC in obesity [27]. The use of the QUICKI index, which is more strongly associated with metabolic risks than the NOMA index, has also improved the predictor value of the study. This study once again emphasized the high importance of localization of AT in the formation of CV risks. The lack of correlation between DLP and the risk of death (CV and general) in this study may be explained by the fact that among the causes of death in obese patients, heart failure (HF), chronic kidney disease (CKD) and oncology dominate, for which DLP is not a key risk factor.

An important causal factor in the development of various cardiometabolic diseases in obesity is the accumulation of AT in the target organs and periorgan space. AT ectopia in various organs is a significant factor in the formation of obesity phenotypes that are heterogeneous in the consequences. At the same time, each variant of organ ectopia of AT: epicardial, mesenteric (around the intestine), retroperitoneal (including perirenal), gonadal, mental (stomach, spleen), hepatic, pancreatic fat, brings features to the clinical course [28] (Figure 1). Thus, the accumulation of AT in the renal hilum correlates with BP and albuminuria, accumulation in the epicardial region is associated with an increased risk of AH, coronary heart disease (CHD),

atrial fibrillation (AF) and HF, in the gonadal region (in the scrotum) — with impaired testosterone production in men and impaired fertility, the accumulation of fat in the pancreas is inversely correlated with secretory function beta cells, and in the liver is associated with hepatic IR, increased fetuin-A secretion, and the development of non-alcoholic liver disease NAFLD. In addition, liver steatosis also contributes to the disruption of secretory activity of pancreatic endocrinocytes [28] and is another strong determinant of insulin sensitivity in obesity [29]. Concurrently, the accumulation of fat in different sites can vary greatly in different patients. The causal factors of these differences have not been fully established, and their determination is a key task, the solution of which will allow developing a personalized approach to the prevention of a number of metabolic diseases.

The complexity of taking these changes into account when assessing risks in various patients is determined by the high cost of the examination which makes it possible to assess ectopic AT (magnetic resonance imaging, proton spectroscopy, densitometry).

Another type of AT, the assessment of which is little available in routine practice, but the interest in which in scientific research does not weaken, is brown adipose tissue (BAT). Unlike white AT (WAT), BAT generates heat, increasing energy consumption, instead of depositing energy in the form of fat. In humans, it is represented by two types — “true” BAT, which is detected only in infants and is localized in the interscapular region and the “inducible thermogenic” BAT, localized mostly in the supraclavicular region [30]. This AT is also called beige, as it contains both white and brown adipocytes and is characterized by the ability to redifferentiate — “switching” between white and beige adipocytes by activation of uncoupling protein 1 (UCP1). This process (redifferentiation of white adipocytes into brown ones) is called WAT browning. A decrease in both the mass and activity of BAT can play a role in the development of obesity and DM2, and its metabolic activity is inversely proportional to the thickness of the fat layer [31] and positively correlates with insulin sensitivity [32]. An increase in the content of TG in the area of localization of BAT is also a negative metabolic predictor and is associated to a high degree with the development of IR and CMD [33].

IR in obesity is closely related not only to an increase in the amount of VAT, but also to the loss of muscle mass, especially in old age [34], the deficiency of which can be considered as a marker of IR and a predictor of development of MUO [29]. Even with normal

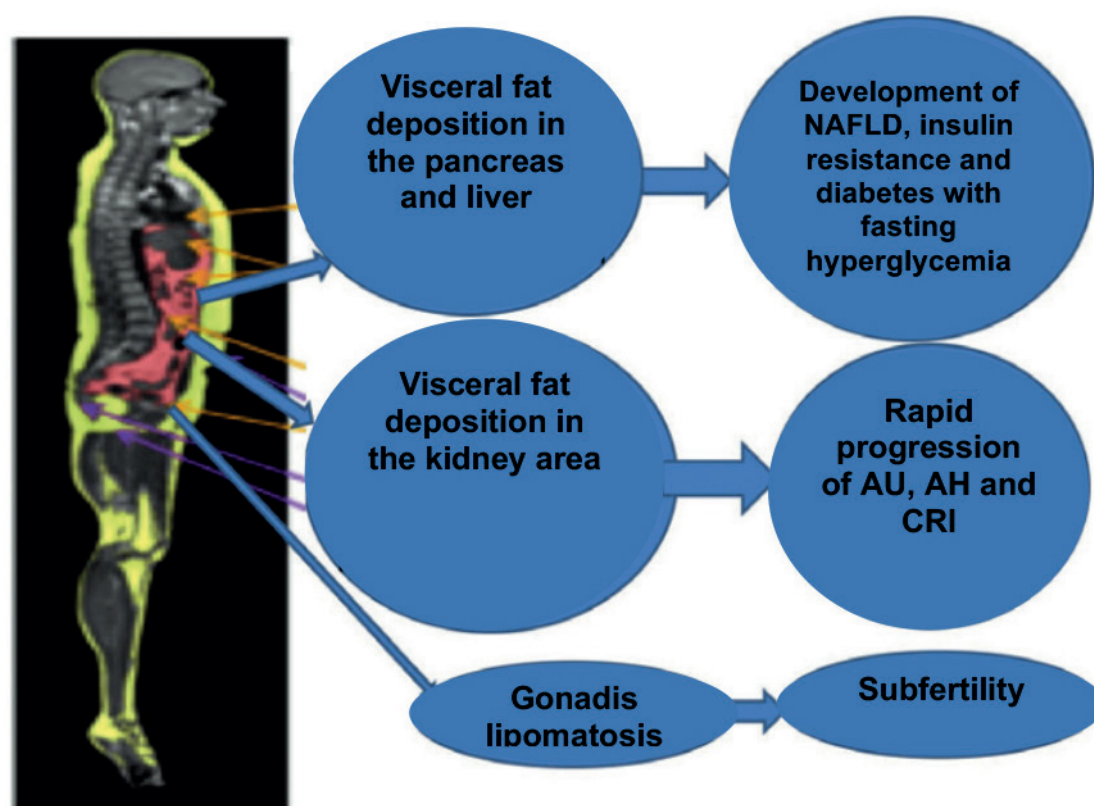


Fig. 1. Examples of the relationship between the localization of the accumulation of ectopic VAT and clinical manifestations

body weight, muscle deficiency leads to the development of IR.

Summing up, the main criteria for determining MHO can be considered an increase in the number of VAT and the ratio of the amount of VAT to lean body weight. The simplest method for estimating the amount of VAT, available in routine practice, is the assessment of WC and the WC/TV ratio. More complex is the targeted determination of the risk of developing individual metabolic disorders and diseases. For the development of CMD, such factors are an increase in the TG content in the liver and pancreas, for cardiovascular diseases (AH, CHD, AF, HF) — thickening of epicardial AT, for development chronic kidney disease — accumulation of AT in the renal hilum. It requires the use of complex, expensive instrumental research methods, therefore, in recent years, research attempts have been made to identify laboratory markers that could become a convenient and affordable alternative to instrumental examination. In addition, the evaluation of biomarkers helps to better understand the mechanisms of the formation of various disorders underlying the transition of MHO to MUO and the basis for the development of individual metabolic disorders.

3. Differences in hormonal and biomarker profiles in different phenotypes of obesity — blood test for predicting metabolic health — myth or reality?

To date, there is no doubt about the presence of endocrine functions in AT, which produces more than 50 hormones (adiposytokines, adipokines) and biologically active substances with various functions [35] (Figure 2). They have effects through paracrine, autocrine and endocrine mechanisms, affecting metabolic processes, inflammation, coagulation, glucose and lipid homeostasis. These include: adiponectin, leptin, free fatty acids (FFA), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL) -6, interleukin (IL) -8, MCP 1, visfatin, fetuin A, insulin-like growth factor (IGF), plasminogen-I activator inhibitor (PAI-1), angiotensinogen, angiotensin-II, prostaglandins, estrogens, resistin and many others. Changes in the level of hormones and biomarkers — AT products in the blood — to a certain extent reflect the functional imbalance of both AT cells and other organs involved in the formation of typical MUO disorders (liver, kidneys, pancreas, neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract).

One of the typical differences noted in visceral obesity (MUO), is the change in the balance of adipocytokines — adiponectin (decrease), leptin (increase) and other secretion products of the fat cell. This is accompanied by modulation of pro-inflammatory and metabolic processes. Physiologically, it is SAT that is designed to

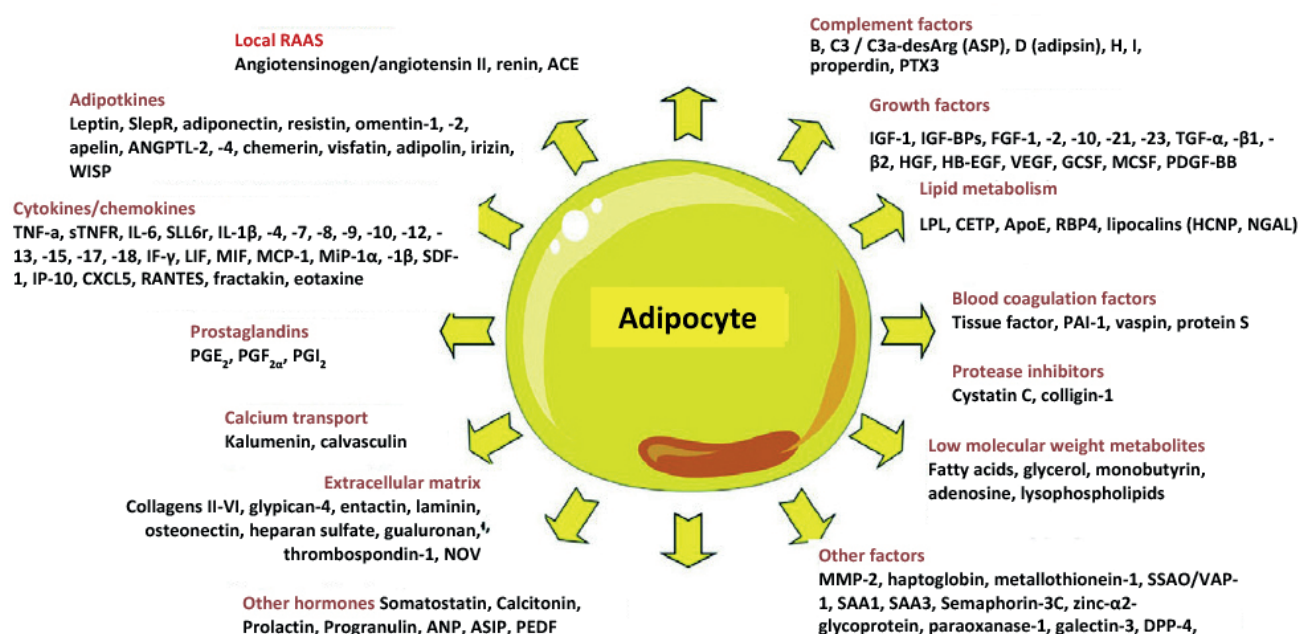
deposit excess calories, and its genetically determined high depositing ability allows you to maintain a good MH for a long time. As noted above, it's the SAT of the gluteofemoral region that has the maximum depositing capacity. It is believed that oxygen supply, which is highly determined by angiogenesis, is of great importance in the features of AT secretoma. The main regulators of adipose tissue deposit include components.

AGE

Adipose tissue is a dynamic system, the effects of which on modulation of systemic metabolism and inflammation change at different age periods [36]. In childhood and in young people, AT has high plasticity, adapting to environmental changes and rapidly changing its endocrine, inflammatory and metabolic functions [37]. With age, the ability to differentiate preadipocytes decreases due to a decrease in the expression and activity of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) and the peroxis-activated gamma proliferator receptor (PPAR γ) [38, 39], mainly in SAT, the rate of lipid metabolism slows down and lipids are redistributed in the VAT depot [40]. With age, under the influence of cellular stress reactions caused by lipotoxicity, hypoxia and/or replication disorders [41, 42], gene expression may change with the formation of cellular phenotypes resembling activated macrophages [43]. Aging also contributes to the infiltration of immune cells into AT and leads to an increase in T-cell populations, mainly in VAT [44]. In addition, the progression of AT dysfunction with age is associated with the accumulation of aging cells [45], which are pro-inflammatory and develop a phenotype characterized by a secretion with the production of cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases and growth factors that induce inflammatory processes in preadipocytes, inhibit differentiation and stimulate infiltration of immune cells. With increasing age, many hormonal and metabolic changes occur in the body. After 40-50 years, there is a gradual decrease in the level of sex hormones (estradiol, testosterone), growth hormone, thyroxine and, conversely, an increase in the level of leptin and cortisol, a sex steroid-binding protein. These changes reach a peak after 60 years. The main, constantly acting factors underlying these changes are a decrease in both the number of many endocrinocytes due to an increase in apoptosis activity with age and their secretory activity, a decrease in the amplitude of the pulsatory secretion of many hormones, a change in the number and sensitivity of receptors. In particular, an increase in age is a significant factor in increasing the risk of glucose intolerance, since with age, the ratio of proliferation/apoptosis of beta cells increasingly shifts towards a predominance of apoptosis [46]. Due to the increase in apoptosis

of beta cells, the proliferation of alpha cells is disrupted — the percentage of endocrinocytes shifts towards glucagon-producing alpha cells with the development of relative insulin deficiency, which facilitates the development of CMD. Cellular aging can also play a central role in the pathogenesis of age-related resistance to insulin and DM2 [41]. Age-related sarcopenia contributes to the increase in IR with age [34]. It is highly likely that there

is a possible link between proinflammatory secretion in age-related dysfunction of AT and skeletal muscles. In addition, with age, the influence of intermittently acting factors grows, such as the development of somatic diseases (chronic renal failure, liver pathology, etc.), nutrition, alcohol, smoking, increasing frequency of obesity, aggravating the changes described above. Thus, age-related changes affect cellularity, insulin response, secre-



Adapted from Gerst F. et al. MOLECULAR METABOLISM 25 (2019) 1-10

Fig. 2. White adipocyte secretory activity profile

ACE — angiotensin-converting enzyme; ANGPTL — angiopoietin-like protein; ANP — atrial natriuretic peptide; Apo — apolipoprotein; ASIP — agouti signal protein; ASP — acylation-stimulating protein; CETP — cholesterol ester transmission protein; DPP — dipeptidyl peptidase; FGF — fibroblast growth factor; GCSF — colony-granulocyte stimulating factor; HBEGF — heparin binding epidermal growth factor; HCNP — hippocampal cholinergic neurostimulating peptide; HGF — hepatocyte growth factor; IF — interferon; IGF — insulin-like growth factor; IGF-BP — IGF-binding protein; IL — interleukin; IP-10 — inducing protein 10; LIF — leukemia inhibitory factor; LPL — lipoprotein lipase; MCP — monocyte chemoattractant protein; MCSF — macrophages colony-stimulating factor ; MIF — macrophage migration inhibitory factor; MIP — macrophages inducing protein; MMP — matrix metalloproteinase;

MW — molecular weight; NGAL — neutrophil gelatinase-associated lipocalin;

NOV — renal adenocarcinoma superexpressed protein; PAI — profibrinolysin activator inhibitor; PDGF — platelet-derived growth factor; PEDF — pigment epithelial-derived factor; PG — prostaglandin; PTX — pentraxin-bound

protein; RANTES — Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted; RAS — renin-angiotensin system; RBP — retinol binding protein; SDF — stromal derived factor; sIL6R — soluble IL-6 receptor;

sLepR — soluble leptin receptor; sTNFR — soluble TNF receptor; SSAO — semicarbazide-sensitive amine oxidase; TGF — transforming growth factor; TNF- α — tumor necrosis factor; VAP — vascular adhesion protein; VEGF — vascular endothelial growth factor; WISP — WNT1-inducible signaling pathway protein

tion and inflammatory status of AT, which leads to its dysfunction. Age determines the shift in fat deposit from the subcutaneous to the visceral depot with the transition of MHO to MUO.

GENDER

The function and predominant localization of AT differ depending on gender, which is determined by differences in the profile of sex hormones. In women, a normal level of estrogen ensures fat deposition in the gluteofemoral region, and a high leptin secretion with a high sensitivity to it. Men accumulate more VAT, which leads to the formation of an android (central) phenotype of obesity, which strongly correlates with an increase in cardiovascular risk. Women of reproductive age accumulate more fat in the subcutaneous depot, but after menopause, estrogen levels decrease and fat deposition shifts to the visceral depot. Thus, the gender effects are determined by differences in the effects of sex hormones, which will be discussed later.

HORMONES

Sex hormones

The effects of sex hormones on the deposit of adipose tissue are largely determined by the genetic sex. Thus, in women, an increased level of androgens is associated with IR, increased fat deposition in the visceral depot, and the development of CMD. At the same time, in men, a high level of testosterone ensures the differentiation of pluripotent progenitor cells into myocytes and a change in body composition towards the predominance of muscle tissue over fatty [48]. In conditions of testosterone deficiency in men, on the contrary, fat deposition in the visceral depot increases and myogenesis decreases. Testosterone normally activates hormone-sensitive lipase (HSL) in adipocytes, activates lipolysis and thus reduces fat mass. The activity of lipoprotein lipase (LPL) limits the rate of fat accumulation, and it is higher in the SAT of the gluteofemoral region as compared to VAT in women, which ensures the gynoid-type accumulation of fat. On the contrary, in men, the activity of LPL is higher in VAT. These gender differences in the distribution of AT are enhanced by the influence of testosterone, which suppresses LPL in the SAT of the gluteofemoral region in men. With obesity, the expression and activity of the aromatase enzyme which provides the conversion of testosterone to estradiol, increases. As a result, the aromatization of testosterone into estradiol increases drastically and its amount decreases. Estradiol inhibits the production of luteinizing hormone (LH) in the pituitary gland, which is accompanied by a decrease in testosterone produc-

tion in the testicles and a further decrease in its level in the blood [49]. Leptin also inhibits testicular function in adults, but promotes testicular development during puberty [50]. With changes in the production of adipocytokines in AT, IR and insulin levels increase. In conditions of hyperleptinemia and hyperinsulinemia, the level of sex steroid-binding globulin and testosterone decreases even more. Under conditions of testosterone deficiency, lipoprotein lipase in AT is activated and the capture of TG by adipocytes increases, which contributes to the progression of obesity [49]. At the same time, a high level of testosterone suppresses the production of leptin [50]. Age makes a significant contribution to the nature of the relationship between leptin and gonadal function in men. Thus, in prepubertal period, the level of leptin in boys increases, and this contributes to the development of testicles. During puberty, the level of leptin decreases under the influence of increasing levels of androgens. Accordingly, in adult men, leptin levels are significantly lower than in women, and the increase in leptin levels due to factors, including obesity, inhibits the function of the testicles, leading to decreased testosterone [47, 50].

Estrogens, as already noted, contribute to the deposit of fat in SAT in women, mainly in the gluteofemoral region and in the chest area. This is due to gender-dependent differences in the expression of receptors for leptin and estrogens. Estrogens directly or through the activation of their receptors on adipocytes [estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β)] facilitate fat deposition and activate functions of AT. The lipolytic effect of estrogens is mainly mediated through ER α , and ER β can act as a repressor [51, 52]. The distribution of estrogen receptors in different AT depots differs in men and women, making a significant contribution to the sexual dimorphism of obesity phenotypes. In women, a higher ER α /ER β ratio in VAT limits fat accumulation in this depot, while a lower ER α /ER β ratio in gluteofemoral SAT ensures its accumulation. In men, the amount of ER α in VAT is significantly lower, and a low ratio of ER α /ER β increases the deposition of fat in the visceral depot [52]. Activation of ER α improves the function of AT by reducing its inflammation and improving insulin sensitivity. Estrogens can regulate (increase) angiogenesis of AT, thereby reducing the severity of hypoxia [53]. Hypoxia is a key inducer of oxidative stress, inflammation and hypertrophy of AT. This allows us to consider the effects of estrogens on angiogenesis as an important mechanism by which estrogens reduce inflammation and fibrosis of AT. Sexual dimorphism also affects the activity and distribution of lipolytic β 1-2 and antilipolytic α 2-adrenergic receptors. Estradiol increases the number of α 2-adreno receptors in SAT, but does not affect them

in VAT [54], differentially increasing sympathetic tone in various AT depots. As a result, the accumulation of lipids in SAT in women and in VAT in men increases [55]. Estrogens can modulate the ability of fat cells to increase volume, strengthening it in the subcutaneous depot and inhibiting it in the visceral. Mammary adipocytes have the highest plasticity. They de-differentiate during pregnancy and remain in a state of de-differentiation during breastfeeding. After stopping feeding, they proliferate and re-differentiate into adipocytes. Estradiol modulates the activity of a number of hormones involved in the regulation of hunger and satiety, increases the effects of anorexigenic substances such as cholecystokinin, apolipoprotein A-IV, leptin, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and reduces the activity of orexigenic hormones, such as melanocortin and ghrelin [55]. Estrogens also protect against weight gain by increasing energy consumption by activating their receptors in the ventral medial nucleus of the hypothalamus [53]. Estrogens increase the metabolic activity of AT and potentiate browning. As a result, the metabolic rate of AT is higher in women due to the greater number of brown AT and higher expression of genes involved in mitochondrial function, including the separating protein (UCP-1) [55].

The female brain is more sensitive to the effects of leptin on regulating food intake and energy consumption, indicating a strong synergy between the obesity hormone leptin and estrogens in the regulation of reproduction and energy homeostasis [53]. There is a two-way relationship between leptin and estrogens. With a decrease in the level of leptin or sensitivity to it, the secretion of kisspeptin is suppressed through it — a decrease in production and a violation of circadian gonadotropin. In addition, leptin stimulates the production of receptors to gonadotropins and gonadotropin-releasing hormone. On the other hand, a high level of estrogens (an increase in their production during the menstrual cycle) stimulates an increase in the level of leptin, which reaches its maximum by the middle of the cycle [50].

Hormones of AT and gastrointestinal tract, involved in depositing energy substances

When discussing the role of hormones such as insulin, adiposytokines, incretins, ghrelin, we should focus on two aspects: changes in the level of these hormones and sensitivity to them. The role of insulin and sensitivity to it in the development of metabolic disorders included in MS is beyond doubt. Although until recently, the indication of IR by various methods has been considered a key method for assessing the risk of metabolic disorders, recent studies have shown that fasting hyperinsulinemia (fasting insulin above 15 pg/ml in normoglycemia) is also a fairly reliable marker [56].

Adipose tissue hormones

Leptin, an AT hormone that has systemic effects mediated by its binding to a specific receptor. The key effect of leptin is appetite control [57]. Under normal physiological conditions, leptin provides the onset of a feeling of satiety, reducing calorie intake, has a glucose-lowering effect, reduces ectopic fat accumulation through central and peripheral mechanisms, which should have a beneficial effect on metabolic health. The magnitude of leptin effects depends on the tissue, gender and conditions of action [58]. Leptin secretion increases under the influence of a number of hormones (estrogens, growth hormone, thyroxine, glucocorticoids and insulin), changes in glucose, when eating, with obesity, and decreases on an empty stomach, under the influence of catecholamines, iron, FFA, testosterone. It exhibits many metabolic effects on various tissues, and its effects in normal sensitivity to it include: a) in the central nervous system — reducing calorie intake, increasing energy consumption, improving cognitive functions and memory; b) in the liver — reducing the accumulation of lipids and glucose; c) in the pancreas — inhibiting the secretion of glucagon and insulin; d) in muscles — increased oxidation fatty acids and glucose metabolism; e) in AT — in BAT it increases utilization of glucose, in WAT it activates lipolysis and inhibits lipogenesis; e) in bones it accelerates metabolism. The glucose-lowering effects of leptin are partially provided by its direct action in peripheral tissues, but the main effector pathway of leptin is through the central nervous system, mainly through modulation of the activity of neurons of the hypothalamus nuclei. This can be explained by a significantly higher expression of leptin receptors in the central nervous system. Many effects of leptin depend on the presence of insulin and/or sensitivity to it. Thus, under conditions of normoinsulinemia, leptin stimulates lipolysis, reducing the deposit of fat in white AT and increasing energy consumption, however, in conditions of insulin deficiency and/or its effects (IR), on the contrary, inhibits lipolysis. In insulin-resistant patients with type 2 diabetes, leptin administration did not improve glucose homeostasis [59], which may be due to both IR and leptin resistance (LR) [60, 61]. Insulin can act on AT by stimulating the synthesis and secretion of leptin [62, 63], while leptin inhibits insulin secretion. Meanwhile, leptin and insulin, with normal sensitivity of AT to them, act synergistically on it, increasing the browning of white adipocytes and thereby contributing to an increase in energy consumption [64]. In addition to AT, leptin and its receptor were identified in the gastric mucosa [65, 66]. Its secretion in the stomach occurs under the influence of cholecystokinin (CCK), pentagastrin and secretin [65, 66], as well as adiposytic leptin participates in the regulation of appe-

tite, acting directly in hypothalamus or together with CCK through the vagus [66].

The development of leptin resistance and IR annuls these effects in obesity, changing the direction vector of leptin effects. The relationship between leptin, AT mass and metabolic effects of leptin are complex and are determined by factors such as leptin level, severity of its receptor effects, deterministic sensitivity of leptin receptors and non — receptor effects. Concurrently, leptin's ability to lower glucose and have antilipogenic effects regardless of leptin regulation of body weight [58]. It is highly probable that the sensitivity to leptin, and not its absolute level, is an indicator of MH. However, no clear criteria for their differentiation have been developed.

Obesity is always characterized by the development of hyperleptinemia, as well as some other pathological conditions. This is confirmed by a laboratory assessment of the level of leptin, which is always higher in obesity than in people with normal weight. However, it is much more difficult to detect the presence of leptin resistance. The term LR can be used to denote a condition in which the level of leptin is chronically high, but its effects are weakened and hyperleptinemia does not cause suppression of hunger and loss of AT mass. The development of LR in obesity is associated with multiple mechanisms: impaired transport through the blood-brain barrier, weakened leptin signaling, endoplasmic reticulum stress, inflammation, autophagy deficiency. It can be assumed that with obesity, the development of LR is a gradual dynamic process, during which, under the influence of excess leptin, the amount of which increases in proportion to the amount of AT, the number of leptin receptors gradually decreases, since the concentration of leptin regulates both their production and their degradation [67, 68]. Accordingly, the method of indicating LR based on the level of this hormone on an empty stomach is inaccurate, since a high level of leptin combines the states of hyperleptinemia and LR. Modern approaches to the detection of LR use an assessment of indices and mathematical models, including, in addition to determining leptin, an assessment of soluble leptin receptors (sLR) in circulation, leptin ratios, sLR and BMI. Meanwhile, the exact method of assessing LR is a matter of future research.

Adiponectin is an adipokine produced almost exclusively in the AT and highly expressed in the cells of WAT in healthy people with normal body weight. In pathological conditions characterized by chronic non-infectious inflammation, including obesity, the level of adiponectin decreases [69]. Morphological and functional changes in WAT that occur during obesity are a highly probable cause. Due to the excessive accumulation of TG, adipocytes in obese people increase

in size. The hormonal activity of adipocytes of WAT depends on their size, and larger adipocytes, typical for people with obesity, produce significantly less adiponectin, but significantly more pro-inflammatory cytokines, such as *TNF- α* [70]. At the same time, adiponectin and proinflammatory cytokines (*TNF- α* and *IL-6*) mutually inhibit each other's secretion [71, 72]. Negative regulation of adiponectin expression is also the result of hypoxia and oxidative stress [73, 74]. Decreased expression and secretion of adiponectin in AT in obesity can be considered as an inducing factor in the development of inflammation accompanying obesity and entails the activation of a variety of pathological processes, including the development of IR [75]. Thus, adiponectin mediates protective effects in metabolic and vascular diseases associated with obesity, mainly through its anti-inflammatory effect. An interesting experimental finding was that chronic overexpression of adiponectin is accompanied by an increase in the mass of SAT and protects against hypercaloric nutrition-induced resistance to insulin [76]. According to our data, with a sharp decrease in the mass of SAT in patients undergoing bariatric surgery, the expression of adiponectin in SAT, on the contrary, decreases, while its level in circulation increases [77].

Gastrointestinal hormones

When studying obese patients, we noted not only an imbalance of adiposytokines (leptin and adiponectin), but also an imbalance of incretins [glucagon-like peptide 1 (GLP1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)] and ghrelin. These hormones are produced by L- and K cells in the intestine in response to stimulation by food. Therefore, normally their level is very low on an empty stomach and increases postprandially. GLP-1 in a glucose-dependent way increases insulin secretion, normalizes glucagon secretion, reduces apoptosis and increases the replication of beta cells. Studying the level of incretins in obesity, we noted an increase in the level of GPP-1 on an empty stomach, which is probably due to resistance to this hormone, since the dynamics of its level in the postprandial status was weakened, and the level of GIP, on the contrary, was significantly reduced both on an empty stomach and postprandially, which indicates its deficiency [77-80].

The role of GIP in the regulation of energy storage in AT and the development of metabolic disorders is not fully defined. GIP has effects on all key tissues that are important for the control of glucose and lipid homeostasis, stimulates the biosynthesis and secretion of insulin and increases the viability of islet cells. In addition, GIP regulates lipid metabolism directly through its receptor (GIPRs) on adipocytes (modulating lipolysis and lipogenesis depending on the level of insulin). The

effect of GIP on adipose tissue is partially regulated by the activation of LPL. Increased insulin secretion after the release of GIP inhibits lipolysis in adipocytes and stimulates adipogenesis while maintaining insulin receptor sensitivity (INSR) [81].

On an empty stomach, GIP stimulates glucagon secretion and lipolysis in SAT. In the post-food status (increased glucose and insulin levels), it inhibits the secretion of glucagon, stimulates insulin secretion and adipogenesis in SAT, and increases the intake of TG in SAT. It is believed that GIP is responsible for depositing excess energy in SAT. Accordingly, a deficiency of GIP can contribute to the redistribution of fat from SAT to visceral. The effects of GIP on LPL are mediated by resistin, which also disrupts insulin signaling and contributes to the development of oxidative stress in human vascular cells. On the other hand, there are studies that have demonstrated that GIP stimulates the expression of pro-inflammatory factors and chemokines, contributing to the deterioration of insulin sensitivity of adipocytes and the formation of AT inflammation. Meanwhile, it cannot be ruled out that these effects were noted in the violation of tissue sensitivity to GIP (GIP-resistance), a phenomenon that is poorly studied at the present time.

The effects of GIP are modulated by the metabolic environment, in particular the level and sensitivity to other hormones involved in the metabolism of AT, glucose and lipid levels in the bloodstream. In healthy people without obesity, the level of GIP is low on an empty stomach, does not change with euglycemia, increases with hypoglycemia, and decreases with hyperglycemia (insulin clamp). In healthy people, GIP increases the secretion of leptin and ghrelin, increases blood flow in AT, reduces blood lipids (LDL and TG) due to their deposition in SAT, and increases HDL in women [82]. That is, normally, the effects of GIP are aimed at preserving MH. In patients with MHO, the level of GIP is low on an empty stomach, but its post-food peak on a high-fat diet is enhanced. As BMI increases, the level of GIP increases [82]. At the same time, with MUO, the level of GIP is also increased on an empty stomach, and its effects are weakened, since the intake of TG into SAT under the influence of GIP is reduced with MUO in comparison with people without obesity. With hyperinsulinemia and IR, the deposit of fat in VAT increases sharply. At the same time, GIP contributes more to the redistribution of TG and fatty acids (FAs) in VAT in men than in women. Despite TG deposition in VAT, high levels of GIP in hyperinsulinemia and hyperglycemia were associated with increased levels of TG in the bloodstream [81]. However, according to other authors, the level of fasting GIP increases only with CMD. Taking into account the revealed differences with MHO

and MUO, the level of GIP may depend on IR, and not on BMI. Thus, factors that modulate the level of GIP can be the sensitivity of tissues to insulin, the level of glycemia, and in the post-nutritional status, also the ratio of various nutrients in food. There is a high probability that MUO develops resistance of SAT to GIP primarily in men, since they had twice the higher level of GIP after meals, which was associated with minor fat deposition in SAT and major fat deposition in VAT. In patients with diabetes, the fasting GIP level is elevated and does not change postprandially, and its effects are impaired: with an increased GIP, insulin secretion does not increase, glucagon secretion is not inhibited, and the intake of TG into SAT is reduced.

In addition to GLP-1 and GIP, a number of other hormones produced by neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract (cholecystokinin, peptide YY (PYY), somatostatin) are involved in food metabolism. Almost all of them are characterized by the presence of an anorexigenic effect, except for the orexigenic hormone ghrelin.

Ghrelin

Ghrelin is a hormone produced mainly by neuroendocrine cells of the gastric fundus (about 65%) [83]. A small number of ghrelin-producing cells were found in the small and large intestine, pituitary gland [84]; α -[85], β -[86], and delta cells [87] of the islets of Langerhans and neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus [88, 89]. Insignificant ghrelin expression was also detected in kidneys, testicles, placenta [90-92] and immunocytes [93]. Ghrelin secretion in the stomach is regulated by nutritional and hormonal factors [94]. It is inhibited by somatostatin, interleukin 1 β (IL-1 β), STH, high fat food, increased vagal activity, while hunger and low-protein nutrition stimulate ghrelin expression and secretion. Accordingly, ghrelin levels are normally highest on an empty stomach and decrease after eating, unlike other hormones involved in regulating the absorption and deposit of nutrients. Reports on the effects of leptin on ghrelin production are contradictory [95, 96], which can be determined by the preservation of sensitivity to the effects of leptin and the influence of other factors. The associated effects of leptin and ghrelin can provide a regulatory feedback system involving the gastrointestinal tract and central nervous system, and act as an interface between the regulatory appetite centers in the hypothalamus and functions of the gastrointestinal tract in the management of metabolism and growth [97].

This hormone plays an important role both in the regulation of eating behavior and in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity. Ghrelin has been identified as an endogenous ligand for somatotro-

pin receptors (GHS). It functions as an orexigenic (appetite-stimulating) signal from the stomach [98]. The main effects of ghrelin include: an acute decrease in insulin sensitivity; regulation, in an antagonistic manner to leptin, of the synthesis and secretion of several neuropeptides in the hypothalamus, namely increase of appetite through stimulation of the production of neuropeptide Y (NPY) and agouti peptide (AgRP); stimulation of the secretion of counter-regulatory hormones (cortisol, glucagon, catecholamines), mainly through central mechanisms, suppression of adiponectin and insulin secretion; decreased hepatic insulin sensitivity by blocking hepatic transmission of insulin signal at the phosphatidylinositol-3-kinase level; stimulation of fat deposition (adipogenesis); increase of activity of lactotrophs and corticotrophs; increase of gastric motility and hydrochloric acid secretion.

Many researchers note that in obesity, ghrelin level is significantly lower on an empty stomach than in people with normal body weight and negatively correlate with BMI, fat, fasting insulin and leptin levels [99]. Our data, like other studies, indicate a more significant increase in leptin and a lower decrease in ghrelin than in men [47]. When trying to normalize weight, ghrelin prevents weight loss, as weight loss is accompanied by an increase in ghrelin levels, which correlates positively with the degree of weight loss [100] and increases hunger. In the post-food status, most patients with obesity do not have an additional decrease in its level, unlike healthy people, which, firstly, may be a sign of the development of ghrelin resistance, and secondly, may contribute to increased food intake [101].

It is logical to assume that since the first hormonal reaction upon food intake to the quantity and qualitative composition of nutrients is the secretion of incretins and ghrelin, then it is their imbalance that is primary. Meanwhile, with the development of insulin resistance (increased NOMA-IR), a decrease in the sensitivity of GIP receptors in tissues develops. Hypothetically, the sequence of changes can be expressed in the form of a diagram shown in Fig. 3.

GENETIC DETERMINANTS

As it was noted at the beginning, genetic determination has a much smaller contribution to the formation of both obesity itself and its metabolic complications than lifestyle. A very beautiful example of this is the data presented in the article by Ligthart S, et al. (2021), which assessed the polygenic risk of developing type 2 diabetes in patients with normal body weight and obesity in 8,243 individuals enrolled in the ARIC study and 7,428 participants included in the Rotherdam Study (RS) [102], based on a polygenic evaluation of

403 common DNA sequences, identified as risk factors for type 2 diabetes [103]. The authors first assessed the polygenic risk and divided the examinees into groups of low, moderate and high risk. The lifetime risk of developing DM2 in people aged 45 years was 22.8% (95% CI 18.4—27.3) in the low genetic risk category; 30.6% (95% CI 27.9—33.4) in the intermediate genetic risk category and 35.5% (95% CI 30.6—40.5) in the high genetic risk category in the RS cohort and 32.6% (95% CI 27.8—37.4) in the low genetic risk category; 41.1% (95% CI 38.9—43.2) in the intermediate genetic risk category and 47.6% (95% CI 44.3—50.8) in the high genetic risk category in the ARIC cohort. Obese participants had more than twice the risk of developing diabetes compared to people with normal weight in the moderate and high risk categories. At the same time, among participants with a high genetic risk, normal weight was associated with a 56% lower risk of diabetes in the ARIC study and 55% lower risk for RS compared to obesity.

In recent studies, molecular genetic studies of adipose tissue itself have attracted attention. Most studies, like our own earlier findings, show a higher expression of the leptin gene and mRNA in SAT compared to VAT in obese people [77]. In people without obesity, leptin expression in both sites is lower than [104] or comparable [105] to that in obesity. A higher expression of the leptin gene in SAT is observed in women, correlating with its level in the circulation, unlike men, which may be explained by the peculiarities of the formation of obesity: men are characterized by earlier and priority accumulation of fat in VAT with a characteristic imbalance of adipokine production [106]. The expression of adiponectin gene and mRNA is reduced during obesity in AT, but, unlike leptin, changes in its expression are more pronounced in VAT [107]. Finally, a recent study that examined the contribution of expression of various adipokines in individual AT sites (VAT and SAT) to their circulation levels showed that only the expression of the leptin gene in SAT has significant influence on its level in circulation, which means it can determine its systemic effects [108].

Meanwhile, genome-wide studies can reveal new ways to implement the mechanisms for the formation of various phenotypes of obesity, changes in the hormonal and biomarker background, the causes of differences in prognosis and response to therapy. The formation of a huge number of genes, for which a link with the risk of developing obesity and changes in various metabolic parameters has been shown, already today makes it possible to form genetic panels that determine the development of MHO or MUO, CMD and DM, AH, DLP with high accuracy. A detailed description of these studies is a topic for a separate article.

The analysis presented in this review showed that maintaining metabolic health requires the maintenance/restoration of normal sensitivity to leptin, GIP, ghrelin, which is inseparable from normalization of the morphology of AT and insulin sensitivity. Maintaining the level of sex hormones at the level of reproductive

age can also significantly restrain the development of changes towards MUO.

An intervention aimed at eliminating causal factors is always optimal. As it was noted at the beginning of this review, the key causal factors of obesity and loss of metabolic health are overeating and inac-

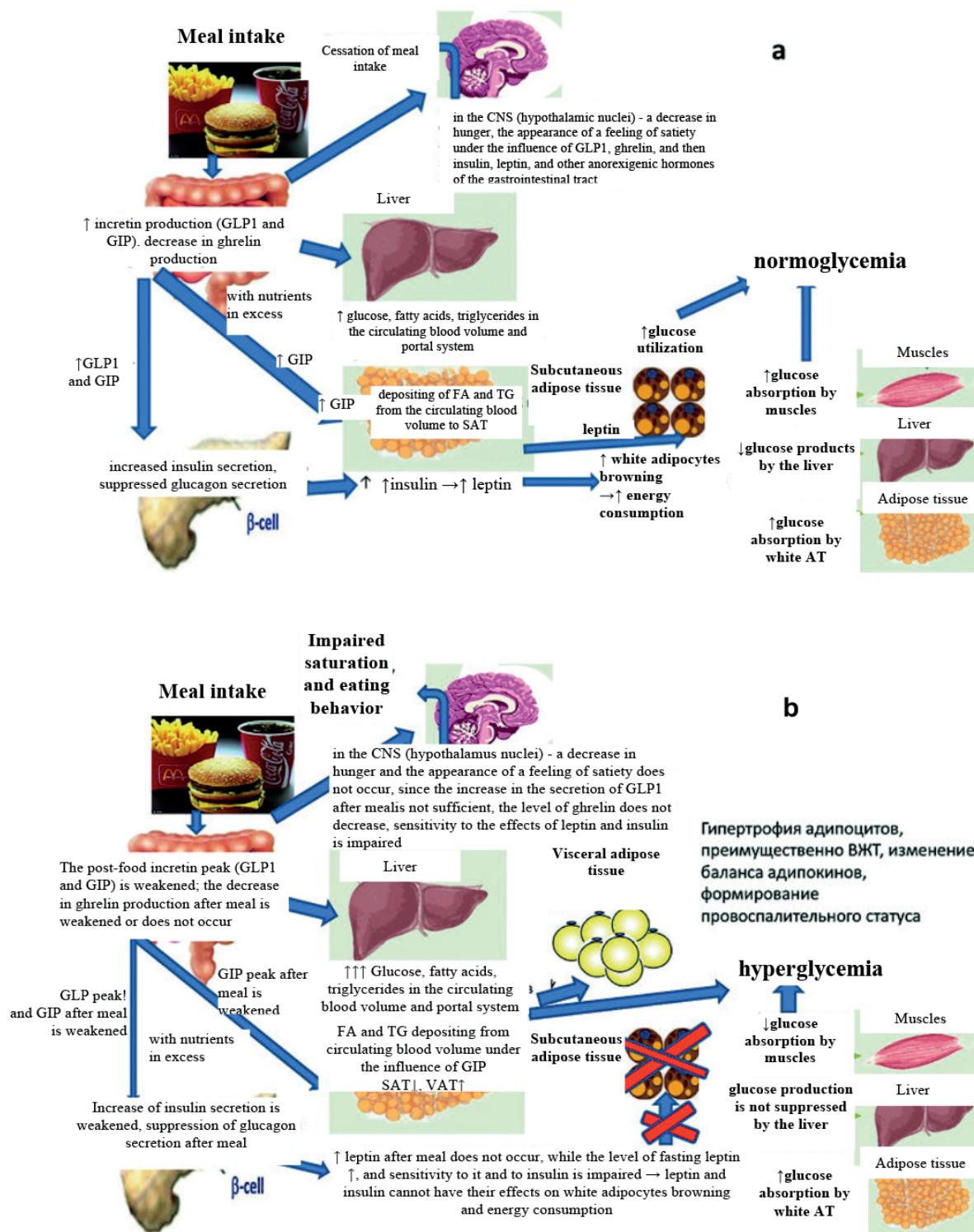


Fig. 3. Regulation of nutrient metabolism in normal (a) and overeating (b)

tivity, which are complemented by sleep disorders, exposure to sociopathogenic environmental factors and stress. However, the differences in impacts can already be personalized based on gender differences: the response to a high-fat diet is radically different in men and women. In men, ketogenic diets cause adverse metabolic changes (an increase in the level of unsaturated FA and inflammatory markers), which are not observed in women [109]. Age also influences the choice of interventions — the choice of therapy in favor of drugs that slow down cellular aging, such as metformin, allows you to modulate the speed of these processes. The involvement of sex hormone replacement therapy can also significantly slow down the rate of age-related changes. The duration of obesity, CMD also determines the response. In patients with a short history of obesity, with a decrease in body weight, normalization of adipocyte volume was noted, while in patients with a long duration, even bariatric interventions did not eliminate hypertrophic changes [2]. Weight loss by 10% or more and a decrease in liver TG in patients with a short history (up to 6 years) of type 2 diabetes made it possible to achieve remission of diabetes [110], while with the duration of the disease (more than 10 years) remission is unlikely even after bariatric interventions.

Future directions of personalization of obesity therapy involve the use of drugs that target the accumulation of fat in VAT and its excessive ectopic accumulation. The use of angiogenesis activity, fibrosis and modulation of receptor activity/hormone levels involved in fat depositing in various fat depots as targets can help in solving these problems. Modulation of sensitivity to GIP seems promising, resistance to which redirects lipids from the subcutaneous to the visceral depot. Activation of browning AT with increased metabolic activity of adipocytes also looks attractive. Already today, the ability to influence its activity is being discussed in a number of drugs (GLP-1 receptor agonists, glyflozins, redxin), which have demonstrated the ability not only to reduce body weight, but also to improve metabolic parameters. Clarification of molecular genetics pathways for the formation of various obesity phenotypes will help in the development of new drugs for individual choice in therapy.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(11):1585–1594. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803326.
2. Morigny P, Bouche J, Arner P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(5):276–295. DOI: 10.1038/s41574-021-00471-8.
3. Chen GC, Arthur R, Iyengar NM, et al. Association between regional body fat and cardiovascular disease risk among postmenopausal women with normal body mass index. *Eur Heart J*. 2019;40(34):2849–2855. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz391.
4. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, et al. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(6):301–313. DOI: 10.3109/10408363.2015.1041582.
5. Tandon P, Wafer R, Minchin JEN. Adipose morphology and metabolic disease. *J Exp Biol*. 2018;221(Pt Suppl 1):jeb164970. DOI: 10.1242/jeb.164970.
6. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia*. 2010;53(12):2496–2503. DOI: 10.1007/s00125-010-1889-3.
7. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noel S, et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011;60(5):1504–1511. DOI: 10.2337/db10-1039.
8. Lonn M, Mehlig K, Bengtsson C, et al. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J*. 2010;24(1):326–331. DOI: 10.1096/fj.09-133058.
9. Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315(2):284–295. DOI: 10.1152/ajpregu.00257.2017.
10. Jung CH, Lee WJ, Song KH. Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *Korean J Intern Med*. 2017;32(4): 611–621. DOI: 10.3904/kjim.2016.259.
11. Rey-López JP, de Rezende LF, Pastor-Valero M, et al. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obes Rev*. 2014;15(10):781–790. DOI: 10.1111/obr.12198
12. Bo S, Musso G, Gambino R, et al. Prognostic implications for insulin-sensitive and insulin-resistant normal-weight and obese individuals from a population-based cohort. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(5):962–969. DOI: 10.3945/ajcn.112.040006.
13. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(3):E506–515. doi: 10.1152/ajpendo.00586.2009.
14. Tang A, Coster ACF, Tonks KT, et al. Longitudinal changes in insulin resistance in normal weight, overweight and obese individuals. *J Clin Med*. 2019;8(5):623. DOI: 10.3390/jcm8050623.
15. Packer M. Differential pathophysiological mechanisms in heart failure with a reduced or

- preserved ejection fraction in diabetes. *JACC Heart Fail.* 2021;9(8):535–549. DOI: 10.1016/j.jchf.2021.05.019.
16. Roos V, Elmståhl S, Ingelsson E, et al. Metabolic syndrome development during aging with special reference to obesity without the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2017;15(1):36–43. DOI: 10.1089/met.2016.0082.
 17. Zheng R, Liu C, Wang C, et al. Natural course of metabolically healthy overweight/obese subjects and the impact of weight change. *Nutrients.* 2016;8(7):430. DOI: 10.3390/nu8070430.
 18. Khan UI, Wang D, Karvonen-Gutierrez CA, et al. Progression from metabolically benign to at-risk obesity in perimenopausal women: a longitudinal analysis of Study of Women Across the Nation (SWAN). *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2516–2525. DOI: 10.1210/jc.2013-3259.
 19. Kabat GC, Wu WY-Y, Bea JW, et al. Metabolic phenotypes of obesity: frequency, correlates and change over time in a cohort of postmenopausal women. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(1):170–177. DOI: 10.1038/ijo.2016.179.
 20. Hwang Y-C, Hayashi T, Fujimoto WY, et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int J Obes.* 2015;39(9):1365–1370. DOI: 10.1038/ijo.2015.75.
 21. Bell JA, Hamer M, Sabia S, et al. The natural course of healthy obesity over 20 years. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(1):101–102. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.09.077.
 22. Appleton SL, Seaborn CJ, Visvanathan R, et al. Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care.* 2013;36(8):2388–2394. DOI: 10.2337/dc12-1971.
 23. Zembic A, Eckel N, Stefan N, et al. An empirically derived definition of metabolically healthy obesity based on risk of cardiovascular and total mortality. *JAMA Netw Open.* 2021;4(5):e218505. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.8505.
 24. Stefan N. Causes, consequences, and treatment of metabolically unhealthy fat distribution. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(7):616–627. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30110-8.
 25. Lotta LA, Wittemans LBL, Zuber V, et al. Association of genetic variants related to gluteofemoral vs abdominal fat distribution with type 2 diabetes, coronary disease, and cardiovascular risk factors. *JAMA.* 2018;320(24):2553–2563. DOI: 10.1001/jama.2018.19329.
 26. Neeland IJ, Poirier P, Despres JP. Cardiovascular and metabolic heterogeneity of obesity: clinical challenges and implications for management. *Circulation.* 2018;137(13):1391–1406. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029617
 27. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med.* 2008;359(20):2105–2120. DOI: 10.1056/NEJMoa0801891
 28. Haring HU. Novel phenotypes of prediabetes? *Diabetologia.* 2016;59(9):1806–1818. DOI: 10.1007/s00125-016-4015-3.
 29. Lee MJ, Kim E-H, Bae SJ, et al. Protective role of skeletal muscle mass against progression from metabolically healthy to unhealthy phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;90(1):102–113. DOI: 10.1111/cen.13874.
 30. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist LO, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 2013;19(5):631–634. DOI: 10.1038/nm.3017.
 31. Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, et al. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)* 2014;38(6):812–817. DOI: 10.1038/ijo.2013.206.
 32. Orava J, Nuutila P, Noponen T, et al. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(11):2279–2287. DOI: 10.1002/oby.20456.
 33. Raiko J, Holstila M, Virtanen KA, et al. Brown adipose tissue triglyceride content is associated with decreased insulin sensitivity independent of age and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(5):516–519. DOI: 10.1111/dom.12433.
 34. Cleasby ME, Jamieson PM, Atherton PJ. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J Endocrinol.* 2016;229(2):R67–R81. DOI: 10.1530/JOE-15-0533.
 35. Gerst F, Wagner R, Oquendo MB, et al. What role do fat cells play in pancreatic tissue? *Mol Metab.* 2019;25:1–10. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.05.001.
 36. Stout MB, Tchkonja T, Kirkland JL. The aging adipose organ: lipid redistribution, inflammation, and cellular senescence. In: *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, edited by Fantuzzi G, Braunschweig C. New York: Humana. 2014;69–80.
 37. Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, et al. Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest.* 2006;116(11): 2945–2954. DOI: 10.1172/JCI28721.
 38. Karagiannides I, Tchkonja T, Dobson DE, et al. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(6):R1772–1780. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.6.R1772.
 39. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plastic Surg.* 2008;60(5):538–544. DOI: 10.1097/SAP.0b013e3181723bbe.
 40. Stout MB, Justice JN, Nicklas BJ, et al. Physiological aging: links among adipose tissue dysfunction, diabetes, and frailty. *Physiology (Bethesda).* 2017;32(1):9–19. DOI: 10.1152/physiol.00012.2016.
 41. Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, et al. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes

compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNF α exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(3):735–748. DOI: 10.1152/ajpendo.90851.2008.

42. Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell.* 2010;9(5):667–684. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x.

43. Zhu Y, Tchkonina T, Stout MB, et al. Inflammation and the depot-specific secretome of human preadipocytes. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(5):989–999. DOI: 10.1002/oby.21053.

44. Lumeng CN, Liu J, Geletka L, et al. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J Immunol.* 2011;187(12):6208–6216. DOI: 10.4049/jimmunol.1102188.

45. Xu M, Palmer AK, Ding H, et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. 2015;4:e12997. DOI: 10.7554/eLife.12997.

46. Lee PG, Halter JB. The pathophysiology of hyperglycemia in older adults: clinical considerations. *Diabetes Care.* 2017;40(4): 444–452. DOI: 10.2337/dc16-1732.

47. Babenko AY, Matveev GA, Alekseenko TI, et al. Interrelations of components of metabolic syndrome with the level of the hormones involved in regulation of adipose tissue metabolism. *Arterial Hypertension.* 2019;25(6):639–652. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-6-639-652.

48. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology.* 2003;144(11):5081–5088. DOI: 10.1210/en.2003-0741.

49. Buvat J, Maggi M, Guay A, et al. Testosterone deficiency in men: systematic review and standard operating procedures for diagnosis and treatment. *J Sex Med.* 2013;10(1):245–284. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2012.02783.x.

50. Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, et al. The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology.* 2021;162(2):bqaa204. DOI: 10.1210/endo/bqaa204.

51. Gavin KM, Cooper EE, Raymer DK, et al. Estradiol effects on subcutaneous adipose tissue lipolysis in premenopausal women are adipose tissue depot specific and treatment dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(11):1167–1174. DOI: 10.1152/ajpendo.00023.2013.

52. Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, et al. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes.* 2006;55(4):978–987. DOI: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339.

53. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, et al. Silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(7):2501–2506. DOI: 10.1073/pnas.0610787104.

54. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(1):E155–E162. DOI: 10.1152/ajpendo.00257.2004.

55. Nookaew I, Svensson P-A, Jacobson P, et al. Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E370–E378. DOI: 10.1210/jc.2012-2764.

56. Kolb H, Kempf K, Röhling M, et al. Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC Medicine.* 2020;18(1):224. DOI: 10.1186/s12916-020-01688-6.

57. Schnurbein J, Manzoor J, Brandt S, et al. Leptin is not essential for obesity-associated hypertension. *Obes Facts.* 2019;12(4):460–475. DOI: 10.1159/000501319.

58. Pereira S, Cline DL, Glavas MM, et al. Tissue-specific effects of leptin on glucose and lipid metabolism. *Endocr Rev.* 2021;42(1):1–28. DOI: 10.1210/endo/bnaa027.

59. Mittendorfer B, Horowitz JF, DePaoli AM, et al. Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001;60(5):1474–1477. DOI: 10.2337/db10-1302.

60. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996;348(9021):159–161. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)03173-x.

61. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest.* 1996;97(5):1344–1347. DOI: 10.1172/JCI118551.

62. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, et al. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* 1997;138(10):4463–4472. DOI: 10.1210/endo.138.10.5451.

63. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature.* 1995;377(6549):527–529. DOI: 10.1038/377527a0.

64. Dodd GT, Descherf S, Loh K, et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell.* 2015;160(1-2):88–104. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.022.

65. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. 2000;47(2):178–183. DOI: 10.1136/gut.47.2.178.

66. Sobhani I, Buyse M, Goiot H, et al. Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology.* 2002;122(2):259–263. DOI: 10.1053/gast.2002.31385.

67. Martin RL, Perez E, He YJ, et al. Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism.* 2000;49(11):1479–1484. DOI: 10.1053/meta.2000.17695.

68. Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, et al. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(2):492–495. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7622.
69. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79–83. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0255.
70. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005;96(9):939–949. DOI: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
71. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(4):1045–1050. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00090-1.
72. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes*. 2003;52(4):942–947. DOI: 10.1507/endocrj.K07-032.
73. Hattori Y, Akimoto K, Gross SS, et al. Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1066–1074. DOI: 10.1007/s00125-005-1766-7.
74. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901–911. DOI: 10.2337/db06-0911.
75. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8(7):731–737. DOI: 10.1038/nm724.
76. Kim J-Y, Van De Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2621–2637. DOI: 10.1172/JCI31021.
77. Vasileva LB, Artemyeva MS, Ma Y, et al. The effect of obesity, impaired carbohydrate metabolism and bariatric surgery on adiponectin and leptin mRNA levels in different adipose tissue depots. *Arterial Hypertension*. 2019;25(5):568–576. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-568-576.
78. Anandhakrishnan A, Korbonits M. Glucagon-like peptide-1 in the pathophysiology and pharmacotherapy of clinical obesity. *World J Diabetes*. 2016;7(20):572–598. DOI: 10.4239/wjd.v7.i20.572.
79. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Takahira N, et al. Elevated circulating levels of an incretin hormone, glucagon-like peptide-1, are associated with metabolic components in high-risk patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:17. DOI: 10.1186/1475-2840-9-17.
80. Cho YM, Fujita Y, Kieffer TJ. Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:535–559. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021113-170315.
81. Møller CL, Vistisen D, Færch K, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is Associated With Lower Low-Density Lipoprotein But Unhealthy Fat Distribution, Independent of Insulin: The ADDITION-PRO Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):485–493. DOI: 10.1210/jc.2015-3133.
82. Gasbjerg LS, Gabe MBN, Hartmann B, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor antagonists as anti-diabetic agents. *Peptides*. 2018;100:173–181. DOI: 10.1016/j.peptides.2017.11.021.
83. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4753–47538. DOI: 10.1210/jcem.86.10.7885.
84. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):881–887. DOI: 10.1210/jcem.86.2.7190.
85. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(1):124–129. DOI: 10.2337/diabetes.51.1.124.
86. Volante M, Allia E, Gugliotta P, et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1300–1308. DOI: 10.1210/jcem.87.3.8279.
87. Wierup N, Svensson H, Mulder H, et al. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):63–69. DOI: 10.1016/s0167-0115(02)00067-8.
88. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656–660. DOI: 10.1038/45230.
89. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J*. 2004;18(3):439–456. DOI: 10.1096/fj.03-0641rev.
90. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*. 2000;486(3):213–216. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)02308-5.
91. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002;143(2):717–725. DOI: 10.1210/endo.143.2.8646.
92. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*. 2001;142(2):788–794. DOI: 10.1210/endo.142.2.7987.
93. Hattori N, Saito T, Yagyu T, et al. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4284–4291. DOI: 10.1210/jcem.86.9.7866.

94. Pinkney J, Williams G. Ghrelin gets hungry. *Lancet*. 2002;359(9315):1360–1361. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08387-3.
95. Lee H-M, Wang G, Englander EW, et al. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 2002;143(1):185–190. DOI: 10.1210/endo.143.1.8602.
96. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, et al. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1220–1225. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4518.
97. Lindqvist A, Erlanson-Albertsson C. Fat Digestion and its Role in Appetite Regulation and Energy Balance -The Importance of Enterostatin and Tetrahydrolipstatin. *Curr Med Chem – Central Nervous System Agents*. 2003;3:157–175. DOI: 10.2174/1568015033477712.
98. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from stomach. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(8):551–560. DOI: 10.1038/35086018.
99. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):707–709. DOI: 10.2337/diabetes.50.4.707.
100. Hansen TK, Dall R, Hosoda H, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56(2):203–206. DOI: 10.1046/j.0300-0664.2001.01456.x.
101. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, et al. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2984–2987. DOI: 10.1210/jcem.87.6.8738.
102. Ligthart S, Hasbani NR, Ahmadizar F, et al. Genetic susceptibility, obesity and lifetime risk of type 2 diabetes: The ARIC study and Rotterdam Study. *Diabet Med*. 2021;38(10):e14639. DOI: 10.1111/dme.14639.
103. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet*. 2018;50(11):1505–1513. DOI: 10.1038/s41588-018-0241-6.
104. Tinahones FJ, Coín-Aragüez L, Mayas MD, et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol*. 2012;12:4. DOI: 10.1186/1472-6793-12-4.
105. Tsiotra PC, Boutati E, Dimitriadis G, et al. High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells. *Biomed Res Int*. 2013;2013:487081. DOI: 10.1155/2013/487081.
106. Pereira-Fernandes A, Dirinck E, Dirtu AC, et al. Expression of obesity markers and Persistent Organic Pollutants levels in adipose tissue of obese patients: reinforcing the obesogen hypothesis? *PLoS One*. 2014;9(1):e84816. DOI: 10.1371/journal.pone.0084816.
107. Cano-Martínez LJ, Marroquín C, Coral-Vázquez RM, et al. Expression of adipokines and their receptors in adipose tissue of women with class 3 obesity with or without hypertension. *Gene*. 2019;702:148–152. DOI: 10.1016/j.gene.2019.03.070.
108. Konigorski S, Janke J, Drogan D, et al. Prediction of circulating adipokine levels based on body fat compartments and adipose tissue gene expression. *Obes Facts*. 2019;12(6):590–605. DOI: 10.1159/000502117.
109. Morselli E, Fuente-Martin E, Finan B, et al. Hypothalamic PGC-1 α protects against high-fat diet exposure by regulating ER α . *Cell Rep*. 2014;9(2):633–645. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.025.
110. Taylor R. Calorie restriction for long-term remission of type 2 diabetes. *Clin Med (Lond)*. 2019;19(1):37–42. DOI: 10.7861/clinmedicine.19-1-37.

Author information:

Babenko Alina Yu., MD, Dr. Sc., Head of the Research Institute of Genetic Risks and Personalized Personal Prevention, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Golikova Tatyana Igorevna, Junior Researcher, Research Laboratory of Prediabetes and Other Metabolic Disorders, Research Institute of Genetic Risks and Personalized Prevention, World-Class Research Centre for Personalized Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 604.6

ТРАНСГЕННЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

Андреева Д. Д.^{1, 2}, Синегубов А. А.¹, Бурзак Н. А.^{1, 2},
Мурашова Л. А.^{1, 2}, Васютина М. Л.^{1, 2}, Дячук В. А.^{1, 2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург,
Россия

²Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Дячук Вячеслав Алексеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: slava_d83@mail.ru

Статья поступила в редакцию
15.09.2021 и принята к печати
25.10.2021.

РЕЗЮМЕ

В обзоре рассмотрены основные направления работы с модельными организмами (*Danio rerio*, *Mus musculus*) в области современной персонализированной медицины, представлены основные подходы к транскгенезу, позволяющие более точно моделировать конкретные патологии человека. Описаны существующие модельные системы для изучения атеросклероза, дислипидемических расстройств, нейродегенеративных заболеваний. Упомянуты трехмерные клеточные технологии, применимые в рамках персонализированного подхода к пациенту.

Ключевые слова: Данио, дислипидемия, модельные организмы, нейродегенеративные заболевания, транскгенез, трехмерные клеточные культуры.

Для цитирования: Андреева Д.Д., Синегубов А.А., Бурзак Н.А. и др. Трансгенные модельные объекты нового поколения и их использование в персонализированной медицине. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):95-117.

ВВЕДЕНИЕ

Трансгенные животные используются в лабораториях в качестве биомodelей в медицинских исследованиях. Более 90 % из них — генетически модифицированные грызуны, преимущественно мыши (*Mus musculus*). Использование генетически модифицированных животных является важным инструментом для исследования заболеваний человека, они используются для понимания функции отдельных генов и геномов в контексте восприимчивости к разным заболеваниям, их причины и прогрессирования, а также для создания альтернативных подходов для лечения патологий. В данном обзоре мы обсудим как уже ставшие классическими методы трансгенеза, так и новые подходы к получению трансгенных животных, которые наиболее часто используются в фундаментальной и прикладной медицине, а также рассмотрим детально некоторые патологии, где модифицированные животные — основной инструмент и ключ к пониманию молекулярных и клеточных аномалий, приводящих к заболеваниям позвоночных животных, включая человека.

ОБЗОР КЛАССИЧЕСКИХ И НОВЫХ ПОДХОДОВ ТРАНСГЕНЕЗА

Применение трансгенных моделей получило широкое распространение в биологии и медицине. Одним из наиболее ранних инструментов генной инженерии, стал метод конвенционального нокаута гена, позволяющий получить линию животных, у которых полностью отсутствует функциональный продукт гена на всех этапах онтогенеза. Благодаря деятельности нескольких консорциумов практически достигнута цель получить нокауты всех известных генов мыши, интенсивно развивается получение трансгенных организмов данного типа для экспериментальных животных других видов [1]. Однако традиционная техника конвенционального нокаута гена имеет целый ряд ограничений. В ходе масштабных программ фенотипирования трансгенных мышей было обнаружено, что нокаут около 30 % генов в гомозиготном состоянии ведет к летальному фенотипу и еще 7 % — к репродуктивным дефектам [2]. Также подобные линии животных не позволяют исследовать роль гена в течение отдельно взятого периода онтогенеза или в пределах определенной морфологической структуры.

Методы создания трансгенных стабильных линий животных многочисленны и разнообразны, зависят от целей и задач исследователей. Они включают в себя нокаут генов для определения,

например, сигнального пути, индукцию сверхэкспрессии белков и экспрессии, которые позволяют изменять клеточные процессы, визуализировать клетки или уничтожать их путем образования токсичных продуктов, осуществляемых с помощью направленного мутагенеза, трансгенов или вирусной трансдукции [3–5].

Большинство подходов к экспрессии трансгена в определенном типе клеток требуют промотора, который управляет транскрипцией гена в данной клетке. Существует несколько способов активации промотора в определенном типе клеток. Если известны промоторные последовательности, специфичные для интересующего типа клеток, их можно использовать для создания конструкции и последующей случайной вставки в геном мыши [6]. Однако часто этот подход требует создания и скрининга многих трансгенных линий, поскольку уровень экспрессии трансгена и эффективность передачи могут варьировать в зависимости от количества копий трансгена в геноме и их интеграционных сайтов [7].

Экспрессия гена в интересующей клетке также может быть достигнута с помощью «нокаута», когда трансген вставлен в геномную кодирующую последовательность специфичного для клетки гена с использованием специфического мутагенеза. Данный подход обеспечивает наиболее точную экспрессию трансгена, поскольку все внутренние регуляторные элементы промотора сохраняются, но приводит к нежелательному гомо- или гетерозиготному нокауту специфичного для клетки гена. Этого можно избежать, если трансген вставлен вместе с IRES-участком (internal ribosome entry site), который обеспечивает внутреннюю инициацию трансляции, и экспрессия обоих генов происходит параллельно [8].

Еще одним способом осуществления прямой экспрессии трансгена являются трансгенные конструкции на основе бактериальных, дрожжевых или других искусственных хромосом (BAC, YAC или PAC). Искусственные хромосомы содержат большие фрагменты геномной ДНК, а конкретный клон будет включать в себя кодирующую последовательность специфичного гена и элементы промотора [9, 10]. Данный подход обладает двумя преимуществами: во-первых, большие геномные фрагменты могут содержать большую часть или все промоторные области, которые управляют экспрессией трансгена в интересующей клетке; и во-вторых, эндогенная кодирующая последовательность специфичного гена не изменяется, если только трансген случайно не интегрируется в кодирующую последовательность гена.

Прямой контроль экспрессии трансгена требует активации промотора в интересующей клетке в определенное время. С помощью индуцируемой экспрессии трансгена можно осуществить такой жесткий пространственный и временной контроль. Широко используемые подходы Tet-On и Tet-Off позволяют активировать экспрессию трансгена в интересующей клетке в определенное время [11, 12]. В системе Tet-Off и Tet-On используется белок-трансактиватор тетрациклина (tTA), способный связываться с ДНК в определенных последовательностях оператора TetO. Активация tTA может подавляться (Tet-On) или активироваться (Tet-Off) тетрациклином и его производными и тем самым предотвращать активацию специфических генов [13].

В качестве принципиально иного подхода к редактированию применяются сайт-специфичные рекомбиназы, позволяющие осуществлять манипуляции непосредственно на уровне генома в экспериментальном организме. Наиболее распространенной системой для генерации неконвенциональных нокаутных животных является Cre-Lox система [14]. Cre-рекомбиназа — фермент, обнаруженный у бактериофага P1 — специфически распознает последовательности, названные LoxP-сайтами. Данный фермент вырезает последовательность, расположенную между двумя LoxP-сайтами и сшивает концы исходной ДНК. Таким образом, у модельного организма ген или его фрагмент заключен между LoxP-сайтами, и процесс его рестрикции управляется экспрессией Cre.

Применение сайт-специфичных рекомбиназ также открывает новые возможности для создания моделей для генетического трейсинга — техники, позволяющей идентифицировать потомков клеток, экспрессирующих ген интереса. Типичная модельная система состоит из двух генетических конструкций. Первая представлена кодирующей последовательностью Cre-рекомбиназы, расположенной под промотором интересующего гена. Вторая конструкция состоит из гена, кодирующего репортер и расположенного перед ним флосированного (расположенного между двумя LoxP-сайтами) стоп-кодона. Таким образом, в клетках, в которых активен промотор гена интереса, происходит рекомбинация и коэкспрессия репортерного гена. Дальнейшим путем модификации системы являлось создание фьюжн-белка — CreERT и его модификаций — рекомбиназ, активируемых агонистами эстрогенового рецептора человека [15]. Подобная система позволяет запускать рекомбинацию в определенный период времени путем введения соответствующего лиганда не затрагивая

клетки, экспрессирующие ген интереса в другие периоды онтогенеза.

Дальнейшим путем модификации данного метода является создание новых химерных белков-индукторов рекомбинации на основе Cre. Один из многообещающих вариантов — фьюжн-белок из Cre и дигидрофолатредуктазы E. Coli [16]. В данном случае в качестве индуктора может применяться малотоксичный препарат триметоприм, для которого нет эндогенного рецептора в организме мыши.

Вместе с развитием генетических конструкторов индукторов рекомбинации также развиваются и репортерные. Существование множества вариантов LoxP-сайтов и различных по спектральным характеристикам и внутриклеточной локализации флуоресцентных белков позволило создать ряд сложных репортерных линий животных, таких как Brainbow, Zebrow, Confetti и другие, в которых рекомбинация приводит к случайной комбинации коэкспрессии нескольких репортеров, что позволяет проводить эксперименты типа клонального анализа [17], исследования коннектома и процессов развития нейронных сетей [18].

В кодирующей последовательности таргетной для рекомбиназы конструкции могут быть размещены не только флуоресцентные белки. Один из эффективных методов исследования роли отдельных типов клеток в развитии организма — генетическая абляция — основан на индукции рекомбиназой экспрессии дифтерийного токсина, вызывающего смерть клеток [19].

Ряд классических методов нейробиологии получил дополнительные возможности благодаря сконструированным белкам-сенсорам. Так, доступны линии мышей, у которых вместо репортерных белков экспрессируются кальций-чувствительные, чувствительные к трансмембранному потенциалу и пероксидам флуоресцентные белки [20]. Таким образом, возможно применение классических методов регистрации нейрональной активности в приложении к определенному типу или популяции клеток, идентифицируемым по экспрессии Cre.

Хорошо охарактеризованным маркером нейрональной активности является экспрессия генов класса IEG (immediate early genes), таких как c-fos, c-jun и Arc. Экспрессирующиеся под промоторами данных генов рекомбиназы позволяют идентифицировать нейрональные ансамбли, участвующие в реализации поведенческих актов у мышей [20].

Cre-Lox-система также является базисной для множества модельных конструкций в оптогенетических исследованиях в нейробиологии. В данном случае рекомбиназа индуцирует экспрессию фотореактивных белков. Первоначально наиболее

распространенными были фотоактивируемые ионные каналы, обнаруженные у ряда бактерий. Все большее распространение получают фьюжн-белки из фотореактивной и ферментативно-активной частей, позволяя индуцировать внутриклеточные биохимические реакции направленным действием света. В сочетании с вышеупомянутыми конструкциями, включающими в себя Cre под промотором IEG, становится возможным реактивировать нейронные сети, участвовавшие ранее в ходе интересующего поведенческого акта [21].

Альтернативным методом является применение Flp-FRT-системы, получившей, однако, меньшее развитие. Среди проблем выделяется термоллабильность фермента Flp и относительно низкая эффективность рекомбинации, что не позволяет его использовать у гомеотермных организмов [22]. В ходе дальнейших модификаций рекомбиназы данные проблемы были частично разрешены, однако эффективность ее все еще уступает Cre-Lox.

Сходный с Cre-Lox принцип используется в трейсинге с применением Dre-rox, которая пока не получила широкого распространения. Сочетание из нескольких систем рекомбинации в одном модельном организме позволяет создавать сложные управляемые модели, визуализировать несколько типов или популяции клеток одновременно, при условии одновременной коэкспрессии нескольких генов [23].

ДАНИО — УНИКАЛЬНЫЕ БИОМОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ

Модели на *Brachydanio rerio* экономически более выгодны, чем модели грызунов, ввиду меньшей стоимости содержания модельного организма. К преимуществам относится простота содержания и возможность получения большого числа эмбрионов за короткий промежуток времени. Жилищно-селекционные системы гораздо проще. Теоретически одна пара рыбок данио может производить тысячи генетически идентичных эмбрионов. Специфика воспроизводства позволяет исследовать редкие генетические события и проводить параллельное тестирование на большой гомогенной выборке [24].

Внешнее оплодотворение делает манипуляции с эмбрионами гораздо более доступными, чем у млекопитающих. Кроме того, прозрачность эмбрионов *Danio Rerio* позволяет исследовать органогенез прижизненно, в частности при использовании специфических линий и витальных красителей, включая флуоресцентную маркировку.

Кроме того, эмбрионы рыбок данио чрезвычайно быстро развиваются: к 24 часам после ферти-

лизации большинство этапов органогенеза завершается, что позволяет визуализировать в реальном времени все стадии развития организма [25, 26].

Важно отметить, что в дополнение к этому быстрому анатомическому развитию нейронные, гормональные и паракринные связи также устанавливаются и обеспечивают гомеостаз уже на ранних стадиях развития [27–29].

Небольшой размер эмбрионов рыбок данио и взрослых особей также может быть преимуществом в лабораторных условиях за счет снижения расхода ценных реагентов при проведении скрининговых исследований. Малый размер также облегчает whole-tissue [30], whole-organ и whole-organism транскриптомный [31, 32], протеомный [33] и другие «омиксные» анализы [34], а также whole-organ клональный анализ [35] и cell-cell картирование [36].

Несмотря на то что общие предки рыб и человека разошлись около 450 млн лет назад, известно, что порядка 82 % генов, ответственных за генетические заболевания, представлены ортологичными генами у рыб данио [37]. Удобство редактирования генома и обилие генов-ортологов у этих животных позволили создать точные биомодели на данио.

Редактирование генома рыб с помощью программируемых нуклеаз позволяет вносить двуцепочечные разрывы в интересующем участке ДНК, что приводит к целевой мутации, приводящей к инактивации гена интереса или изменению его работы.

Исследования на рыбах играют центральную роль в развитии и применении технологий редактирования генома: первоначально редактирование генома рыбок проводили с помощью технологии ZFN (zinc finger nucleases)— специально сконструированных специфичных протеаз, которые можно нацелить на желаемый участок ДНК и с высокой точностью вносить изменения в геном.

Следующий шаг в развитии редактирования генома и получении модельных рыбок — появление технологии TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases): преимущество этого типа эндонуклеаз в том, что они могут быть сконструированы для связывания с любой интересующей последовательностью ДНК и в том, что они могут вызывать широкий спектр мутаций у рыбок при эффективности свыше 98,5 % [38]. Технология CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 — самый современный подход в редактировании генома, она позволяет быстро и точно редактировать геном и является самой распространенной техникой для данио [39]. Перечисленные технологии направлены на инак-

тивацию генов путем внесения инсерции или внесения небольших вставок, что позволяет всего за 2 поколения вывести линии рыбок с гомозиготными мутациями модельных патологий [40]. Таким образом, на рыбах впервые были смоделированы заболевания крови [41], получены биомодели сердечно-сосудистых [42] и нейродегенеративных заболеваний [43].

Отличительная черта использования рыбок в персонализированной медицине — получение гуманизированных моделей болезней. Как правило гуманизированная модель основана на повышении функциональности целевых генов. Самый простой метод — временное повышение экспрессии гена, это позволяет проследить взаимосвязь между эффектом сверхэкспрессии у биомодели и физиологическим эффектом мутации человека [40].

Например, гиперэкспрессия мРНК гена NRAS у эмбрионов данио моделирует процесс, при котором гиперэкспрессия ортологичного гена у человека приводит к развитию синдрома Нунана [44]. Похожие исследования показывают, что гиперэкспрессия гена PTDS1, связанная с развитием синдрома Маевского, связана с аномалиями в развитии скелета у мальков данио [45].

Гуманизированные рыбы активно используются при исследованиях процессов нейродегенерации, например в качестве моделирования токсического воздействия синуклеинов, в частности человеческого α -синуклеина, участвующего в развитии болезни Паркинсона [46]. Накопление α -синуклеинов в нейронах связывали с нейродегенеративными процессами, механизмы которых были неясны.

С помощью системы GAL4/UAS, которая позволяет искусственно активировать гены интереса, было показано, что гиперэкспрессия человеческого α -синуклеина в нейронах приводит к токсическому эффекту и дегенерации нервных клеток. Похожий подход, который заключался в том, чтобы искусственно создать в гене C9orf72 последовательности, отвечающие за синтез глицин-аланиновых повторов, также позволил создать модель бокового амиотрофического склероза на рыбах данио [47].

На рыбах могут быть исследованы доминантные наследственные болезни и влияние различных мутаций на пенетрантность патологического признака. Например, спинальная мозжечковая атаксия 3-го типа вызвана отмиранием нейронов мозжечка и вызвана мутацией гена потенциал-зависимого калиевого канала Kv3.3. Детская и взрослая формы этого заболевания связаны с мутациями и гиперэкспрессией различных аллелей гена, что приводит к формированию различных фенотипов у модельных рыбок. Младенческая, тяжелая форма заболе-

вания ведет к нарушению миграции мотонейронов, в то время как взрослая форма приводит к нарушению ветвления аксонов мотонейронов [48].

ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА И ДИСЛИПИДЕМИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Идеальная модель дислипидемических расстройств и атеросклероза на животных для биомедицинских и фармацевтических исследований должна обладать соответствующим потенциалом для экстраполяции данных на человека. В основном, такие модели базируются на индукции и ускорении формирования атеросклеротической бляшки за счет применения специализированных диет, генетических манипуляций и средовых воздействий.

В первой половине XX века применялись диет-индуцированные модели атеросклероза, преимущественно на кроликах. Было показано, что высоко холестеринная диета (HCD), а также диета с высоким содержанием животного белка приводят к атеросклерозу и гиперхолестеринемии.

С 1950-х по 1970-е годы на крысах и кроликах были разработаны и протестированы различные диеты, способные индуцировать гиперлипидемию. Исследования индуцируемого диетой атеросклероза внесли принципиальный вклад в понимание патогенеза этого состояния.

В 1970-х и 1980-х годах для исследования атеросклероза начали активно применять лабораторных мышей. Исследования в области метаболизма липопротеинов в плазме в 1980-х годах, в сочетании с появлением технологий трансгенеза в 1990-х годах, привели к появлению таких нокаутных линий мышей, как ApoE^{-/-}, Ldlr^{-/-}, PCSK9^{-/-}. Кроме того, в 2002 году был секвенирован геном мышей линии C57BL/6, являющейся сравнительно чувствительной к моделированию метаболических нарушений посредством диеты.

Показано, что модели атеросклероза на мышах в основном не демонстрируют нестабильность атеросклеротической бляшки с последующим тромбозом, которые чаще всего являются факторами, связанным с клинически значимыми острыми сердечно-сосудистыми эпизодами [49]. Этиопатогенез образования нестабильной атеросклеротической бляшки включает в себя наличие факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, которые индуцируют эндотелиальную дисфункцию и повышают проницаемость сосудов, приводя к инфльтрации липидов и усиливая адгезию и трансмиграцию моноцитов. В интимае сосудов моноциты

дифференцируются в макрофаги и поглощают измененные липиды, превращаясь в пенистые клетки. Одновременно на этом этапе гладкомышечные клетки сосудов мигрируют в интиму, где синтезируют внеклеточный матрикс и способствуют образованию фиброзной капсулы. По мере прогрессирования бляшки количество гладкомышечных клеток уменьшается, пенистые клетки подвергаются апоптозу, высвобождая активные металлопротеиназы, которые разрушают капсулу, повышая вероятность разрыва бляшки. Иммунная система принимает активное участие в этом процессе и играет ключевую роль в дестабилизации бляшек [50].

Кроме этого, в отличие от людей, у мышей редко развивается атеросклероз в коронарных артериях, но легко развивается атеросклероз в корне аорты. Таким образом, распределение поражения тканей у мышей и человека не идентично.

На данный момент большой интерес в качестве биологической тест-системы для изучения атеросклероза и дислипидемических расстройств представляют рыбки *Danio Rerio*, что находит отражение в статистическом анализе публикаций, освещающих соответствующие модели [24, 51]. *Danio Rerio* анатомически схожи с более высокоорганизованными позвоночными. Патологические процессы в тканях могут быть изучены и экстраполированы для широкого спектра сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний у человека [52].

Генетические модификации рыбок *Danio* также берут начало в 1980-х годах. В 2000-х годах количество опубликованных исследований с использованием рыбок *Danio* стало увеличиваться, была получена первая генетически модифицированная модель гиперлипидемии *ApoC2^{-/-}*, а вскоре и модель гиперхолестеринемии *LDLR^{-/-}*.

Направленная делеция гена *ApoC2* является одним из векторов дальнейшей разработки моделей дислипидемий на рыбках *Danio*. Люди, лишенные *ApoC2*, имеют семейную хиломикронемию, характеризующуюся повышенным уровнем триглицеридов и рецидивирующими эпизодами панкреатина. Мутантные *Danio Rerio* демонстрируют отличительные признаки дефицита *ApoC2* человека: снижение активности липазы в плазме и тяжелую гипертриглицеридемию. Визуализация сосудистой сети у *ApoC2^{-/-}* мутантных рыб выявляет накопление липидов и нагруженных липидами макрофагов, что является признаком формирования атеросклеротических бляшек. Эта модель дислипидемии может оказаться особенно полезной при изучении стадий экстравазации, окисления и поглощения ЛПНП макрофагами стенок сосудов [53].

Зебрафиш, мутантные по *LDLR*, являются биологической моделью для изучения гиперхолестеринемии и накопления липидов в кровеносных сосудах, что эквивалентно раннему этапу развития атеросклероза человека. Для этой модели характерно развитие умеренной гиперхолестеринемии при нормальном питании. Однако кратковременное 5-дневное кормление личинок дефицитных по *LDLR* рыбок диетой с высоким содержанием холестерина (HCD) приводит к обострению гиперхолестеринемии и накоплению и отложению липидов в сосудах [54].

Несмотря на принципиальные различия в физиологии обмена веществ у пойкилотермных и гомойотермных видов, именно *Danio Rerio* позволяют воспроизвести некоторые из тех патологических процессов, которые не могут быть изучены с применением моделирования на грызунах, в связи с чем и приобретают популярность как ценная модель для изучения липидного обмена и связанных с ним нарушений [55].

Известно, что ортологи ключевых факторов, регулирующих метаболизм липидов, такие как микросомальный белок переноса триглицеридов (МТТР), ацил-КоА-синтетаза (ACS) и аполипопротеин C2 (APOC2) экспрессируются у рыбок данио также, как у млекопитающих [56, 57]. В то же время, в отличие от грызунов, рыбки данио обладают белком переноса сложного эфира холестерина (CETP), так как ортолог CETP сохранен в их геноме. Таким образом, как и у людей, сложные эфиры холестерина у рыбок данио отклоняются от «хороших» ЛПВП к «плохим» ЛПНП, тем самым повышая восприимчивость к атерогенным событиям [58].

Кроме того, *Danio Rerio* являются подходящей моделью для изучения аутовоспалительных расстройств, которые, как известно, являются значимым фактором риска при развитии атеросклеротических изменений и сердечно-сосудистых осложнений, который может сыграть свою роль даже при низком уровне ЛПНП в крови [59].

Хроническое воспаление, через активацию NLRP3 inflammasome-IL-1 β сигнального пути, является важным фактором развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (ASCVD), будучи запущенным путем накопления внутриклеточного холестерина в клетках [60].

Пириновый домен семейства NLR, содержащийся в 3 (NLRP3) inflammasome, является одним из наиболее полно охарактеризованных у людей и других млекопитающих. Была произведена молекулярная и функциональная идентификация гомолога NLRP3 (*DrNLRP3*) на модели *Danio Rerio*.

За счет нокаута *DrNLRP3* у личинок зебрафиш и генерации нокаута *DrASC^{-/-}* удалось охарактеризовать функцию *DrNLRP3* inflammasome в антибактериальном иммунитете *in vivo*.

Таким образом, интерес в сфере изучения атеросклероза и дислипидемических расстройств в качестве модельных организмов представляют как лабораторные мыши, так и рыбки данио. Развитие сферы биомоделирования патологических процессов с использованием экспериментальных модельных систем и применением технологий редактирования генома позволяет расширять спектр доступных генетических и сочетанных моделей атеросклероза и дислипидемических расстройств.

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Процесс развития нервной системы (нейрогенез) — это сложный многоступенчатый процесс формирования (специализации) нервных клеток, формирующих отделы нервной системы (центральный и периферический отделы) [61]. Безусловно, понимание молекулярных и клеточных механизмов развития нервной системы необходимо для расшифровки функционирования работы мозга и его пластичности у человека. К наиболее используемым методам изучения нейрогенеза относятся методы генетического трейсинга, позволяющие проследить за судьбами эмбриональных клеток и методы тканеспецифического нокаута (нокина), выявляющие роль одного или ансамбля генов в нейроразвитии или специализации отдельных нейронов или глии. Отслеживание иерархии клеток в развитии — это процесс, направленный на выявление потомства, которое происходит от одной клетки-предшественника (стволой клетки или предшественника, бластных клеток). Трейсинг может быть реализован разными стратегиями, основанными на генетически модифицированных организмах, с использованием генетических маркеров, трансфицированных вирусных векторов или конструкций ДНК и с помощью секвенирования клеток [62].

Трейсинг клеток-предшественников до состояния их конечной специализации и определения их судьбы во взрослом организме стал возможным благодаря разработке некоторых важных генетических инструментов, которые сделали возможным постоянное маркирование клеток. В частности, рекомбинационные системы Cre-loxP [63] и Flp-FRT

[64] являются наиболее используемыми системами в изучении клеточного трейсинга. Трансгенные линии мышей, которые восприимчивы к индукционной рекомбинации Cre под контролем специфических промоторов, могут вызывать экспрессию флуоресцентного репортера (флуоресцентного белка) для определения судьбы нейронных предшественников *in vivo* [65]. Это было достигнуто путем введения низких доз тамоксифена, и, в зависимости от интересующей линии, были созданы трансгенные мыши, кодирующие различные флуоресцентные белки под контролем специфических промоторов, проявляющие особые преимущества и недостатки [66].

Немного усложненная версия моноцветного (один трейсер) генетического трейсинга является методом многоцветного маркирования клеток (технологии Brainbow) [67]. Трансгенные мыши Brainbow подвергаются стохастической рекомбинации до четырех флуорофоров, которые управляются системой Cre-loxP, в результате чего образуются многоцветные мозаики, в которых можно легко идентифицировать отдельные клетки. Модифицированные версии этой методологии все еще разрабатываются, и они дают яркие изображения, которые позволяют чрезвычайно подробно визуализировать морфологию отдельных меченых клеток. Это очень эффективный метод для картирования клеток, но не для отслеживания происхождения. Однако эта технология оказала огромное влияние на область отслеживания происхождения, что привело к новой волне методов, в которых стохастическая комбинация флуорофоров используется для создания уникальных штрих-кодов нейрональных стволовых клеток, которые могут быть унаследованы всеми их потомками. Этот метод первоначально был разработан для мышей, хотя комбинаторное использование флуоресцентных белков было переделано для картирования судьбы у *Drosophila melanogaster* (Flybow, d-Brainbow, Raeppli) и рыбок-зебр (Zebrabow) [16].

Одним из самых современных подходов в эффективной трансформации клеток, эмбрионов или тканей стал метод транзгенеза с помощью рекомбинантных лентивирусов, кодирующих различные флуоресцентные белки, которые создаются, чтобы внести свой вклад в многоцветную мозаику для отслеживания происхождения [68]. Эти рекомбинантные конструкции ДНК могут быть трансфицированы в интересующие клетки и позволяют проследить всех потомков отдельных клеток (StarTrack, iON, CLONE) [69–71]. Новые достижения в области микроскопии привели к прогрессу в отслеживании многоцветных линий [72], расши-

ря возможности отслеживания линий в любом организме и позволяя изучать гетерогенность клеток.

Генетические технологии приобрели значение не только для изучения механизмов нейрогенеза, но и для исследований причин развития нейродегенеративных заболеваний. В отличие от безуспешных поисков новых и эффективных методов лечения, понимание патогенетических механизмов, лежащих в основе основных нейродегенеративных состояний, значительно продвинулось вперед. Механизмы, управляющие патологической агрегацией ключевых белков, природа и процессы повреждения нейронов, связанные с образованием белковых агрегатов, — это современные направления изучения данных нейропатологий.

Ввиду значительного сходства в фенотипе генетических и спорадических форм нейродегенеративных заболеваний (например, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, лобно-височная деменция или боковой амиотрофический склероз), генетически модифицированные модели животных, несущие человеческие гены, которые, как оказалось, мутировали в семейных случаях нейродегенераций, были созданы для изучения механизма возникновения и прогрессирования таких патологий.

На сегодняшний день составлена база данных, которая предоставляет информацию об отдельных моделях нейродегенеративных заболеваний у грызунов, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофический склероз. Обобщая, визуализируя и постоянно обновляя доступные данные о характеристиках модельных систем, реализуется цель данной базы — помочь исследователям изучать, сравнивать и определять модели, которые могут ускорить их исследования (<https://www.alzforum.org/research-models>).

В настоящее время предпринимаются большие усилия по характеристике моделей болезни Альцгеймера на животных, чтобы лучше понять патофизиологию заболевания, а также определить модели, подходящие для исследования потенциальных терапевтических средств. На данном этапе описано 210 моделей животных, которые используются в данном направлении исследования и посвящены в основном изучению амилоидных бляшек (21 модель), Нейрофибриллярных клубков (10), потери тел нейронов (15), глиоза (27), потери синапсов (16 моделей), долговременной потенциации и длительной депрессии (16 моделей) и когнитивным нарушениям (5xFAD (B6SJL), 3xTg, A7 APP transgenic, Abca7*^{A1527G}/APOE4/Trem2*^{R47H}, APOE2 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE3 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE4 Knock-In (JAX), APP751SL/PS1 KI). Прогресс в исследованиях и разработке методов

лечения болезни Паркинсона зависит от надежных доклинических моделей, включая модели грызунов. На сегодняшний день описано 20 моделей грызунов, изучающих проблемы потери нейронов, дофаминовый голод, включения α -синуклеина, нейровоспаления, неисправности митохондрий, моторные и не моторные нарушения (α -synuclein KO Mouse, Pink1 KO Rat, Thyl- α Syn “Line 61” Mouse, Parkin KO, DJ-1 KO Rat). В случае бокового амиотрофического склероза насчитывается порядка сорока моделей на грызунах, воспроизводящих различные аспекты болезни, такие как двигательные нарушения или дегенерация двигательных нейронов. Однако ни одна модель не воссоздает все аспекты заболевания человека в совершенстве.

Действительно, базовые клинические исследования убедительно доказывают и подтверждают своими данными, что экспериментальные модели животных чрезвычайно полезны для анализа патогенетических механизмов и подбора инструментов для нейрофармакологии, цель которой повлиять на начальные механизмы развития заболевания.

ОРГАНОИДНЫЕ МОДЕЛИ

Последние годы, в связи с развитием молекулярных методов в исследованиях, моделирование заболеваний человека на лабораторных животных нередко создает дополнительные вопросы по поводу патогенетических механизмов. Даже белки, кодируемые ортологами, не обязательно будут нести совершенно идентичные функции в организмах различных биологических видов. Применение гуманизированных животных также не всегда может дать ответ на все вопросы, модификация далеко не всегда будет затрагивать весь организм.

Для решения задач, связанных с изучением токсичности веществ и реактивности отдельных клеток, двухмерные клеточные культуры применяются уже достаточно давно. Классические двухмерные культуры клеток тем не менее имеют ряд ограничений, которые не позволяют этой технике применяться в качестве универсальной модели для персонализированной медицины. В монослое культуры может заметно меняться транскриптомный профиль клеток, что влечет за собой возможные изменения их свойств и чувствительности к воздействиям. Кроме того, отсутствие молекулярных сигналов от клеток других популяций также влияет на свойства клеток в культуре. Частично эта проблема решена путем кокультивирования разных видов клеток в одной культуре (макрофаги и фибробласты, эндотелий и клетки опухоли, мезенхимальные стволовые клетки и меланоциты и т. д.) [73–75].

Органоидные модели — трехмерные клеточные системы культивирования, которые в большей степени, чем двухмерные, позволяют моделировать как нормальные физиологические процессы, так и патологические состояния. Их возможно создавать из эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, а также клеток взрослых организмов, в том числе опухолевых. Они представляют собой относительно недорогие системы, способные к самообновлению и позволяют моделировать самые разные процессы путем воздействия на них различными биологически активными молекулами, физическими факторами, микроорганизмами. При этом сам органоид будет «отвечать» на воздействие сигнальными клеточными каскадами, характерными для того органа/ткани, который он моделирует. Так, органоиды головного мозга генерируют альфа-ритмы, характерные для мозга новорожденных [76].

Органоиды, полученные из новообразований пациентов, демонстрируют те же молекулярные характеристики, что и «материнская» опухоль, что позволяет *in vitro* наблюдать генетические изменения в их клетках, определять чувствительность к разным типам химиотерапевтических препаратов и предполагать с большой долей вероятности возможность метастазирования конкретного новообразования [77, 78].

В органоидных системах относительно просто можно осуществлять редактирование генома, что может быть полезным как при изучении патогенеза отдельных заболеваний, так и для тестирования определенных терапевтических подходов [79, 80].

Интересным направлением является также трансплантация органоидов. Возможна трансплантация как опухолевых, так и нормальных тканей [81]. Также проводятся эксперименты по трансплантации человеческих органоидов лабораторным животным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование трансгенных животных и культур тканей позволяет значительно более детально подходить к лечению пациентов, выбирать наиболее подходящие стратегии. Также есть возможность изучения *in vivo* молекулярных и клеточных основ заболевания и терапевтических подходов с оценкой потенциальных факторов риска. Использование трехмерных культур клеток пациента дает возможность наиболее точно определить молекулярные особенности протекания заболевания у конкретного человека и подобрать индивидуальную программу лечения наиболее точно.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol.* 2009;Chapter 19:Unit-19.12.17. DOI: 10.1002/0471143030.cb1912s441.
2. Ayadi A, Birling M-C, Bottomley J, et al. Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):600–610. DOI: 10.1007/s00335-012-9418-y.
3. Misra RP, Duncan SA. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine.* 2002;3(19):229–238.
4. Picciotto MR, Wickman K. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiological Reviews.* 1998;4(78):1131–1163.
5. Pease S, Saunders TL. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis: An ISTT Manual.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
6. Brenner M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology.* 1994;3(4):245–257.
7. Martin DI, Whitelaw E. The vagaries of variegating transgenes. *BioEssays.* 1996;18(11):919–923. DOI: 10.1002/bies.950181111.
8. Gilbert WV. Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *J Biol Chem.* 2010;285(38):29033–29038.
9. Heintz N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2001;2(12):861–870.
10. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(12):5547–5551.
11. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10933–10938.
12. Schönig K, Bujard H, Gossen M. The power of reversibility regulating gene activities via tetracycline-controlled transcription. *Methods in Enzymology.* 2010;477:429–453.
13. Kim H, Kim M, Im SK, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147–159. DOI: 10.5625/lar.2018.34.4.147
14. Hirrlinger J, Requardt RP, Winkler U, et al. Split-CreERT2: Temporal Control of DNA

Recombination Mediated by Split-Cre Protein Fragment Complementation. *PLoS One*. 2009;4(12): e8354. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008354.

15. Sando R 3rd, Baumgaertel K, Pieraut S, et al. Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat Methods*. 2013;10(11):1085-1088. DOI: 10.1038/nmeth.2640.

16. Pan YA, Freundlich T, Weissman TA, et al. Zebrow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development*. 2013;140(13):2835-2846. DOI: 10.1242/dev.094631

17. Weissman TA, Pan YA. Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics*. 2015;199(2):293-306. DOI: 10.1534/genetics.114.172510

18. Kastriiti ME, Kameneva P, Kamenev D, et al. Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:6. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00006.

19. Bayguinov PO, Ma Y, Gao Y, et al. Imaging Voltage in Genetically Defined Neuronal Subpopulations with a Cre Recombinase-Targeted Hybrid Voltage Sensor. *J Neurosci*. 2017;37(38):9305-9319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1363-17.2017.

20. DeNardo L, Luo L. Genetic strategies to access activated neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;45:121-129. DOI: 10.1016/j.conb.2017.05.014.

21. Castello-Waldow TP, Weston G, Ulivi Af, et al. Hippocampal neurons with stable excitatory connectivity become part of neuronal representations. *PLoS Biol*. 2020;18(11):e3000928. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000928.

22. Phan QV, Contzen J, Seemann P, et al. Site-specific chromosomal gene insertion: Flp recombinase versus Cas9 nuclease. *Sci Rep*. 2017;7(1):17771. DOI: 10.1038/s41598-017-17651-0.

23. Karimova M, Baker O, Camgoz A, et al. A single reporter mouse line for Vika, Flp, Dre, and Cre-recombination. *Sci Rep*. 2018;8(1):14453. DOI: 10.1038/s41598-018-32802-7.

24. Gut P, Reischauer S, Stainier Dyr, et al. Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiol Rev*. 2017;97:889-938. DOI: 10.1152/physrev.00038.2016

25. Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, et al. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nature Genetics*. 2002;31(1):106-110.

26. Thisse C, Zon LI. Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*. 2002;295(5554):457-462.

27. Jurczyk A, Roy N, Bajwa R, et al. Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;170(2):334-345.

28. Ober EA, Field HA, Stainier DY. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*. 2003;120(1):5-18.

29. Schlegel A, Stainier DY. Lessons from "Lower" Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism. *PLoS Genetics*. 2007;3(11):e199.

30. Cao J, Navis A, Cox BD, et al. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin-1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration. *Development*. 2016;143(2):232-243.

31. Unker JP, Noël ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo. *Cell*. 2014;159:662-675.

32. Lee R, Thiery JP, Carney TJ. Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest. *Current biology*. 2013;23(9):R336-337.

33. Nolte H, Höpfer S, Housley MP, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed SILAC approach. *Proteomics*. 2015;15(4):739-751.

34. Fraher D, Hodge JM, Collier FM, et al. Citalopram and sertraline exposure compromises embryonic bone development. *Molecular Psychiatry*. 2016;21(5):656-664.

35. Gupta V, Poss KD. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature*. 2012;484(7395):479-484.

36. Song Z, Zhang X, Jia S, et al. Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2016;43:107-20.

37. Howe DG, Bradford YM, Conlin T, et al. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic acids research*. 2013;41(D1):D854-860.

38. Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, et al. Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome. *PLoS Genet* 2012;8(8):e1002861. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002861.

39. Cornet C, Di Donato V, Terriente J. Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol*. 2018;9:703. DOI: 10.3389/fphar.2018.00703.

40. Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1007:179-197. DOI: 10.1007/978-3-319-60733-7_10.

41. Fish RJ, Di Sanza C, Neerman-Arbez M. Targeted mutation of zebrafish fga models human congenital afibrinogenemia. *Blood*. 2014;123:2278-2281.

42. Wilkinson RN, Jopling C, van Eeden FJ. Zebrafish as a model of cardiac disease. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;124:65-91.

43. Schmid B, Haass C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*. 2013;127(4):461-470.

44. Runtuwene V, van Eekelen M, Overvoorde J, et al. Noonan syndrome gain-of-function mutations in NRAS cause zebrafish gastrulation defects. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(3):393-399.

45. Seda M, Peskett E, Demetriou C, et al. Analysis of transgenic zebrafish expressing the Lenz-Majewski

syndrome gene PTDSS1 in skeletal cell lineages. *F1000Research*. 2019;8:273.

46. O'Donnell KC, Lulla A, Stahl MC, et al. Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of alpha-synuclein toxicity. *Disease models & mechanisms*. 2014;7:571-582.

47. Ohki Y, Wenninger-Weinzierl A, Hruscha A, et al. Glycine-alanine dipeptide repeat protein contributes to toxicity in a zebrafish model of C9orf72 associated neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 2017;12:6.

48. Issa FA, Mazzochi C, Mock AF, et al. Spinocerebellar ataxia type 13 mutant potassium channel alters neuronal excitability and causes locomotor deficits in zebrafish. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(18):6831-6841.

49. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1104-1115. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.NIH

50. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32. DOI: 10.1111/joim.12296.

51. Vedder VL, Aherrahrou Z, Erdmann J. Dare to Compare. Development of Atherosclerotic Lesions in Human, Mouse, and Zebrafish. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:109. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00109.

52. Chao L, Gates KP, Fang L, et al. Apoc2 loss-of-function zebrafish mutant as a genetic model of hyperlipidemia. *Dis Models Mech*. 2015;8(8):989-998. DOI: 10.1242/dmm.019836.

53. Chao Liu, Young Sook Kim, Jungsu Kim, et al. Modeling hypercholesterolemia and vascular lipid accumulation in LDL receptor mutant zebrafish. *J Lipid Res*. 2018;59(2):391-399. DOI: 10.1194/jlr.D081521.

54. Jun Ka, Suk-Won Jin. J, Zebrafish as an Emerging Model for Dyslipidemia and Associated Diseases. *J Lipid Atheroscler*. 2021;10(1):42-56. DOI: 10.12997/jla.2021.10.1.42.

55. Jun Ka, Boryeong Pak, Orjin Han, et al. Comparison of transcriptomic changes between zebrafish and mice upon high fat diet reveals evolutionary convergence in lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;530(4):638-643. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.042.

56. Schlegel A. Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:159. DOI: 10.3389/fendo.2016.00159.

57. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;318:2-9.

58. Ridker PM, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-1131.

59. Baragetti A, Catapano AL, Magni P. Multifactorial Activation of NLRP3 Inflammasome: Relevance for a Precision Approach to Atherosclerotic Cardiovascular

Risk and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4459. DOI: 10.3390/ijms21124459.

60. Li JY, Wang YY, Shao T, et al. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1 β maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis. *J Biol Chem*. 2020;295(4):1120-1141. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011751.

61. Milichko V, Dyachuk V. Novel glial cell functions: extensive potency, stem cell-like properties, and participation in regeneration and transdifferentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00809.

62. Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, et al. Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science*. 2014;345(6192):82-87.

63. Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987;7:2087-2096.

64. Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome. *Cell*. 1989;59:499-509.

65. Dhaliwal J, Lagace DC. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci*. 2011;33:1025-1036.

66. Lacar B, Young SZ, Platel J-C, et al. Imaging and recording subventricular zone progenitor cells in live tissue of postnatal mice. *Front Neurosci* 2010;4:1-16.

67. Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 2007;450:56-62.

68. Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, et al (2011) RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med*. 2011;17(4):504-509. DOI: 10.1038/nm.2338.

69. García-Marqués J, López-Mascaraque L. Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cereb Cortex*. 2013;23:1463-1472. DOI: 10.1093/CERCOR/BHS134.

70. Kumamoto T, Maurinot F, Barry-Martin R, et al. Direct readout of neural stem cell transgenesis with an integration-coupled gene expression switch. *Neuron*. 2020;107(4):617-630.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.05.038.

71. Loulier K, Barry R, Mahou P, et al. Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron*. 2014;81:505-520. DOI: 10.1016/J.NEURON.2013.12.016.

72. Abdeladim L, Matho KS, Clavreul S, et al. Multicolor multiscale brain imaging with chromatic multiphoton serial microscopy. *Nat Commun*. 2019;10:1-14. DOI: 10.1038/S41467-019-09552-9.

73. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima, et al. Controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells on detachable substrates. *Lab Chip*. 2009;9(3):427-432. DOI: 10.1039/b812510d.

74. Kim H, Yi N, Do B, et al. Adipose-derived stem cell coculturing stimulates integrin-mediated extracellular matrix adhesion of melanocytes by upregulating growth factors. *Biomolecules & Therapeutics*. 2019;27:185-192. doi: 10.4062/biomolther.2018.203.

75. Zeng Q, Chen W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin-oxidized alginate hydrogel. *Biomaterials*. 2010;31(22):5772-5781. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.022.

76. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell*. 2019;25(4):558-569.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2019.08.002.

77. Signati L, Allevi R, Piccotti F, et al. Ultrastructural analysis of breast cancer patient-derived organoids. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):423. DOI: 10.1186/s12935-021-02135-z.

78. Xu H, Lyu X, Yi M, et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):116. DOI: 10.1186/s13045-018-0662-9.

79. Gopal S, Rodrigues AL, Dordick JS. Exploiting CRISPR Cas9 in Three-Dimensional Stem Cell Cultures to Model Disease. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:692. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00692.

80. Teriyapirom I, Batista-Rocha AS, Koo BK. Genetic engineering in organoids. *J Mol Med*. 2021;99:555–568. DOI: 10.1007/s00109-020-02029-z.

81. Lupo F, Piro G, Torroni L, et al. Organoid-Transplant Model Systems to Study the Effects of Obesity on the Pancreatic Carcinogenesis in vivo. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:308. DOI: 10.3389/fcell.2020.00308.

Информация об авторах:

Андреева Дарья Дмитриевна, лаборант НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Синегубов Артем Александрович, внештатный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Бурзак Никита Александрович, младший научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мурашова Лада Александровна, младший научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васютина Марина Львовна, Научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дячук Вячеслав Алексеевич, к.б.н, ведущий научный сотрудник, заведующий НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

NEW GENERATION TRANSGENIC MODELS IN MODERN PERSONALIZED MEDICINE

**Andreeva D. D.^{1, 2}, Sinegubov A. A.¹, Burzak N. A.^{1, 2},
Murashova L. A.^{1, 2}, Vasyutina M. L.^{1, 2}, Dyachuk V. A.^{1, 2}**

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Dyachuk Vyacheslav A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: slava_d83@mail.ru

Received 15 September 2021; accepted
25 October 2021.

ABSTRACT

The review considers the main trends of investigation in model organisms (Danio Rerio, *Mus musculus*) in modern personalized medicine, presents the main approaches to transgenesis, allowing more accurate modeling of specific human pathologies. Existing model systems for studying atherosclerosis, dyslipidemic disorders, neurodegenerative diseases are described. Three-dimensional cellular technologies applicable within a personalized approach to a patient are mentioned.

Key words: animal models, Danio rerio, dyslipidemia, neurodegeneration, three-dimensional cell culture, transgenesis.

For citation: Andreeva DD, Sinegubov AA, Burzak NA, et al. New generation transgenic models in modern personalized medicine. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2021;1(1): 95-117.

INTRODUCTION

Transgenic animals are used in laboratories as bio-models in medical research. More than 90% of them are genetically modified rodents, mainly mice (*Mus musculus*). The use of genetically modified animals is an important tool for the study of human diseases; they are used to understand the function of individual genes and genomes in the context of susceptibility to various diseases, their causes and progression, as well as to create alternative approaches for the treatment of pathologies. In this review, we will discuss both the methods of transgenesis that have already become classical, and new approaches to obtaining transgenic animals that are most often used in fundamental and applied medicine, as well as consider in detail some pathologies where modified animals are the main tool and key to understanding molecular and cellular anomalies that lead to diseases of vertebrates, including humans.

REVIEW OF CLASSICAL AND NEW APPROACHES TO TRANSGENESIS

The use of transgenic models has become widespread in biology and medicine. One of the earliest tools of genetic engineering was the method of conventional gene knockout, which allows obtaining a line of animals that completely lack the functional product of the gene at all stages of ontogenesis. Thanks to the activities of several consortia, the goal of obtaining knockouts of all known mouse genes has been practically achieved; the production of transgenic organisms of this type for experimental animals of other species is intensively developing [1]. However, the traditional conventional gene knockout technique has a number of limitations. In the course of large-scale phenotyping programs of transgenic mice, it was found that knocking out about 30% of genes in the homozygous state leads to a lethal phenotype and another 7% to reproductive defects [2]. Also, such animal lines do not allow studying the role of the gene during a single period of ontogenesis or within a certain morphological structure.

Methods of creating transgenic stable animal lines are numerous and diverse, depending on the goals and objectives of researchers. These include gene knockout to determine, for example, the signaling pathway, the induction of protein overexpression and expression that allow to alter cellular processes, visualize cells or destroy them by the formation of toxic products carried out with the help of directed mutagenesis, transgenes or viral transduction [3–5].

Most approaches to transgene expression in a particular cell type require a promoter that controls the transcription of the gene in the cell. There are several

ways to activate the promoter in a specific cell type. If promoter sequences specific to the cell type of interest are known, they can be used to create a construction and then randomly insert it into the mouse genome [6]. However, this approach often requires the creation and screening of many transgenic lines, as the level of transgene expression and transmission efficiency may vary depending on the number of copies of the transgene in the genome and their integration sites [7].

Gene expression in the cell of interest can also be achieved by a “knockout” when a transgene is inserted into a genomic coding sequence of a cell-specific gene with using a specific mutagenesis. This approach provides the most accurate expression of the transgene, since all the internal regulatory elements of the promoter are preserved, but it leads to an undesirable homo- or heterozygous knockout of a cell-specific gene. This can be avoided if the transgene is inserted together with the IRES element (internal ribosome entry site), which provides internal translation initiation, and both genes are expressed in parallel [8].

Another method for direct expression of a transgene is transgenic constructions based on bacterial, yeast or other artificial chromosomes (BAC, YAC or PAC). Artificial chromosomes contain large fragments of genomic DNA, and a particular clone will include a coding sequence of a specific gene and promoter elements [9, 10]. This approach has two advantages: firstly, large genomic fragments can contain most or all of the promoter regions that control the expression of transgene in the cell of interest; and secondly, the endogenous coding sequence of a specific gene does not change unless the transgene is accidentally integrated into the coding sequence of the gene.

Direct control of transgene expression requires activating the promoter in the cell of interest at a certain time. With the help of induced transgene expression, such strict spatial and temporal control can be carried out. The widely used Tet-On and Tet-Off approaches allow activating transgene expression in the cell of interest at a certain time [11, 12]. The Tet-Off and Tet-On systems use tetracycline transactivator protein (TTA) capable of binding to DNA in certain sequences of the TetO operator. tTA activation can be suppressed (Tet-On) or activated (Tet-Off) by tetracycline and its derivatives and thereby prevent activation of specific genes [13].

As a fundamentally different approach to editing, site-specific recombinases are used, allowing manipulations directly at the genome level in the experimental organism. The most common system for generating non-conventional knockout animals is the Cre-Lox system [14]. Cre recombinase, an enzyme found in bacteriophage P1, specifically recognizes sequences called loxP sites. This enzyme cuts out the sequence located

between two LoxP sites and stitches the ends of the original DNA. Thus, in a model organism, a gene or its fragment is enclosed between LoxP sites, and the process of its restriction is controlled by Cre expression.

The use of site-specific recombinases also opens up new opportunities for creating models for genetic tracing, a technique that allows identifying descendants of cells expressing the gene of interest. A typical model system consists of two genetic structures. The first one is represented by the coding sequence of Cre-recombinase located under the promoter of the gene of interest. The second structure consists of a gene encoding a reporter and a floxed (located between two loxP sites) stop codon located in front of it. Thus, in cells in which the promoter of the gene of interest is active, recombination and co-expression of the reporter gene occurs. A further way to modify the system was to create a fusion protein — CreERT and its modifications — recombinases, activated by human estrogen receptor agonists [15]. Such a system allows you to start recombination in a certain period of time by introducing the corresponding ligand without affecting the cells expressing the gene of interest in other periods of ontogenesis.

A further way to modify this method is to create new chimeric recombination inducer proteins based on Cre. One of the promising options is a fusion protein from Cre and dihydrofolatereductase E. Coli [16]. In this case, low-toxic drug trimethoprim can be used as an inducer, for which there is no endogenous receptor in the mouse body. Along with the development of genetic constructs of recombination inducers, reporter ones are also developing. The existence of many variants of LoxP sites and fluorescent proteins with different spectral characteristics and intracellular localization made it possible to create a number of complex animal reporter lines, such as Brainbow, ZebraBow, Confetti and others, in which recombination leads to a random combination of coexpression of several reporters, which allows experiments such as clonal analysis [17], connectoma studies and neural network development processes [18].

Not only fluorescent proteins can be placed in the coding sequence of the recombinase target structure. One of the effective methods of studying the role of individual cell types in the development of the organism — genetic ablation — is based on the induction by recombinase of the expression of diphtheria toxin that causes cell death [19].

A number of classical methods of neurobiology have received additional opportunities thanks to the constructed sensor proteins. For example, there are mice lines where calcium-sensitive fluorescent proteins that are sensitive to transmembrane potential and peroxides are expressed instead of reporter proteins [20]. Thus, it is possible to apply classical methods of recording neu-

ronal activity in application to a specific type or population of cells identified by Cre expression.

A well-characterized marker of neuronal activity is the expression of IEG (immediate early genes) genes, such as c-fos, c-jun and Arc. The recombinases expressed under the promoters of these genes make it possible to identify neuronal ensembles involved in the implementation of behavioral acts in mice [20].

The Cre-Lox system is also the basis for many model constructions in optogenetic studies in neurobiology. In this case, recombinase induces the expression of photoreactive proteins. Initially, the most common were photoactivated ion channels found in a number of bacteria. Fusion proteins from photoreactive and enzymatic-active parts are becoming increasingly widespread, which allows inducing intracellular biochemical reactions by the directed action of light. In combination with the above-mentioned constructions, including Cre under the IEG promoter, it becomes possible to reactivate neural networks that previously participated in the course of the behavioral act of interest [21].

An alternative method is the use of the Flp-FRT system, which, however, has received less development. Among the problems, the thermolability of the Flp enzyme and the relatively low efficiency of recombination are highlighted, which makes it impossible to use it in homoiothermic organisms [22]. In the course of further modifications of the recombinase, these problems were partially resolved, but its effectiveness is still inferior to Cre-Lox.

A similar principle to Cre-Lox is used in tracing with the application of Dre-rox, which has not yet become widespread. The combination of several recombination systems in one model organism makes it possible to create complex controlled models, visualize several types or populations of cells simultaneously, provided that several genes are co-expressed simultaneously [23].

DANIO — UNIQUE BIOMODELS FOR STUDYING PATHOLOGIES

Brachydanio rerio models are more cost-effective than rodent models due to the lower cost of maintaining the model organism. The advantages include simplicity of maintenance and the possibility of obtaining a large number of embryos in a short period of time. Housing and selecting systems are much simpler. Theoretically, one pair of danio fish can produce thousands of genetically identical embryos. The specificity of reproduction makes it possible to investigate rare genetic events and conduct parallel testing on a large homogeneous sample [24].

External fertilization makes embryo manipulation much more accessible than in mammals. In addition, the

transparency of *Danio Rerio* embryos makes it possible to study organogenesis *in vivo*, in particular when using specific lines and vital dyes, including fluorescent marking.

In addition, the embryos of danio fish develop extremely quickly: by 24 hours after fertilization, most stages of organogenesis are completed, which makes it possible to visualize in real time all stages of the development of the organism [25, 26].

It is important to note that in addition to this rapid anatomical development, neural, hormonal and paracrine connections are also established and provide homeostasis already at the early stages of development [27-29].

The small size of the embryos of danio fish and adult individuals can also be an advantage in laboratory conditions by reducing the consumption of valuable reagents during screening studies. The small size also facilitates whole-tissue [30], whole-organ and whole-organism transcriptomic [31, 32], proteomic [33] and other “omix” analyses [34], as well as whole-organ clonal analysis [35] and cell-cell mapping [36].

Despite the fact that the common ancestors of fish and humans diverged about 450 million years ago, it is known that about 82% of the genes responsible for genetic diseases are represented by orthologous genes in danio fish [37]. The ease of editing the genome and the abundance of orthologous genes in these animals made it possible to create accurate biomodels on danio.

Editing the fish genome using programmable nucleases lets make double-stranded breaks in the DNA region of interest, which leads to a target mutation resulting in the inactivation of the gene of interest or changing its operation.

Fish studies play a central role in the development and application of genome editing technologies: initially, the editing of the fish genome was carried out using ZFN (zinc finger nucleases) technology — specially designed specific proteases that can be targeted at the desired DNA region and make changes to the genome with high accuracy.

The next step in the development of genome editing and obtaining model fish is the emergence of TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) technology: the advantage of this type of endonucleases is that they can be designed to bind to any DNA sequence of interest and that they can cause a wide range of mutations in fish with an efficiency of over 98.5% [38]. CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 technology is the most modern approach in genome editing, it allows quick and accurate genome editing and is the most common technique for danio [39]. These technologies are aimed at inactivating genes by inserting or making small inserts, which makes it possible to develop lines of fish with homozygous mu-

tations of model pathologies in just 2 generations [40]. Thus, blood diseases were modeled on fish for the first time [41], biomodels of cardiovascular [42] and neurodegenerative diseases were obtained [43].

A distinctive feature of using fish in personalized medicine is obtaining humanized models of diseases. As a rule, the humanized model is based on increasing the functionality of the target genes. The simplest method is a temporary increase in gene expression, which allows us to trace the relationship between the overexpression effect in a biomodel and the physiological effect of a human mutation [40].

For example, overexpression of NRAS mRNA in danio embryos simulates the process in which overexpression of an orthologous gene in humans leads to the development of Noonan syndrome [44]. Similar studies show that the overexpression of the PTDSS1 gene associated with the development of Mayevsky syndrome is associated with skeletal abnormalities in danio hatchlings [45].

Humanized fish are actively used in studies of neurodegeneration processes, for example, as a simulation of the toxic effects of synucleins, in particular human α -synuclein involved in the development of Parkinson's disease [46]. The accumulation of α -synucleins in neurons was associated with neurodegenerative processes, the mechanisms of which were unclear. With the help of the GAL4/UAS system, which allows activating the genes of interest artificially, it has been shown that overexpression of human α -synuclein in neurons leads to a toxic effect and degeneration of nerve cells. A similar approach, which consisted in artificial creation of sequences in the C9orf72 gene responsible for the synthesis of glycine-alanine repeats, also made it possible to create a model of amyotrophic lateral sclerosis in danio fish [47]. Dominant hereditary diseases and the effect of various mutations on the penetrance of the pathological sign can be studied on fish. For example, spinal cerebellar ataxia type 3 is caused by the death of neurons in the cerebellum and is caused by a mutation of the potential-dependent potassium channel Kv3.3 gene. The childhood and adult forms of this disease are associated with mutations and hyperexpression of various alleles of the gene, which leads to the formation of different phenotypes in model fish. The infantile, severe form of the disease leads to migration disorder of motor neurons, while the adult form leads to axonal branching disorder of motor neurons [48].

TRANSGENIC ANIMALS FOR THE STUDY OF ATHEROSCLEROSIS AND DYSLIPIDEMIC DISORDERS

An ideal model of dyslipidemic disorders and atherosclerosis in animals for biomedical and pharmaceu-

tical research should have the appropriate potential for extrapolating data to humans. Basically, such models are based on the induction and acceleration of the formation of an atherosclerotic plaque through the use of specialized diets, genetic manipulations and environmental influences.

In the first half of the twentieth century, diet-induced models of atherosclerosis were used, mainly on rabbits. It has been shown that a high cholesterol diet (HCD), as well as a diet high in animal protein, lead to atherosclerosis and hypercholesterolemia.

From the 1950s to the 1970s, various diets capable of inducing hyperlipidemia were developed and tested on rats and rabbits. Studies of diet-induced atherosclerosis have made a fundamental contribution to understanding the pathogenesis of this condition.

In the 1970s and 1980s, laboratory mice began to be actively used for the study of atherosclerosis. Studies on plasma lipoprotein metabolism in the 1980s, combined with the advent of transgenesis technologies in the 1990s, led to the emergence of mouse knockout lines such as ApoE^{-/-}, Ldlr^{-/-}, PCSK9^{-/-}. In addition, in 2002, the genome of mice of the C57BL/6 line, which is relatively sensitive to modeling of metabolic disorders through diet, was sequenced.

It has been shown that models of atherosclerosis in mice generally do not demonstrate instability of atherosclerotic plaque with subsequent thrombosis, which are most often factors associated with clinically significant acute cardiovascular episodes [49]. The etiopathogenesis of the formation of unstable atherosclerotic plaque includes the presence of risk factors for the development of cardiovascular diseases, which induce endothelial dysfunction and increase vascular permeability, leading to infiltration of lipids and enhancing the adhesion and trans-migration of monocytes. In the intima of the vessels, monocytes differentiate into macrophages and absorb altered lipids, turning into foam cells. Simultaneously, at this stage, vascular smooth muscle cells migrate to the intima, where they synthesize extracellular matrix and contribute to the formation of a fibrous capsule. As the plaque progresses, the number of smooth muscle cells decreases, foam cells undergo apoptosis, releasing active metalloproteinases that destroy the capsule, increasing the likelihood of plaque rupture. The immune system takes an active part in this process and plays a key role in the destabilization of plaques [50].

In addition, unlike humans, mice rarely develop atherosclerosis in the coronary arteries, but atherosclerosis in the aortic root easily develops. Thus, the distribution of tissue lesions in mice and humans is not identical.

At the moment, *Danio Rerio* fish are of great interest as a biological test system for the study of atherosclerosis and dyslipidemic disorders, which is reflected in the

statistical analysis of publications covering the corresponding models [24, 51]. *Danio Rerio* is anatomically similar to more highly organized vertebrates. Pathological processes in tissues can be studied and extrapolated for a wide range of cardiovascular and metabolic diseases in humans [52].

Genetic modifications of *Danio* fish also originate in the 1980s. In the 2000s, the number of published studies using *Danio* fish began to increase, the first genetically modified model of hyperlipidemia Apoc2^{-/-} was obtained, and soon the LDLR^{-/-} hypercholesterolemia model too.

Directed deletion of the Apoc2 gene is one of the vectors for further development of dyslipidemia models in *Danio* fish. People deprived of Apoc2 have familial chylomicronemia, characterized by elevated triglyceride levels and recurrent episodes of pancreatitis. Mutant *Danio Rerio* show distinctive signs of human Apoc2 deficiency: decreased plasma lipase activity and severe hypertriglyceridemia. Visualization of the vascular network in Apoc2^{-/-} mutant fish reveals the accumulation of lipids and lipid-loaded macrophages, which is a sign of the formation of atherosclerotic plaques. This model of dyslipidemia may be particularly useful when studying the stages of extravasation, oxidation and absorption of LDL by macrophages of vascular walls [53]. Zebrafish mutated by LDLR are a biological model for studying hypercholesterolemia and lipid accumulation in blood vessels, which is equivalent to the early stage of human atherosclerosis. This model is characterized by the development of moderate hypercholesterolemia with normal nutrition. However, a short-term 5-day feeding of LDLR-deficient fish larvae with a high cholesterol diet (HCD) leads to exacerbation of hypercholesterolemia and the accumulation and deposition of lipids in vessels [54].

Despite the fundamental differences in the physiology of metabolism in poikilothermic and homoiothermic species, it is *Danio Rerio* that makes it possible to reproduce some of those pathological processes that cannot be studied using rodent modeling, which is why they are gaining popularity as a valuable model for studying lipid metabolism and related disorders [55].

It is known that orthologs of key factors regulating lipid metabolism, such as microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), acyl CoA synthetase (ACS) and apolipoprotein C2 (APOC2), are known to be expressed in *danio* fish just as in mammals [56, 57]. At the same time, unlike rodents, *danio* fish have a cholesterol ester transfer protein (CETP), since the CETP ortholog is preserved in their genome. Thus, as in humans, cholesterol esters in *danio* fish deviate from “good” HDL to “bad” LDL, thereby increasing susceptibility to atherogenic events [58].

In addition, Danio Rerio is a suitable model for the study of autoinflammatory disorders, which are known to be a significant risk factor for the development of atherosclerotic changes and cardiovascular complications, which can play a role even with low levels of LDL in the blood [59].

Chronic inflammation, through the activation of the NLRP3 inflammasome-IL-1 β signaling pathway, is an important factor in the development of atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD), being triggered by the accumulation of intracellular cholesterol in cells [60].

The pyrin domain of the NLR family contained in the 3 (NLRP3) inflammasome is one of the most fully characterized in humans and other mammals. Molecular and functional identification of the NLRP3 homologue (*Dr* NLRP3) was performed on the Danio Rerio model. Due to the *Dr* NLRP3 knockdown in zebrafish larvae and the generation of the *Dr* ASC^{-/-} knockout, it was possible to characterize the function of *Dr* NLRP3 inflammasome in antibacterial immunity *in vivo*.

Thus, both laboratory mice and danio fish are of interest in the study of atherosclerosis and dyslipidemic disorders as model organisms. The development of the field of biomodeling of pathological processes using experimental model systems and the use of genome editing technologies makes it possible to expand the range of available genetic and combined models of atherosclerosis and dyslipidemic disorders.

MODERN GENETIC TECHNOLOGIES FOR THE STUDY OF NEUROGENESIS AND NEURODEGENERATIVE DISEASES

The development process of the nervous system (neurogenesis) is a complex multi-stage process of formation (specialization) of nerve cells that form compartments of the nervous system (central and peripheral compartments) [61]. Of course, understanding the molecular and cellular mechanisms of development of the nervous system is necessary to decipher the functioning of the brain and its plasticity in humans. The most widely used methods of studying neurogenesis include genetic tracing methods that allow us to trace the fate of embryonic cells and tissue-specific knockout (nokin) methods that reveal the role of a single gene or an ensemble of genes in the neurodevelopment or specialization of individual neurons or glia. Tracking the hierarchy of cells in development is a process aimed at identifying offspring that originate from a single progenitor cell (stem cell or progenitor, blast cells). Tracing can be implemented by various strategies based on genetically modified organisms, using genetic markers, transfected viral vectors or DNA structures, and with the help of cell sequencing [62].

Tracing progenitor cells to the state of their ultimate specialization and determining their fate in an adult body became possible thanks to the development of some important genetic tools that have made it possible to permanently label cells. In particular, recombination systems Cre-loxP [63] and Flp-FRT

[64] are the most used systems in the study of cellular tracing. Transgenic lines of mice that are susceptible to inducible Cre recombination under the control of specific promoters can cause expression of a fluorescent reporter (fluorescent protein) for determining the fate of neural predecessors *in vivo* [65]. This was achieved by administering low doses of tamoxifen, and, depending on the line of interest, transgenic mice encoding various fluorescent proteins under the control of specific promoters were created, showing special advantages and disadvantages [66].

A slightly more complicated version of monocolour (one tracer) genetic tracing is a method of multicolour cell marking (Brainbow technology) [67]. Brainbow transgenic mice undergo stochastic recombination of up to four fluorophores, which are controlled by the Cre-loxP system, resulting in multicoloured mosaics where individual cells can be easily identified. Modified versions of this methodology are still being developed, and they provide vivid images that allow extremely detailed visualization of the morphology of individual marked cells. This is a very effective method for mapping cells, but not for tracing the origin. However, this technology has had a huge impact on the field of origin tracking, which has led to a new wave of methods in which a stochastic combination of fluorophores is used to create unique barcodes of neuronal stem cells that can be inherited by all their descendants. This method was originally developed for mice, although the combinatorial use of fluorescent proteins was redesigned to map the fate of *Drosophila melanogaster* (Flybow, d-Brainbow, Raeppli) and zebra fish (ZebraBow) [16].

One of the most modern approaches to the effective transformation of cells, embryos or tissues has become the method of transgenesis with the help of recombinant lentiviruses encoding various fluorescent proteins that are being created to contribute to multicolour mosaics for tracing the origin [68]. These recombinant DNA constructions can be transfected into the cells of interest and make it possible to trace all the descendants of individual cells (StarTrack, iON, CLONE) [69-71]. New advances in microscopy have led to progress in tracking multicoloured lines [72], expanding the possibilities of tracking lines in any organism and allowing the study of cell heterogeneity.

Genetic technologies have become important not only for studying the mechanisms of neurogenesis, but also for studying the causes of neurodegenerative diseases. In

contrast to the unsuccessful search for new and effective treatment methods, the understanding of the pathogenetic mechanisms underlying the main neurodegenerative conditions has advanced significantly. The mechanisms governing the pathological aggregation of key proteins, the nature and processes of neuronal damage associated with the formation of protein aggregates are modern areas of study of these neuropathologies.

Due to the significant similarity in the phenotype of genetic and sporadic forms of neurodegenerative diseases (for example, Alzheimer's and Parkinson's disease, frontotemporal dementia or amyotrophic lateral sclerosis), genetically modified animal models carrying human genes, which, as it turned out, mutated in familial cases of neurodegeneration, were created to study the mechanism of occurrence and progression of such pathologies.

To date, a database has been compiled that provides information on selected models of neurodegenerative diseases in rodents, including Alzheimer's, Parkinson's and lateral amyotrophic sclerosis. By summarizing, visualizing and constantly updating the available data on the characteristics of model systems, the goal of this database is to help researchers study, compare and identify models that can speed up their research (<https://www.alzforum.org/research-models>).

Currently, great efforts are being made to characterize animal models of Alzheimer's disease to better understand the pathophysiology of the disease, as well as to identify models suitable for research on potential therapeutics. At this stage, 210 animal models are described, which are used in this area of research and are mainly needed for the study of amyloid plaques (21 models), Neurofibrillary tangles (10), loss of neuron bodies (15), gliosis (27), loss of synapses (16 models), long-term potentiation and long-term depression (16 models) and cognitive impairment (5xFAD (B6SJL), 3xTg, A7 APP transgenic, Abca7*A1527G/APOE4/Trem2*R47H, APOE2 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE3 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE4 Knock-In (JAX), APP751SL/ PS1 KI). Progress in research and development of treatments for Parkinson's disease depends on reliable preclinical models, including rodent models. To date, 20 rodent models have been described that study the problems of neuronal loss, dopamine hunger, α -synuclein inclusion, neuroinflammation, mitochondrial malfunctions, motor and non-motor disorders (α -synuclein KO Mouse, Pink1 KO Rat, Thy1- α syn "Line 61" Mouse, Parkin KO, DJ-1 KO Rat). In the case of amyotrophic lateral sclerosis, there are about forty rodent models reproducing various aspects of the disease, such as motor disorders or degeneration of motor neurons. However, no model recreates all aspects of human disease perfectly.

Indeed, basic clinical studies convincingly prove and confirm with their data that experimental animal models are extremely useful for the analysis of pathogenetic mechanisms and selection of tools for neuropharmacology, the purpose of which is to influence the initial mechanisms of disease development.

ORGANOID MODELS

In recent years, due to the development of molecular methods in research, modeling of human diseases on laboratory animals often raises additional questions about pathogenetic mechanisms. Even proteins encoded by orthologs will not necessarily have completely identical functions in organisms of different biological species. The use of humanized animals also cannot always give an answer to all questions, modification will not always affect the entire body.

Two-dimensional cell cultures have been used for quite a long time to solve problems related to the study of the toxicity of substances and the reactivity of individual cells. Classical two-dimensional cell cultures, however, have a number of limitations that do not allow this technique to be used as a universal model for personalized medicine. The transcriptomic profile of cells in the culture monolayer may undergo noticeable changes, which entails possible changes in their properties and sensitivity to influences. In addition, the absence of molecular signals from cells of other populations also affects the properties of cells in the culture. This problem is partially solved by cocultivating different types of cells in one culture (macrophages and fibroblasts, endothelium and tumor cells, mesenchymal stem cells and melanocytes, etc.) [73-75].

Organoid models are three-dimensional cell culture systems that, to a greater extent than two-dimensional ones, allow modeling both normal physiological processes and pathological conditions. They can be created from embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, as well as cells of adult organisms, including tumor cells. They are relatively inexpensive systems capable of self-renewal and allow modeling a variety of processes by influencing them with various biologically active molecules, physical factors, and microorganisms. At the same time, the organoid itself will "respond" to the effect by cellular signal cascades, characteristic of the organ/tissue that it models. Thus, cerebral organoids generate alpha rhythms, which are characteristic of the brain of newborns [76].

Organoids obtained from patients' neoplasms demonstrate the same molecular characteristics as the "maternal" tumor, which allows in vitro observation of genetic changes in their cells, determination of sensitivity to different types of chemotherapeutic drugs, and

the possibility of metastasis of a particular neoplasm with a high degree of probability [77, 78].

In organoid systems, it is relatively easy to edit the genome, which can be useful both in studying the pathogenesis of individual diseases and for testing certain therapeutic approaches [79, 80].

Organoid transplantation is also an interesting area. Transplantation of both tumoroids and normal tissues is possible [81]. Experiments are also being carried out on the transplantation of human organoids to laboratory animals.

CONCLUSION

Thus, the use of transgenic animals and tissue cultures allows a much more detailed approach to the treatment of patients, choosing the most appropriate strategies. It is also possible to study in vivo the molecular and cellular foundations of the disease and therapeutic approaches with an assessment of potential risk factors. The use of three-dimensional cell cultures of the patient makes it possible to most accurately determine the molecular features of the course of the disease in a particular person and select an individual treatment program most accurately.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol.* 2009;Chapter 19:Unit-19.12.17. DOI: 10.1002/0471143030.cb1912s441.
- Ayadi A, Birling M-C, Bottomley J, et al. Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):600–610. DOI: 10.1007/s00335-012-9418-y.
- Misra RP, Duncan SA. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine.* 2002;3(19):229–238.
- Picciotto MR, Wickman K. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiological Reviews.* 1998;4(78):1131–1163.
- Pease S, Saunders TL. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis: An ISTT Manual.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
- Brenner M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology.* 1994;3(4):245–257.
- Martin DI, Whitelaw E. The vagaries of variegating transgenes. *BioEssays.* 1996;18(11):919–923. DOI: 10.1002/bies.950181111.
- Gilbert WV. Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *J Biol Chem.* 2010;285(38):29033–29038.
- Heintz N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2001;2(12):861–870.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(12):5547–5551.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10933–10938.
- Schönig K, Bujard H, Gossen M. The power of reversibility regulating gene activities via tetracycline-controlled transcription. *Methods in Enzymology.* 2010;477:429–453.
- Kim H, Kim M, Im SK, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147–159. DOI: 10.5625/lar.2018.34.4.147
- Hirrlinger J, Requardt RP, Winkler U, et al. Split-CreERT2: Temporal Control of DNA Recombination Mediated by Split-Cre Protein Fragment Complementation. *PLoS One.* 2009;4(12): e8354. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008354.
- Sando R 3rd, Baumgaertel K, Pieraut S, et al. Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat Methods.* 2013;10(11):1085–1088. DOI: 10.1038/nmeth.2640.
- Pan YA, Freundlich T, Weissman TA, et al. Zebrafish: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development.* 2013;140(13):2835–2846. DOI: 10.1242/dev.094631
- Weissman TA, Pan YA. Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics.* 2015;199(2):293–306. DOI: 10.1534/genetics.114.172510
- Kastriti ME, Kameneva P, Kamenev D, et al. Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:6. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00006.
- Bayguinov PO, Ma Y, Gao Y, et al. Imaging Voltage in Genetically Defined Neuronal Subpopulations with a Cre Recombinase-Targeted Hybrid Voltage Sensor. *J Neurosci.* 2017;37(38):9305–9319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1363-17.2017.
- DeNardo L, Luo L. Genetic strategies to access activated neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;45:121–129. DOI: 10.1016/j.conb.2017.05.014.
- Castello-Waldow TP, Weston G, Ulivi Af, et al. Hippocampal neurons with stable excitatory connectivity become part of neuronal representations.

PLoS Biol. 2020;18(11):e3000928. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000928.

22. Phan QV, Contzen J, Seemann P, et al. Site-specific chromosomal gene insertion: Fip recombinase versus Cas9 nuclease. *Sci Rep.* 2017;7(1):17771. DOI: 10.1038/s41598-017-17651-0.

23. Karimova M, Baker O, Camgoz A, et al. A single reporter mouse line for Vika, Fip, Dre, and Cre-recombination. *Sci Rep.* 2018;8(1):14453. DOI: 10.1038/s41598-018-32802-7.

24. Gut P, Reischauer S, Stainier DYS, et al. Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiol Rev.* 2017;97:889–938. DOI: 10.1152/physrev.00038.2016

25. Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, et al. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nature Genetics.* 2002;31(1):106–110.

26. Thisse C, Zon LI. Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science.* 2002;295(5554):457–462.

27. Jurczyk A, Roy N, Bajwa R, et al. Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol.* 2011;170(2):334–345.

28. Ober EA, Field HA, Stainier DY. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development.* 2003;120(1):5–18.

29. Schlegel A, Stainier DY. Lessons from “Lower” Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism. *PLoS Genetics.* 2007;3(11):e199.

30. Cao J, Navis A, Cox BD, et al. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin-1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration. *Development.* 2016;143(2):232–243.

31. Unker JP, Noël ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo. *Cell.* 2014;159:662–675.

32. Lee R, Thiery JP, Carney TJ. Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest. *Current biology.* 2013;23(9):R336–337.

33. Nolte H, Hölper S, Housley MP, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed SILAC approach. *Proteomics.* 2015;15(4):739–751.

34. Fraher D, Hodge JM, Collier FM, et al. Citalopram and sertraline exposure compromises embryonic bone development. *Molecular Psychiatry.* 2016;21(5):656–664.

35. Gupta V, Poss KD. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature.* 2012;484(7395):479–484.

36. Song Z, Zhang X, Jia S, et al. Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao.* 2016;43:107–20.

37. Howe DG, Bradford YM, Conlin T, et al. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic acids research.* 2013;41(D1):D854–860.

38. Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, et al. Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome. *PLoS Genet* 2012;8(8):e1002861. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002861.

39. Cornet C, Di Donato V, Terriente J. Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol.* 2018;9:703. DOI: 10.3389/fphar.2018.00703.

40. Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1007:179–197. DOI: 10.1007/978-3-319-60733-7_10.

41. Fish RJ, Di Sanza C, Neerman-Arbez M. Targeted mutation of zebrafish fga models human congenital afibrinogenemia. *Blood.* 2014;123:2278–2281.

42. Wilkinson RN, Jopling C, van Eeden FJ. Zebrafish as a model of cardiac disease. *Progress in molecular biology and translational science.* 2014;124:65–91.

43. Schmid B, Haass C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry.* 2013;127(4):461–470.

44. Runtuwene V, van Eekelen M, Overvoorde J, et al. Noonan syndrome gain-of-function mutations in NRAS cause zebrafish gastrulation defects. *Disease models & mechanisms.* 2011;4(3):393–399.

45. Seda M, Peskett E, Demetriou C, et al. Analysis of transgenic zebrafish expressing the Lenz-Majewski syndrome gene PTDSS1 in skeletal cell lineages. *F1000Research.* 2019;8:273.

46. O'Donnell KC, Lulla A, Stahl MC, et al. Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of alpha-synuclein toxicity. *Disease models & mechanisms.* 2014;7:571–582.

47. Ohki Y, Wenninger-Weinzierl A, Hruscha A, et al. Glycine-alanine dipeptide repeat protein contributes to toxicity in a zebrafish model of C9orf72 associated neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration.* 2017;12:6.

48. Issa FA, Mazzochi C, Mock AF, et al. Spinocerebellar ataxia type 13 mutant potassium channel alters neuronal excitability and causes locomotor deficits in zebrafish. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011;31(18):6831–6841.

49. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1104–1115. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.NIH

50. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276(6):618–32. DOI: 10.1111/joim.12296.

51. Vedder VL, Aherrahrou Z, Erdmann J. Dare to Compare. Development of Atherosclerotic Lesions in Human, Mouse, and Zebrafish. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:109. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00109.

52. Chao L, Gates KP, Fang L, et al. Apoc2 loss-of-function zebrafish mutant as a genetic model of

hyperlipidemia. *Dis Models Mech.* 2015;8(8):989-998. DOI: 10.1242/dmm.019836.

53. Chao Liu, Young Sook Kim, Jungsu Kim, et al. Modeling hypercholesterolemia and vascular lipid accumulation in LDL receptor mutant zebrafish. *J Lipid Res.* 2018;59(2):391-399. DOI: 10.1194/jlr.D081521.

54. Jun Ka, Suk-Won Jin. J, Zebrafish as an Emerging Model for Dyslipidemia and Associated Diseases. *J Lipid Atheroscler.* 2021;10(1):42-56. DOI: 10.12997/jla.2021.10.1.42.

55. Jun Ka, Boryeong Pak, Orjin Han, et al. Comparison of transcriptomic changes between zebrafish and mice upon high fat diet reveals evolutionary convergence in lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(4):638-643. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.042.

56. Schlegel A. Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:159. DOI: 10.3389/fendo.2016.00159.

57. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;318:2-9.

58. Ridker PM, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-1131.

59. Baragetti A, Catapano AL, Magni P. Multifactorial Activation of NLRP3 Inflammasome: Relevance for a Precision Approach to Atherosclerotic Cardiovascular Risk and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4459. DOI: 10.3390/ijms21124459.

60. Li JY, Wang YY, Shao T, et al. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1 β maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis. *J Biol Chem.* 2020;295(4):1120-1141. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011751.

61. Milichko V, Dyachuk V. Novel glial cell functions: extensive potency, stem cell-like properties, and participation in regeneration and transdifferentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00809.

62. Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, et al. Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science.* 2014;345(6192):82-87.

63. Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2087-2096.

64. Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome. *Cell.* 1989;59:499-509.

65. Dhaliwal J, Lagace DC. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2011;33:1025-1036.

66. Lacar B, Young SZ, Platel J-C, et al. Imaging and recording subventricular zone progenitor cells in live tissue of postnatal mice. *Front Neurosci* 2010;4:1-16.

67. Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 2007;450:56-62.

68. Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, et al (2011) RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med.* 2011;17(4):504-509. DOI: 10.1038/nm.2338.

69. García-Marqués J, López-Mascaraque L. Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cereb Cortex.* 2013;23:1463-1472. DOI: 10.1093/CERCOR/BHS134.

70. Kumamoto T, Maurinot F, Barry-Martin R, et al. Direct readout of neural stem cell transgenesis with an integration-coupled gene expression switch. *Neuron.* 2020;107(4):617-630.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.05.038.

71. Loulier K, Barry R, Mahou P, et al. Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron.* 2014;81:505-520. DOI: 10.1016/J.NEURON.2013.12.016.

72. Abdeladim L, Matho KS, Clavreul S, et al. Multicolor multiscale brain imaging with chromatic multiphoton serial microscopy. *Nat Commun.* 2019;10:1-14. DOI: 10.1038/S41467-019-09552-9.

73. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima, et al. Controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells on detachable substrates. *Lab Chip.* 2009;9(3):427-432. DOI: 10.1039/b812510d.

74. Kim H, Yi N, Do B, et al. Adipose-derived stem cell coculturing stimulates integrin-mediated extracellular matrix adhesion of melanocytes by upregulating growth factors. *Biomolecules & Therapeutics.* 2019;27:185-192. doi: 10.4062/biomolther.2018.203.

75. Zeng Q, Chen W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin-oxidized alginate hydrogel. *Biomaterials.* 2010;31(22):5772-5781. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.022.

76. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell.* 2019;25(4):558-569.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2019.08.002.

77. Signati L, Allevi R, Piccotti F, et al. Ultrastructural analysis of breast cancer patient-derived organoids. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):423. DOI: 10.1186/s12935-021-02135-z.

78. Xu H, Lyu X, Yi M, et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):116. DOI: 10.1186/s13045-018-0662-9.

79. Gopal S, Rodrigues AL, Dordick JS. Exploiting CRISPR Cas9 in Three-Dimensional Stem Cell Cultures to Model Disease. *Front Bioen Biotechnol.* 2020;8:692. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00692.

80. Teriyapirom I, Batista-Rocha AS, Koo BK. Genetic engineering in organoids. *J Mol Med.* 2021;99:555-568. DOI: 10.1007/s00109-020-02029-z.

81. Lupo F, Piro G, Torroni L, et al. Organoid-Transplant Model Systems to Study the Effects of Obesity on the Pancreatic Carcinogenesis in vivo. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:308. DOI: 10.3389/fcell.2020.00308.

Author information:

Andreeva Daria D., Laboratory Assistant Neurogenesis and neurodegenerative diseases Research Laboratory WCRC Almazov National Medical Research Centre;

Sinegubov Artem A., Freelance researcher of Almazov National Medical Research Centre;

Burzak Nikita A., Research Assistant Neurogenesis and neurodegenerative diseases Research Laboratory WCRC Almazov National Medical Research Centre;

Murashova Lada A., Research Assistant Neurogenesis and neurodegenerative diseases Research Laboratory WCRC Almazov National Medical Research Centre;

Vasyutina Marina L., Researcher Neurogenesis and neurodegenerative diseases Research Laboratory WCRC Almazov National Medical Research Centre;

Dyachuk Vyacheslav A., Head of Neurogenesis and neurodegenerative diseases Research Laboratory WCRC Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 612.171.3:615.2

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ КАЛЬЦИФИКАЦИИ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Шишкова А. А.^{1, 3}, Лобов А. А.^{2, 3}, Докшин П. М.^{1, 3}, Боярская Н. В.^{2, 3},
Качанова О. С.³, Малашичева А. Б.^{1, 2, 3}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Шишкова Анастасия Алексеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: anastasiia.shishkova@gmail.com

Статья поступила в редакцию
17.09.2021 и принята к печати
29.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Самый распространенный клапанный порок на сегодняшний день — аортальный стеноз. На сегодняшний день не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование кальцификации аортального клапана, поэтому единственным радикальным методом лечения остается хирургическое вмешательство. В данном обзоре освещаются современные подходы к поиску ингибиторов кальцификации, включая мультиомиксный подход, достижения протеомики, геномики и транскриптомики. Также перспективным представляется поиск путем машинного обучения тех молекул, которые способны нормализовывать геном пораженных клеток.

Ключевые слова: аортальный стеноз, кальцификация аортального клапана, метаболомика, микрРНК, омиксный подход, протеомика, транскриптомика.

Для цитирования: Шишкова А.А., Лобов А.А., Докшин П.М. и др. Современные подходы к поиску лекарственной терапии кальцификации аортального клапана. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):118-135.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АС — аортальный стеноз,
иАПФ — ангиотензинпревращающий фермент.

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий в структуре клапанных пороков сердца произошли существенные изменения, которые характеризуются уменьшением частоты пороков сердца ревматической этиологии и увеличением распространенности склеродегенеративных поражений клапанов. Увеличение продолжительности жизни населения и совершенствование медицинских технологий привело к тому, что самым распространенным клапанным пороком сердца на сегодняшний день признан аортальный стеноз (АС). Частота обнаружения АС среди лиц в возрасте 65 лет составляет около 25 %, а после достижения возраста 75 лет увеличивается до 48 %, хотя среди лиц в возрасте до 65 лет она составляет лишь 4–5 % [1]. На сегодняшний день не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование аортального стеноза, поэтому единственным радикальным методом остается протезирование аортального клапана. Однако с учетом продолжительности жизни населения, сопровождающейся ежегодным ростом числа пациентов с дегенеративным аортальным стенозом, очевидной становится необходимость активного поиска потенциальной мишеней для терапевтического воздействия на процессы кальцификации аортального клапана. Данный обзор посвящен современному состоянию исследований, направленных на поиск лекарственной терапии кальцификации аортального клапана, включая мультиомиксный подход, достижения протеомики, геномики и транскриптомики. Такой подход позволяет, во-первых, более комплексно взглянуть на проблему, во-вторых, выявить ключевые моменты в процессе кальцификации клапана, что необходимо для поиска и тестирования химических ингибиторов кальцификации.

МАКРО- И МИКРОСТРУКТУРА АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

1.1 Трехстворчатый аортальный клапан

Аортальный клапан является частью корня аорты. Наиболее часто аортальный клапан состоит из трех створок (называются в зависимости от их расположения): левая полулунная (коронарная) створка, правая полулунная (коронарная) створка и задняя (некоронарная) створка аортального кла-

пана [2, 3]. Створки представляют собой тонкие (< 1 мм), гибкие, аваскулярные структуры, состоящие из трех слоев: желудочкового (*ventricularis*), аортального (*fibrosa*) и спонгиозного (*spongiosa*) [4]. С аортальной и желудочковой сторон створки покрыты монослоем эндотелиальных клеток. Было доказано, что эндотелиальные клетки аортального клапана отличаются от эндотелиальных клеток, выстилающих артерии и вены, по способности реагировать на изменения гемодинамики, что подтверждает их уникальную морфологию [4, 5]. Спонгиозный слой (*spongiosa*) содержит большое количество гликозамингликанов и протеогликанов. Между всеми внеклеточными компонентами в трех слоях находятся интерстициальные клетки клапана. VIC необходимы для поддержания функции клапана и гомеостаза посредством пролиферации, секреции матриксных металлопротеиназ и компонентов экстрацеллюлярного матрикса. VIC — это гетерогенная группа клеток с уникальными характеристиками. В аортальных клапанах взрослых людей VIC преимущественно представлены фибробластами («молчащими клетками»), только 2–5 % интерстициальных клеток находятся в активированном состоянии в норме. Их фенотип в норме меняется с возрастом и при изменении условий окружающей среды (например, внезапное изменение артериального давления) [5]. Интерстициальные клетки аортального клапана — основа патологической дифференцировки либо в остеобластоподобные клетки, либо в миофибробласты. Взаимодействие клеток между собой играет значительную роль в определении дифференцировки клеток. Эндотелиальные и интерстициальные клетки должны взаимодействовать между собой для обеспечения правильного развития и гомеостаза в клапане. Складывается впечатление, что нарушение этого взаимодействия может способствовать развитию патологии клапана. По-видимому, в правильном функционировании сообщества этих клеток лежит механизм поддержания целостного состояния аортального клапана. Нарушение баланса между этими клетками может, по-видимому, приводить к нарушениям дифференцировки и изменениям клапана, в частности к кальцификации [6, 7].

1.2 Двустворчатый аортальный клапан

Двустворчатый аортальный клапан является широко распространенным вариантом развития клапана, который встречается у 2 % населения с соотношением между мужчинами и женщинами 4:1 [8, 9]. Морфологически двустворчатый аортальный клапан представляет собой 2 створки, которые

могут быть как одинакового, так и неравного размера (разница может достигать 1,5–2 раз). У лиц с двустворчатым аортальным клапаном манифестация аортального стеноза, как правило, происходит на 20 лет раньше, чем у людей с трехстворчатым клапаном, и к 45 годам более половины лиц с двустворчатым клапаном имеют выраженный аортальный стеноз.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АОРТАЛЬНОГО СТЕНОЗА

Основной причиной развития АС остается кальцификация исходно нормального трехстворчатого или врожденного двухстворчатого аортального клапана. Раннее формирование АС рассматривалось как пассивный дегенеративный процесс в результате механического износа створок на шестом и седьмом десятках жизни или как атеросклеротический процесс, учитывая связь с традиционными факторами риска, такими как артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение, повышение уровня холестерина [10, 11]. Однако попытки использовать стандартные подходы, направленные на подавление процессов атерогенеза, не привели к сдерживанию темпов прогрессирования АС.

В процессе формирования аортального стеноза принято выделять 3 стадии: первая обусловлена воспалительными изменениями в клапане, вторая — развитием фиброза, третья — формированием кальциноза аортального клапана. В свою очередь в процессе развития кальциноза аортального клапана принято также выделять несколько стадий: аортальный склероз (стадия легкой кальцификации) — уплотнение и утолщение створок клапана с локальными участками кальцификации, без слияния комиссур и без выраженной обструкции выходного отдела левого желудочка. В дальнейшем аортальный склероз может переходить в стадию умеренной кальцификации и, наконец, в третью стадию — тяжелую кальцификацию створок, сопровождающуюся обструкцией выходного отдела левого желудочка [12, 13].

В настоящее время доказано, что кальцификация аортального клапана — активный процесс, молекулярно-клеточные механизмы которого слабопонятны [14]. Было показано, что в процессе кальцификации участвуют регуляторы кальцификации и оссификации, такие как остеоопонтин, остеоонектин, остеокальцин и костный белок BMP (*bone morphogenetic protein*). Остеопротегерин и его лиганд (*RANKL — receptor activated of nuclear factor- κ B ligand*) также участвуют в кальцификации кла-

пана. Сигнальная цепь *RANK — RANKL — OPG* (*osteoprotegerin*) находится под контролем *RUNX2*, который находится под контролем сигнального пути Notch [14–24]. Спектр действия сигнального пути Notch затрагивает большое количество различных генов, среди которых гены, ответственные за дифференцировку и пролиферацию. Известно, что мутация гена *NOTCH1* связана с кальцинозом аортального клапана. Важным является то, что в результатах доклинических исследований было показано, что специфическое блокирование сигнального пути Notch значительно подавляет кальцификацию сосуда и аортального клапана [25–29]. Показано, что в норме *NOTCH1* ингибирует активацию *Runx2*, блокируя тем самым отложения кальция на клапане. Мутации в гене *NOTCH1* приводят к активации (дерепрессии) *RUNX2*, приводя таким образом к дифференцировке интерстициальных клеток в остеобласты [30–32].

Аортальный стеноз — комплексное, многофакторное заболевание [33]. Среди компонентов, влияющих на развитие аортального стеноза, находятся следующие факторы: ренин-ангиотензин-альдостероновая система, влияние симпатической нервной системы [34], накопление липидов, остеогенез, миофиброгенез, биосинтез и агрегация внеклеточных везикул, активация тромбоцитов, остеохондрогенез [35], клеточное старение, дезорганизация межклеточного матрикса металлопротеиназами, воспалительные элементы (макрофаги, Т-лимфоциты, тучные клетки и молекулы, характерные для типичного воспаления, такие как IL-2, HLA-DR, TNF alpha) [36–40], эндотелиальная дисфункция, нарушение процессинга фосфатов [26, 27, 33]. На сегодняшний день при развитии у пациента тяжелого аортального стеноза единственным методом лечения остается либо протезирование аортального клапана, либо транскатетерная имплантация аортального клапана. Данные оперативные вмешательства сопряжены с высоким риском осложнений, техническими нюансами, более того, в нашей стране их выполнение возможно только в крупных специализированных кардиоцентрах. Высокая стоимость данных хирургических вмешательств, безусловно, является бременем системы здравоохранения. Учитывая тенденцию к старению популяции и увеличение количества пациентов со склеродегенеративным аортальным стенозом очевидна острая необходимость в химическом торможении процессов кальцификации, которая позволит избежать или отсрочить хирургическое вмешательство. Отсутствие лекарственной терапии во многом обусловлено проблемами в изучении патогенеза данного заболевания.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

1.3. Статины

Существует большое количество исследований, посвященных влиянию статинов на развитие аортального стеноза. Показано, что в стенозированном клапане присутствуют окисленные липопротеины, апо А, апо В и апо Е липопротеины, макрофаги, Т-лимфоциты, пенистые клетки, факторы роста и провоспалительные цитокины, которые участвуют в инициации патологического процесса. Вместе с тем хорошо известны не только гиполипидемические свойства статинов, но и их плеiotропные эффекты [41].

Однако одно из крупнейших исследований, SEAS (Simvastatin and Ezetimib in Aortic Stenosis), не подтвердило способность статинов сдерживать прогрессию АС. В отчете по данному исследованию, опубликованному 21 июля 2008 года, четко написано, что нет различий ни по первичной (смерть, протезирование аортального клапана, декомпенсация хронической сердечной недостаточности, инсульт, инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия), ни по вторичным (прогрессирование стеноза, оцененное по ЭхоКГ-критериям) точкам эффективности между группами, принимавшими лекарственные препараты и плацебо [42, 43]. Были проведены небольшие ретроспективные исследования, оценивающие связь между приемом бифосфонатов и замедлением прогрессирования аортального стеноза. Однако дальнейшие детальные исследования не выявили положительного влияния препаратов на темп прогрессирования [44, 45].

1.4. Ингибиторы RANK/RANKL

Интерстициальные клетки аортального клапана дифференцируются в остеобластоподобные клетки посредством активации рецептора ядерного фактора каппа-бэта (RANK — receptor activator of nuclear factor kappa-B). В ходе остеобластной дифференцировки достоверно повышаются: щелочная фосфатаза, остеопонтин, металлопротеиназы, Runx2 и костный белок BMP (*bone morphogenetic protein*). RANKL — это трансмембранный гликопротеин, цитокин семейства фактора некроза опухолей, продуцируемый клетками остеобластного ряда и активированными Т-лимфоцитами, который, связываясь с рецептором RANK, подает сигнал для дифференцировки клеток-предшественников и созревания остеокластов.

Остеопротегерин также относится к цитокинам суперсемейства фактора некроза опухолей и продуцируется остеобластами. Будучи рецептором к RANKL, он блокирует его взаимодействие

с собственным рецептором RANK, препятствуя остеокластогенезу. RANKL в тканях аортального клапана способствует переходу миофибробластов в остеобласты. Деносумаб — человеческое моноклональное антитело (IgG2), созданное для связывания рецептора RANKL (для предотвращения соединения RANKL с RANK), тем самым имитируя эффект остеопротегерина. Деносумаб используется в лечении остеопороза, множественной миеломы и других состояний, сопровождающихся резорбцией костной ткани. На сегодняшний день не завершено исследование, цель которого оценить эффективность приема деносумаба с целью торможения прогрессирования АС (SALTIRE II). Однако опубликованы результаты исследования, выполненного на свинных интерстициальных клетках, где показано, что деносумаб способен частично блокировать кальцификацию [46].

1.5. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента

Существует несколько работ, в которых изучали влияние ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ) на процесс стенозирования, так как доказано, что АПФ, ангиотензин II и рецепторы I типа ангиотензина II присутствуют в кальцифицированных створках. Ангиотензин II потенцирует воспаление, аккумуляцию липопротеинов, окислительный стресс и стимулирует экспрессию фибробластами липопротеин-связывающие протеогликаны и бигликаны. Рецепторы ангиотензина II имеются на фибробластах стенозированного клапана. Рецепторы I типа ангиотензина II, постоянно экспрессирующиеся гладкомышечные клетки, появляются на интерстициальных клетках клапана только при начинающемся стенозировании. Таким образом, до того момента, когда клетки начинают экспрессировать рецепторы I типа ангиотензина II, клапан защищен от воздействия ангиотензина II. Исходя из того, что известны провоспалительные и профиброгенные черты ангиотензина II, были предприняты попытки блокирования процесса стенозирования приемом иАПФ. Доказано, что иАПФ обладают антипролиферативным действием (уменьшают гипертрофию стенок сосудов и миокарда и пролиферацию внеклеточного матрикса), улучшают эндотелиальную функцию (усиливают выработку NO), тормозят прогрессирование атеросклероза (так как блокируют образование ангиотензина и приводят к повышению уровня брадикинина и NO, что, в свою очередь, приводит к подавлению миграции и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, таксиса и активации воспалительных клеток, снижению окислитель-

ного стресса и улучшению эндотелиальной функции). Ретроспективный анализ показал, что иАПФ несколько замедляют отложения кальция на створках, но не предупреждают прогрессирование стеноза. Достаточно сложно доказать влияние иАПФ на процесс стенозирования, так как иАПФ изменяют внутрисердечную гемодинамику, что, вероятно, маскирует все остальные эффекты препаратов [47].

1.6. Витамин К

На сегодняшний день изучают также влияние витамина К на процесс кальцификации аортального клапана. Витамин К — жирорастворимый витамин, существует в 2 формах: витамин К1 (филлохинон) и витамин К2 (менахинон). Витамин К2 вовлечен в процессы ингибирования артериальной кальцификации через поддержание процессов карбоксилирования матриксного Gla-протеина. Процесс карбоксилирования необходим для поддержания оптимального поглощения кальция клеткой. Известно, что для оптимальной работы и посттрансляционного карбоксилирования матриксного Gla-протеина требуется достаточное количество витамина К. Таким образом, было сделано предположение, что достаточное потребление витамина К может препятствовать прогрессированию аортального стеноза. В единственном небольшом рандомизированном исследовании (группа 38 человек) было показано, что прием витамина К способен замедлить прогрессирование АС. Однако учитывая небольшой период наблюдения (1 год), небольшую группу пациентов, очевидно, что необходимо дальнейшее, более глубокое изучение данного факта [48].

Учитывая многокомпонентность составляющих патогенеза развития аортального стеноза, для торможения процессов кальцификации изучались и иАПФ, и статины, и витамин К, и бисфосфонаты, и др. Однако либо большинство препаратов не доказало своей эффективности в сдерживании темпов развития аортального стеноза, либо требуется дальнейшее изучение препарата с большей выборкой пациентов и проспективным наблюдением.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССА КАЛЬЦИФИКАЦИИ И ПОИСКА НОВОЙ МИШЕНИ ТЕРАПИИ

На сегодняшний день очень активно ведутся поиски мишени, воздействие на которую сможет ингибировать или замедлять кальцификацию. Есть предположение, что у женщин и мужчин кальцификация идет разными механизмами. У мужчин интерстициальные клетки идут в остеодифферен-

цировку, а у женщин в миофибробластную дифференцировку [49]. Возможно, это объяснит эффективность разных препаратов для сдерживания процесса кальцификации.

Разными лабораториями выполнено множество исследований и экспериментов на культурах интерстициальных и эндотелиальных клеток клапана человека, свиньи, овцы, крысы и мыши. Безусловно, для точной верификации предпочтительна работа именно с человеческими клетками, однако это далеко не всегда возможно из-за технических трудностей забора материала из операционных и культивирования данных клеток. Культивирование клеток в трехмерном пространстве с воспроизведением биомеханики поведения клапана (симулирующими ток крови на клапане) является сегодня перспективным направлением.

Ранее неоднократно было показано, что значимое изменение уровня экспрессии ряда генов сигнального пути Notch и других сигнальных путей в клетках от пациентов с бicuspidальным и триkuspidальным клапаном играет важную роль в развитии аортального стеноза [22]. Однако сейчас стало понятно, что анализ уровня экспрессии нескольких генов — это лишь поверхностный и односторонний взгляд на проблему.

На сегодняшний день актуальным является «омиксный» подход в изучении патогенеза кальцификации аортального клапана. «Омиксными» принято называть технологии, использующие методы геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, то есть наук, которые изучают, как устроен геном, как реализуется закодированная в нем информация и как она преобразуется в структуру белков и в дальнейшем в какие-то признаки организма. В отличие от генов и белков, которые predisposed к эпигенетическим и посттрансляционным изменениям, метаболиты дают истинное представление о клеточной активности [50]. Метаболомный анализ пораженного клапана позволяет получить «молекулярную» информацию о метаболитах и метаболических путях, которые активны на разных стадиях процесса кальцификации.

Однако нужно понимать, что выявление только циркулирующих в крови метаболитов может служить маркером для установления диагноза и выявления тяжести стеноза. Один из кандидатов на роль маркера заболевания — лизофосфатидная кислота. Было показано, что уровень лизофосфатидной кислоты значимо повышен в сыворотке крови у пациентов с быстро прогрессирующим АС в отличие от пациентов с медленно прогрессирующим заболеванием. Тем не менее к интеграции мультиомиксных данных в аортальном клапане

следует подходить с осторожностью в связи с низкой плотностью клеток клапана [51].

Перспективным представляется изучение роли микроРНК в процессе кальцификации клапана [52]. МикроРНК являются регуляторами многих генов на трансляционном уровне. Каждая микроРНК регулирует множество транскриптов. Есть исследования, в которых показано, что ингибиторы микроРНК могут подавлять кальцификацию аортального клапана. Группой ученых во главе с T.Tashima было показано, что микроРНК34a потенцирует отложение кальция в створках клапана, воздействуя на сигнальный путь Notch-Runx2, и что ингибирование данной микроРНК значительно подавляло кальцификацию (миофиброгенез) в интерстициальных клетках клапана в сравнении с контролем [53–54].

На сегодняшний день очень востребованы подходы «сетевой медицины», когда большое количество транскриптомных, протеомных и других данных интегрируется и используется для приоритизации, то есть выделения ключевых взаимодействий, которые являются важными при

развитии конкретной патологии [50]. Группой ученых, в том числе специалистами из НМИЦ им. В. А. Алмазова, была выполнена работа по поиску потенциальных мишеней для торможения процессов кальцификации при развитии аортального стеноза. Был использован подход машинного обучения для поиска молекул, способных нормализовать генотип клетки с мутацией в гене *NOTCH1*. Исследование было выполнено на модели индуцированных плюрипотентных клеток, что лишает исследование эффекта субъективности при работе с клеточными линиями, выделенными из пораженного клапана. Было проанализировано порядка 1500 потенциальных молекул, и только одно вещество, ХСТ 790, полностью приводило к комплексной нормализации генетической сети эндотелиальных клеток. ХСТ 790 — обратный агонист орфанного ядерного рецептора ERRa, вовлеченного в WNT сигналинг. Более того, введение ХСТ 790 мышам значительно уменьшало процентное содержание клеток, экспрессирующих RUNX2, что означает ослабление процессов остеогенеза в клапане [55].

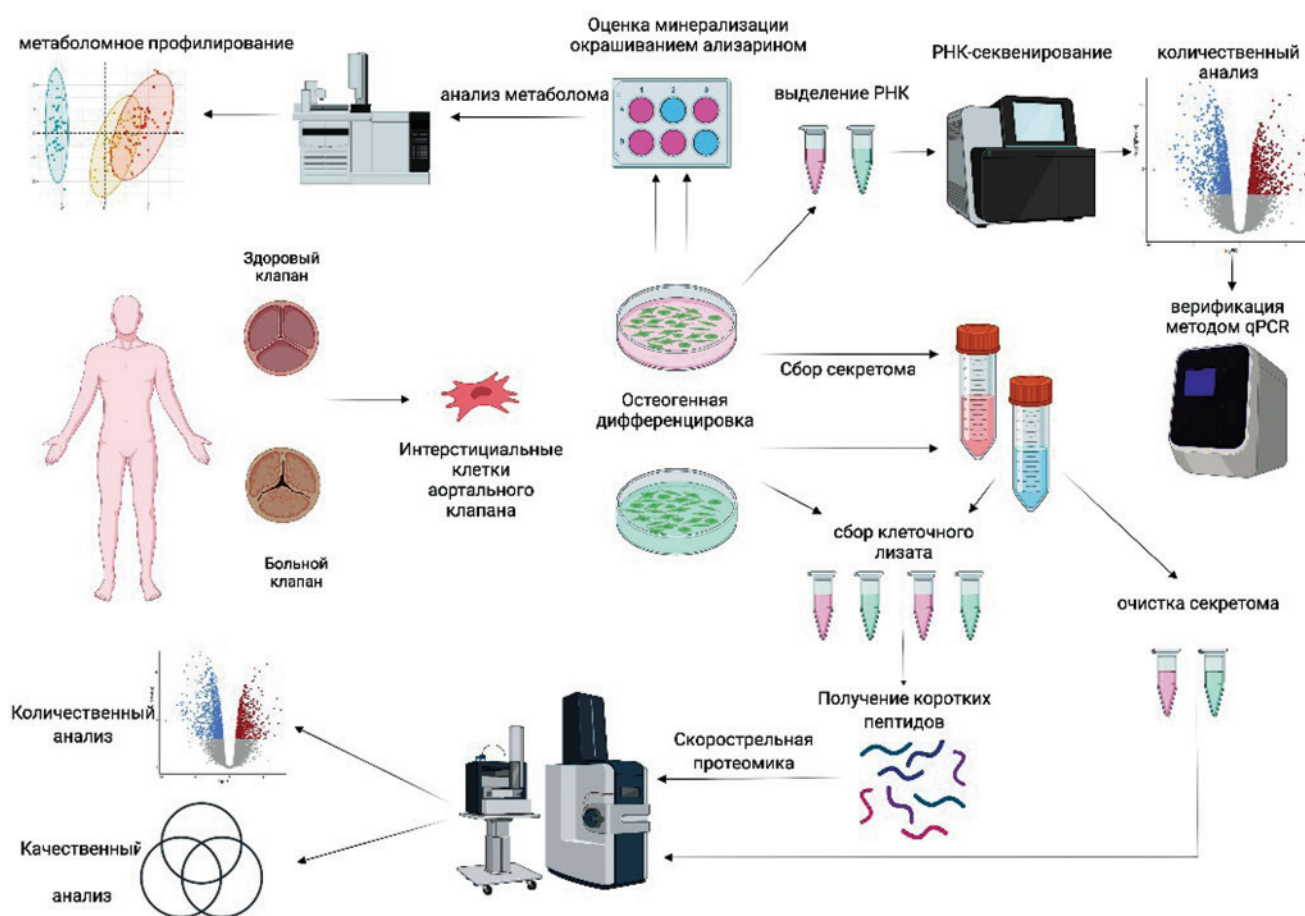


Рис. 1. Мультиомиксный подход к изучению патогенеза кальцификации: получение клеточных культур из аортального клапана человека, остеогенная дифференцировка, анализ транскриптома/ протеома /метаболома/ секретома

В настоящее время в научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией Научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины» НМИЦ им. В. А. Алмазова ведутся активные исследования по поиску терапевтических агентов, способных предотвратить патологическую кальцификацию — в частности с применением мультиомиксных подходов — к анализу патологической остеогенной дифференцировки/кальцификации интерстициальных клеток аортального клапана (рис. 1).

На сегодняшний день поиск таргетной терапии упирается в создание детального молекулярного портрета пораженного и здорового клапана. И только понимание ключевых и второстепенных фундаментальных клеточных и молекулярных механизмов, задействованных при развитии кальцификации, может пролить свет на понимание проблемы.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bernard L, Delgado V, Rosenhek R, et al. Contemporary presentation and management of valvular heart disease the EURObservational research programme valvular heart disease II survey. *Circulation*. 2019;140(14):1156–1169. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041080.
- Orlovskii PI, Gritsenko VV, Yukhnev AD, et al. Artificial heart valves. SPb.: ZAO «OLMA Media GrupP». 2007. S. 9-21. In Russian [Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д. и др. Искусственные клапаны сердца. СПб.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп». 2007. С. 9-21].
- Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro – and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1421–1436. DOI: 10.1098/rtsb.2007.2125.
- Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4-5):242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.
- Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annual Rev Pathol*. 2012;7:161–183. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130257.
- Malashicheva A, Kostina A, Kostareva A, et al. Notch signaling in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysms: a bridge between embryonic and adult states. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(3):165631. DOI:10.1016/j.bbdis.2019.165631.
- Aquila G, Kostina A, Viecei Dalla Sega F, et al. The Notch pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases? Expert opinion on therapeutic targets. 2019;23:695–710. DOI: 10.1080/14728222.2019.1641198.
- Rajamannan NM. Bicuspid aortic valve disease: the role of oxidative stress in Lrp5 bone formation. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(3):168–176. DOI: 10.1016/j.carpath.2010.11.007.
- Abdulkareem N, Smelt J, Jahangiri M. Bicuspid aortic valve aortopathy: genetics, pathophysiology and medical therapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17(3):554–559. DOI: 10.1093/icvts/ivt196.
- Yetkin E., Waltensberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2009;135(1):4–13. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.03.108.
- Irtuga OB, Zhiduleva EV, Murtazaliev PP, et al. Pathogenetic mechanisms of the development of aortic valve calcification: a clinician's view. *Translational medicine*. 2015:34–44. In Russian [Иртуга О.Б., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.П. и др. Патогенетические механизмы развития кальциноза аортального клапана: взгляд клинициста. Трансляционная медицина. 2015:34–44].
- Guerray M, Mohler III ER. Models of Aortic Valve Calcification *J Investig Med*. 2007;55(6):278–283. DOI: 10.2310/6650.2007.00012.
- Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, et al. Association aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999;341(3):142–147. DOI: 10.1056/NEJM199907153410302.
- Ferrari R, Rizzo P. The Notch pathway: a novel target for myocardial remodeling therapy? *Eur Heart J*. 2014;35(32):2140–2145. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu244.
- Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, et al. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(1):17–24. DOI: 10.1007/s00109-008-0400-9.
- Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 2004;131(5):965–973. DOI: 10.1242/dev.01074.
- Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(1):C1–11. DOI: 10.1152/ajpcell.00415.2006.
- Mathieu P, Boulanger M-C, Bouchareb R. Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2014;12(7):851–862. DOI: 10.1586/14779072.2014.923756.
- Zhou X.L., Liu J.C. Role of Notch signaling in the mammalian heart. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(1):1–10. DOI: 10.1590/1414-431X20133177.
- Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, et al. Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):E1868–1877. DOI: 10.1073/pnas.1116889109.
- Garg V. Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(3):180–184. DOI: 10.1097/01.hco.0000221578.18254.70.

22. Kostina A, Shishkova A, Ignatieva E, et al. Different Notch signaling in cells from bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;114:211–219. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.009.
23. Shishkova AA, Rutkovskii AV, Irtyuga OB, et al. Molecular cell mechanisms of aortic valve calcification. *Translational medicine.* 2015;45–52. In Russian [Шишкова А.А., Рутковский А.В., Иртюга О.Б. и др. Молекулярно-клеточные механизмы кальцификации аортального клапана. *Трансляционная медицина.* 2015;45–52].
24. Acharya A, Hans CP, Koenig SN, et al. Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. *PLoS One.* 2011;6(11):e27743. DOI: 10.1371/journal.pone.0027743.
25. Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy *Cardiol Clin.* 2020;38(1):1-12. DOI: 10.1016/j.ccl.2019.09.010.
26. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis: Methods, Models and Mechanisms. *Circ Res.* 2011;108(11):1392–1412. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234138.
27. Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart. *Eur Heart J.* 2018;39(28):2618–2624. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx653.
28. Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in aortic stenosis. The skeleton key. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(5):561–577. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.05.066.
29. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, et al. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(1):17–24. DOI: 10.1007/s00109-008-0400-9.
30. Zhiduleva EV, Irtyuga OB, Shishkova AA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017;164(9):356–360. In Russian [Жидулева Е.В., Иртюга О.Б., Шишкова А.А. и др. Клеточные механизмы кальцификации аортального клапана. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017;164(9):356–360].
31. Irtyuga OB, Zhiduleva EV, Murtazaliev PM, et al. The role of osteoprotegerin system/RANKL/RANK in pathogenesis of aortic stenosis. *Russian Journal of Cardiology.* 2018;2(154):39–43. In Russian [Иртюга О.Б., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М. и др. Роль системы остеопротегерина/RANKL/RANK в патогенезе аортального стеноза. *Российский кардиологический журнал.* 2018;2(154):39–43].
32. Kostina DA, Uspensky VE, Semenova DS, et al. Role of calcification in aortic degeneration. *Translational Medicine.* 2020;7(1):6–21. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21. In Russian [Костина Д.А., Успенский В.Е., Семенова Д.С. и др. Молекулярные механизмы сосудистой кальцификации. *Трансляционная медицина.* 2020;7(1):6–21].
33. Mohler ER. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol.* 2004;94(11):1396–1402, A6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.08.013.
34. Osman L, Chester AH, Sarathchandra P, et al. A novel role of the sympathetic-adrenergic system in regulating valve calcification. *Circulation.* 2007;116(11 Suppl):I282–7. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681072.
35. Shin V, Zebboudi AF, Bostrom K. Endothelial Cells Modulate Osteogenesis in Calcifying Vascular Cells. *J Vasc Res.* 2004;41(2):193–201. DOI: 10.1159/000077394.
36. Venardos N, Nadlonek NA, Zhan Q, et al. Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. *J Surg Res.* 2014;190(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jss.2014.03.051.
37. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(5):483–491. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3282a66099.
38. Golovkin AS, Zhiduleva EV, Shishkova AA, et al. CD39 and CD73 expression in interstitial cells of calcified aortic stenosis. *Russian Journal of Immunology.* 2017;11(2):287–289. In Russian [Головкин А.С., Жидулева Е.В., Шишкова А.А. и др. Экспрессия CD39 и CD73 на интерстициальных клетках при кальцинозе аортального клапана. *Российский иммунологический журнал.* 2017;11(2,20):287–289].
39. Golovkin AS, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, et al. Calcification of the aortic valve: subpopulation composition of circulating T cells and purinergic regulation. *Russian Journal of Immunology.* 2016;10(2, 1):189–191. In Russian [Головкин А.С., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К. и др. Кальциноз аортального клапана: субпопуляционный состав циркулирующих Т-клеток и пуринергическая регуляция. *Российский иммунологический журнал.* 2016;10(2, 1):189–191].
40. New SPE, Aikawa E. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ J.* 2011;75(6):1305–1313. DOI: 10.1253/circj.cj-11-0395.
41. Osman L, Yacoub MH, Latif N, et al. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I547–552. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115.
42. Cawley PJ, Otto CM. Prevention of calcific aortic valve stenosis – fact or fiction? *Ann Med.* 2009;41(2):100–108. DOI: 10.1080/07853890802331394.
43. Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(1):H5–15. DOI: 10.1152/ajpheart.00824.2009.
44. Innasimuthu AL, Katz WE. Effect of bisphosphonates on the progression of degenerative aortic stenosis. *Echocardiography.* 2011;28(1):1–7. DOI: 10.1111/j.1540-8175.2010.01256.x.
45. Aksoy O, Cam A, Goel SS, et al. Do bisphosphonates slow the progression of aortic stenosis? *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(16):1452–1459. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.01.024.
46. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Denosumab could be a potential inhibitor of valvular interstitial cells calcification in vitro. *Int J Cardiovasc Res.*

2016;5(1):10.4172/2324-8602.1000249.
DOI: 10.4172/2324-8602.1000249.

47. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.

48. Brandenburg VM, Reinartz S, Kaesler N, et al. Slower progress of aortic valve calcification with vitamin K supplementation. *Circulation.* 2017;135(21):2081–2083. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.027011.

49. Parra-Izquierdo I, Castaños-Mollor I, López J, et al. Lipopolysaccharide and interferon- β team up to activate HIF-1 β via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(9):2168–2179. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.04.014.

50. Blaser MC, Kraler S, Luscher TF, et al. Multi-omics approaches to define calcific aortic valve disease pathogenesis. *Circ Res.* 2021;128(9):1371–1397. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317979.

51. Surendan A, Edel A, Chandran M, et al. Metabolomic signature of human aortic valve stenosis. *JACC Basic Transl Sci.* 2020;5(12):1163–1177. DOI: 10.1016/j.jacbs.2020.10.001.

52. Baek D, Villen J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output. *Nature.* 2008;455(7209):64–71. DOI: 10.1038/nature07242.

53. Khudiakov AA, Smolina NA, Perepelina KI, et al. Extracellular micrornas and mitochondrial DNA as potential biomarkers of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Biochemistry (Moscow).* 2019;84(3):272–282. In Russian [Худяков А.А., Смолина Н.А., Перепелина К.И. и др. Внеклеточные микроРНК и митохондриальная ДНК как потенциальные биомаркеры аритмогенной кардиомиопатии. *Биохимия.* 2019;84(3):392–403].

54. Toshima T, Watanabe T, Narumi T, et al. Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signalling. *Cardiovasc Res.* 2020;116(5):983–994. DOI: 10.1093/cvr/cvz210.

55. Theodoris CV, Zhou P, Liu L, et al. Network-based screen in iPSC-derived cells reveals therapeutic candidate for heart valve disease. *Science.* 2021;371(6530):eabd0724. DOI: 10.1126/science.abd0724.

Информация об авторах:

Шишкова Анастасия Алексеевна, врач-кардиолог кардиологического отделения клинко-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Лобов Арсений Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомеди-

цины ИНЦ РАН, научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Докшин Павел Михайлович, младший научный сотрудник НИЛ молекулярной кардиологии и генетики, ассистент кафедры биологии факультета биомедицинских наук ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Боярская Надежда Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины ИНЦ РАН, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Качанова Ольга Сергеевна, лаборант-исследователь НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., заведующий НИЛ молекулярной кардиологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, руководитель лаборатории регенеративной биомедицины ИНЦ РАН, старший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины».

MODERN APPROACHES TO THE SEARCH FOR DRUG THERAPY FOR AORTIC VALVE CALCIFICATION

**Shishkova A. A.^{1,3}, Lobov A. A.^{2,3}, Dokshin P. M.^{1,3}, Boyarskaya N. V.^{2,3},
Kachanova O. S.³, Malashicheva A. B.^{1,2,3}**

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Shishkova Anastasiia A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: anastasiia.shishkova@mail.ru

Received 17 September 2021; accepted
29 October 2021.

ABSTRACT

Calcific aortic valve stenosis is the most common valvular heart disease. No medical therapies are proven to be effective in holding or reducing disease progression. Therefore, aortic valve replacement remains the only available treatment option. This study discusses the application of multi-omics approaches, proteomics, epigenomics, transcriptomics to the study of valvular heart disease and how these emerging insights might translate into potential novel treatments. Moreover, a machine learning approach that could identify small molecules that correct gene networks seems to shed new light on the pathogenesis of calcification.

Key words: aortic valve calcification, aortic valve stenosis, metabolomics, microRNA, multi-omics approaches, proteomics, transcriptomics.

For citation: Shishkova AA, Lobov AA, Dokshin PM, et al. Modern approaches to the search for drug therapy for aortic valve calcification. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):118-135.

LIST OF ABBREVIATIONS:

AS — aortic stenosis,

ACEi — inhibitors of angiotensin-converting enzyme

INTRODUCTION

Over the past few decades, significant changes have occurred in the structure of valvular heart defects, which are characterized by a decrease in the frequency of heart defects of rheumatic etiology and an increase in the prevalence of sclerodegenerative lesions of the valves. The increase in the life expectancy of the population and the improvement of medical technologies has led to the fact that aortic stenosis (AS) is recognized the most common valvular heart disease today. The frequency of detection of AS among persons aged 65 years is about 25%, and after reaching the age of 75 years it increases to 48%, although among persons under the age of 65 it is only 4-5% [1]. To date, there is no drug therapy that can stop the progression of aortic stenosis, so the only radical method is still aortic valve replacement. However, taking into account the life expectancy of the population, accompanied by an annual increase in the number of patients with degenerative aortic stenosis, it becomes obvious that there is a need to actively search for potential targets for therapeutic effects on the processes of calcification of the aortic valve. This review is devoted to the current state of research aimed at finding drug therapy for aortic valve calcification, including the multiomics approach, the achievement of proteomics, genomics and transcriptomics. This approach allows, firstly, to take a more comprehensive look at the problem, and secondly, to identify key points in the process of valve calcification which is necessary for the search and testing of chemical calcification inhibitors.

MACRO- AND MICROSTRUCTURE OF THE AORTIC VALVE

1.1 Tricuspid aortic valve

The aortic valve is part of the aortic root. Most often, the aortic valve consists of three cusps (called depending on their location): the left semilunar (coronary) cusp, the right semilunar (coronary) cusp and the posterior (non-coronary) cusp of the aortic valve [2, 3]. The cusps are thin (1 mm), flexible, avascular structures consisting of three layers: ventricular (*ventricularis*), aortic (*fibrosa*) and spongy (*spongiosa*) [4]. On the aortic and ventricular sides, the valves are covered with a monolayer of endothelial cells. It has been proved that endothelial cells of the aortic valve differ from endothelial cells lining arteries and veins in their ability to

respond to changes in hemodynamics, which confirms their unique morphology [4, 5]. The spongy *spongiosa* layer contains a large amount of glycosaminoglycans and proteoglycans. Between all extracellular components in three layers there are interstitial valve cells. VIC are necessary to maintain valve function and homeostasis through proliferation, secretion of matrix metalloproteinases and extracellular matrix components. VIC is a heterogeneous group of cells with unique characteristics. In the aortic valves of adults, VIC are predominantly represented by fibroblasts ("silent cells"), only 2-5% of interstitial cells are in the activated state normally. Their phenotype normally changes with age and when environmental conditions change (for example, sudden changes in blood pressure) [5]. Interstitial cells of the aortic valve are the basis of pathological differentiation either into osteoblast-like cells or into myofibroblasts. The interaction of cells with each other plays a significant role in determining the differentiation of cells. Endothelial and interstitial cells must interact with each other to ensure proper development and homeostasis in the valve. It seems that the disruption of this interaction may contribute to the development of valve pathology. Apparently, in the proper functioning of the community of these cells lies the mechanism of maintaining the integrity of the aortic valve. Imbalance between these cells may, apparently, lead to impaired differentiation and changes in the valve, in particular to calcification [6, 7].

1.2 Bicuspid aortic valve

Bicuspid aortic valve is a widespread variant of valve development, which occurs in 2% of the population with a ratio between men and women of 4:1 [8, 9]. Morphologically, the bicuspid aortic valve consists of 2 cusps, which can be either of the same or unequal size (the difference can reach 1.5-2 times). In people with a bicuspid aortic valve, the manifestation of aortic stenosis usually occurs 20 years earlier than in people with a tricuspid valve, and by the age of 45, more than half of people with a bicuspid valve have a pronounced aortic stenosis.

MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF AORTIC STENOSIS DEVELOPMENT

The main cause of AS development remains calcification of the initially normal tricuspid or congenital bicuspid aortic valve. The early formation of AS was considered as a passive degenerative process as a result of mechanical wear of the cusps in the sixth and seventh decades of life or as an atherosclerotic process, taking into account the connection with traditional risk

factors such as hypertension, diabetes mellitus, smoking, high cholesterol level [10, 11]. However, attempts to use standard approaches aimed at suppressing the processes of atherogenesis did not lead to a restraint in the rate of progression of AS.

During the formation of aortic stenosis, it is customary to distinguish 3 stages: the first is caused by inflammatory changes in the valve, the second by the development of fibrosis, the third by the formation of calcification of the aortic valve. In turn, in the process of development of calcification of the aortic valve, it is also customary to distinguish several stages: aortic sclerosis (mild calcification stage) — sealing and thickening of the valve cusps with local calcification areas, without commissures being fused and without pronounced obstruction of the left ventricular outflow tract. In the future, aortic sclerosis may pass into the stage of moderate calcification and, finally, into the third stage — severe calcification of the valves, accompanied by obstruction of the left ventricular outflow tract [12, 13].

Currently, it has been proven that calcification of the aortic valve is an active process, the molecular and cellular mechanisms of which are poorly understood [14]. It has been shown that calcification and ossification regulators, such as osteopontin, osteonectin, osteocalcin and bone protein *BMP* (*bone morphogenetic protein*), are involved in the calcification process. Osteoprotegerin and its ligand (*RANKL* — *receptor activated of nuclear factor- κ B ligand*) are also involved in valve calcification. The *RANK* — *RANKL* — *OPG* (osteoprotegerin) signaling chain is controlled by *RUNX2*, which is controlled by the Notch signaling pathway [14-24]. The spectrum of action of the Notch signaling pathway affects a large number of different genes, including genes responsible for differentiation and proliferation. It is known that the mutation of the *NOTCH1* gene is associated with calcification of the aortic valve. It is important that the results of preclinical studies have shown that specific blocking of the Notch signaling pathway significantly suppresses calcification of the vessel and aortic valve [25-29]. It has been shown that normally *NOTCH1* inhibits the activation of *Runx2*, thereby blocking calcium deposits on the valve. Mutations in the *NOTCH1* gene lead to the activation (derepression) of *RUNX2*, thus leading to the differentiation of interstitial cells into osteoblasts [30-32].

Aortic stenosis is a complex, multifactorial disease [33]. Among the components that affect the development of aortic stenosis are the following factors: renin-angiotensin-aldosterone system, the influence of the sympathetic nervous system [34], lipid accumulation, osteogenesis, myofibrogenesis, biosynthesis and aggregation of extracellular vesicles, platelet activation, osteochondrogenesis [35], cellular aging, disorganization of the intercellular matrix by metalloproteinases,

inflammatory elements (macrophages, T-cells lymphocytes, mast cells and molecules characteristic of typical inflammation, such as IL-2, HLA-DR, TNF alpha) [36-40], endothelial dysfunction, impaired phosphate processing [26, 27, 33]. To date, with the development of severe aortic stenosis in a patient, either aortic valve replacement or transcatheter aortic valve implantation remain the only method of treatment. These surgical interventions are associated with a high risk of complications, technical nuances, moreover, in our country their implementation is possible only in large specialized cardiac centers. The high cost of these surgical interventions is certainly a burden on the healthcare system. Taking into account the tendency to aging of the population and the increase in the number of patients with sclerodegenerative aortic stenosis, there is an obvious urgent need for chemical inhibition of calcification processes, which will avoid or delay surgical intervention. The lack of drug therapy is largely due to problems in studying the pathogenesis of this disease.

THERAPEUTIC TARGETS

1.3. Statins

There is a large number of studies dedicated to the effect of statins on the development of aortic stenosis. It has been shown that oxidized lipoproteins, apo A, apo B and apo E lipoproteins, macrophages, T-lymphocytes, foam cells, growth factors and proinflammatory cytokines, which are involved in the initiation of the pathological process, are present in the stenotic valve. At the same time, not only the hypolipidemic properties of statins, but also their pleiotropic effects are well known [41].

However, one of the largest studies, SEAS (Simvastatin and Ezetimib in Aortic Stenosis), did not confirm the ability of statins to restrain the progression of AS. The report on this study, published on July 21, 2008, clearly states that there are no differences in either primary (death, aortic valve replacement, decompensation of chronic heart failure, stroke, myocardial infarction and unstable angina) or secondary (progression of stenosis, assessed by EchoCG criteria) efficacy points between groups taking medications and placebo [42, 43]. Small retrospective studies were conducted evaluating the relationship between the intake of biphosphonates and slowing the progression of aortic stenosis. However, further detailed studies did not reveal a positive effect of drugs on the rate of progression [44, 45].

1.4. RANK/RANKL inhibitors

Interstitial cells of the aortic valve differentiate into osteoblast-like cells by activating the kappa-beta nuclear factor receptor (*RANK* — receptor activator of

nuclear factor kappa-B). During osteoblastic differentiation, alkaline phosphatase, osteopontin, metalloproteinases, Runx2 and bone protein BMP (*bone morphogenetic protein*) significantly increase. RANKL is a transmembrane glycoprotein, a cytokine of the tumor necrosis factor family, produced by osteoblastic cells and activated T-lymphocytes, which, by binding to the RANK receptor, sends a signal for the differentiation of progenitor cells and the maturation of osteoclasts.

Osteoprotegerin also belongs to the cytokines of the superfamily of tumor necrosis factor and is produced by osteoblasts. As a receptor to RANKL, it blocks its interaction with its own receptor RANK, preventing osteoclastogenesis. RANKL in the aortic valve tissues promotes the transition of myofibroblasts to osteoblasts. Denosumab is a human monoclonal antibody (IgG2) created to bind the RANKL receptor (to prevent joining of RANKL and RANK), thereby mimicking the effect of osteoprotegerin. Denosumab is used in the treatment of osteoporosis, multiple myeloma and other conditions accompanied by bone resorption. To date, a study has not been completed to assess the effectiveness of taking denosumab in order to inhibit the progression of AS (SALTIRE II). However, the results of a study conducted on pig interstitial cells have been published, showing that denosumab is able to partially block calcification [46].

1.5 Angiotensin converting enzyme inhibitors

There are several works that have studied the effect of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE inhibitors) on the stenosis process, as it has been proven that ACE, angiotensin II and angiotensin II type I receptors are present in calcified valves. Angiotensin II potentiates inflammation, accumulation of lipoproteins, oxidative stress and stimulates the expression of lipoprotein-binding proteoglycans and biglycans by fibroblasts. Angiotensin II receptors are present on stenotic valve fibroblasts. Angiotensin II type I receptors, constantly expressed smooth muscle cells, appear on the interstitial cells of the valve only when stenosis begins. Thus, until the moment when the cells begin to express type I angiotensin II receptors, the valve is protected from the effects of angiotensin II. Based on the fact that the pro-inflammatory and profibrogenic features of angiotensin II are known, attempts have been made to block the process of stenosis by taking ACE inhibitors. It has been proved that ACE inhibitors have an antiproliferative effect (reduce hypertrophy of vascular and myocardial walls and proliferation of extracellular matrix), improve endothelial function (enhance the production of NO), inhibit the progression of atherosclerosis (since they block the formation of angiotensin and lead to an increase in the level of bradykinin and NO,

which, in turn, leads to suppression of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells, taxis and activation of inflammatory cells, decrease of oxidative stress and improvement of endothelial function). Retrospective analysis showed that ACE inhibitors somewhat slow down calcium deposits on the valves, but do not prevent the progression of stenosis. It is quite difficult to prove the effect of ACE inhibitors on the stenosis process, since ACE inhibitors alter intracardiac hemodynamics, which probably masks all other effects of drugs [47].

1.6. Vitamin K

To date, the effect of vitamin K on the process of calcification of the aortic valve is also being studied. Vitamin K is a fat-soluble vitamin that exists in 2 forms: vitamin K1 (phyloquinone) and vitamin K2 (menaquinone). Vitamin K2 is involved in the processes of inhibition of arterial calcification through the maintenance of matrix Gla protein carboxylation processes. The carboxylation process is necessary to maintain optimal absorption of calcium by the cell. It is known that a sufficient amount of vitamin K is required for optimal performance and posttranslational carboxylation of matrix Gla protein. Thus, it has been suggested that sufficient intake of vitamin K may prevent the progression of aortic stenosis. In the only small randomized study (a group of 38 people), it was shown that taking vitamin K can slow the progression of AS. However, given the short follow-up period (1 year), such a small group of patients obviously requires further, more in-depth study of this fact [48].

Taking into account the complexity of the components of the pathogenesis of aortic stenosis, ACE inhibitors, statins, vitamin K, bisphosphonates, etc. were studied to inhibit calcification processes. However, either most drugs did not prove their effectiveness in restraining the rate of development of aortic stenosis, or further study of the drug with a larger sample of patients or prospective follow-up is required.

PROSPECTS FOR STUDYING THE CALCIFICATION PROCESS AND SEARCHING FOR A NEW THERAPY TARGET

To date, the target is being actively pursued, the impact on which will inhibit or slow down calcification. There is an assumption that calcification has different mechanisms in women and in men. In men, interstitial cells go into osteodifferentiation, and in women into myofibroblastic differentiation [49]. Perhaps this will explain the effectiveness of various drugs for containing the calcification process.

Various laboratories have carried out many studies and experiments on cultures of interstitial and endothelial cells of the valve of humans, pigs, sheep, rats and mice. Of course, for accurate verification, it is preferable to work with human cells, but this is far from always being possible due to technical difficulties in taking material from operating rooms and cultivating these cells. The cultivation of cells in three-dimensional space with the reproduction of the biomechanics of valve behavior (simulating blood flow on the valve) is a promising focus area today.

Previously, it has been repeatedly shown that a significant change in the expression level of a number of genes of the Notch signaling pathway and other signaling pathways in cells from patients with bicuspid and tricuspid valves plays an important role in the development of aortic stenosis [22]. However, it has now become clear that analyzing the expression level of several genes is only a superficial and one-sided view of the problem.

Today, the “omics” approach to the study of the pathogenesis of aortic valve calcification is relevant. It is customary to refer to technologies that use methods of genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, that is, sciences that study how the genome is made, how the information encoded in it is realized and how it is converted into the structure of proteins and later into some signs of the organism. Unlike genes and proteins, which are predisposed to epigenetic and posttranslational changes, metabolites give a true idea of cellular activity [50]. The metabolomic analysis of the affected valve provides “molecular” information about metabolites and metabolic pathways that are active at different stages of the calcification process.

However, it must be understood that the detection of only metabolites circulating in the blood can serve as a marker for diagnosing and detecting the severity of stenosis. One of the candidates for the role of a disease marker is lysophosphatidic acid. It has been shown that the level of lysophosphatidic acid is significantly

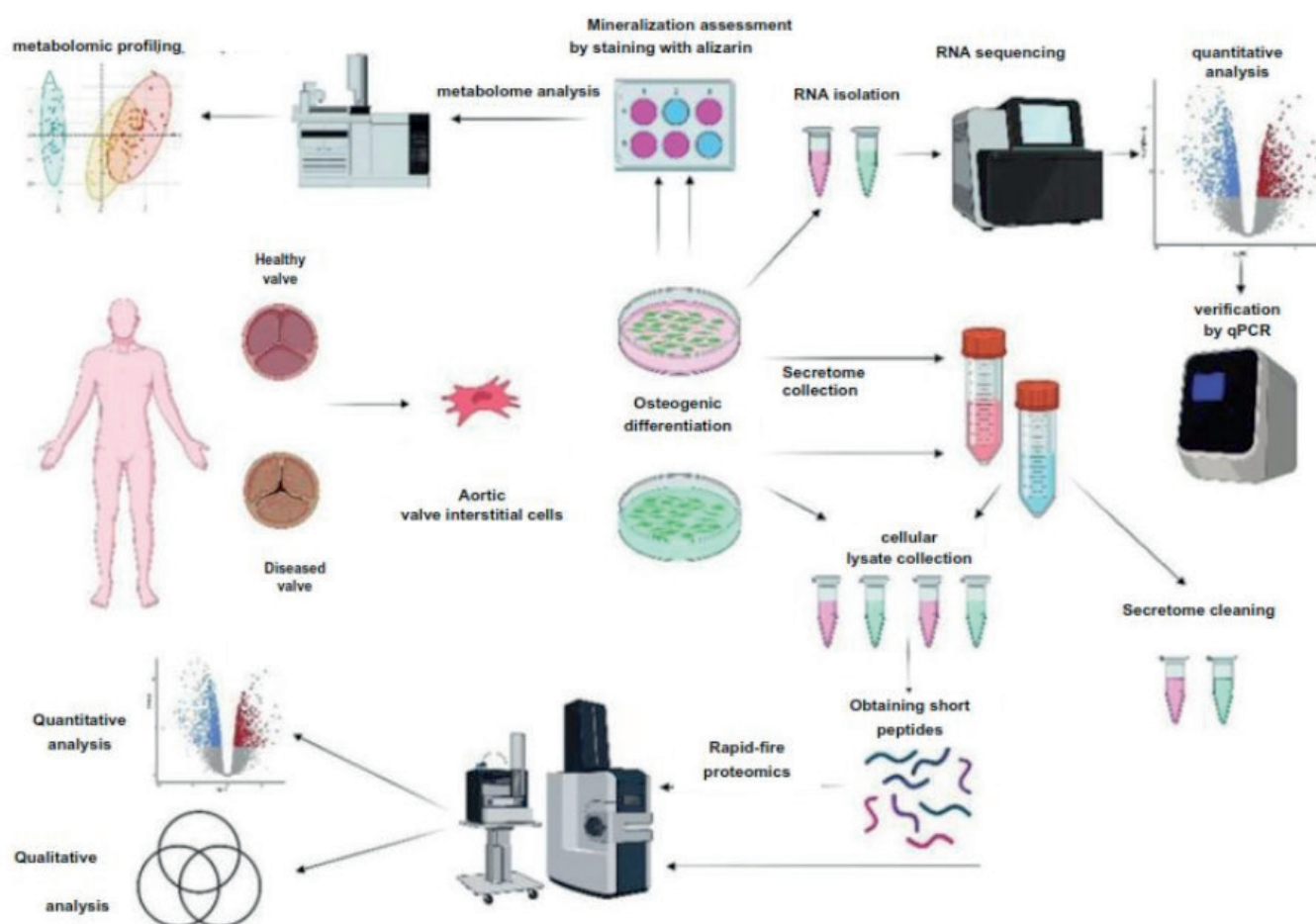


Fig. 1. The multiomics approach to the study of the pathogenesis of calcification: obtaining cell cultures from the human aortic valve, osteogenic differentiation, analysis of transcriptome/ proteome/ metabolome/ secretome

increased in blood serum in patients with rapidly progressing AS, in contrast to patients with slowly progressing disease. Nevertheless, the integration of multiomics data in the aortic valve should be approached with caution due to the low density of valve cells [51].

Studying the role of microRNAs in the process of valve calcification looks promising [52]. MicroRNAs are regulators of many genes at the translational level. Each microRNA regulates many transcripts. There are studies that have shown that microRNA inhibitors can suppress calcification of the aortic valve. A group of scientists led by T. Tashima has demonstrated that microRNA34a potentiates calcium deposition in the valve cusp by acting on the Notch-Runx2 signaling pathway, and that inhibition of this microRNA significantly suppressed calcification (myofibrogenesis) in interstitial valve cells in comparison with the control [53–54].

Today, the approaches of “network medicine” are in great demand, when a large amount of transcriptomic, proteomic and other data is integrated and used for prioritization, that is, highlighting key interactions that are important in the development of a particular pathology [50]. A group of scientists, including specialists from the Almazov National Medical Research Centre completed a work aimed at finding potential targets for inhibiting calcification processes during the development of aortic stenosis. A machine learning approach was used to find molecules capable of normalizing the genotype of a cell with a mutation in the *NOTCH1* gene. The study was performed on the model of induced pluripotent cells, which deprives the study of the effect of subjectivity when working with cell lines isolated from the affected valve. About 1500 potential molecules were analyzed, and only one substance, XCT 790, completely led to the complex normalization of the genetic network of endothelial cells. XCT 790 is a reverse agonist of the orphan nuclear receptor ERRα involved in WNT signaling. Moreover, administration of XCT 790 to mice significantly reduced the percentage of cells expressing RUNX2, which means a weakening of osteogenesis processes in the valve [55].

Currently, the research laboratory of diseases with excessive calcification of the world-class Scientific Centre “Centre for Personalized Medicine” of the Almazov National Medical Research Centre is conducting an active research aimed at finding therapeutic agents that can prevent pathological calcification — in particular, using multiomics approaches — to analyze the pathological osteogenic differentiation/calcification of interstitial cells of the aortic valve (Fig. 1).

Today, the search for targeted therapy is about creating a detailed molecular portrait of the affected and healthy valve. And only an understanding of the key and secondary fundamental cellular and molecular

mechanisms involved in the development of calcification can shed light on understanding the problem.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bernard L, Delgado V, Rosenhek R, et al. Contemporary presentation and management of valvular heart disease the EURObservational research programme valvular heart disease II survey. *Circulation*. 2019;140(14):1156–1169. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041080.
2. Orlovskii PI, Gritsenko VV, Yukhnev AD, et al. Artificial heart valves. SPb.: ZAO «OLMA Media GrupP». 2007. S. 9–21. In Russian [Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д. и др. Искусственные клапаны сердца. СПб.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп». 2007. С. 9–21].
3. Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1421–1436. DOI: 10.1098/rtsb.2007.2125.
4. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4–5):242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.
5. Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annual Rev Pathol*. 2012;7:161–183. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130257.
6. Malashicheva A, Kostina A, Kostareva A, et al. Notch signaling in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysms: a bridge between embryonic and adult states. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(3):165631. DOI:10.1016/j.bbdis.2019.165631.
7. Aquila G, Kostina A, Viecei Dalla Sega F, et al. The Notch pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases? Expert opinion on therapeutic targets. 2019;23:695–710. DOI: 10.1080/14728222.2019.1641198.
8. Rajamannan NM. Bicuspid aortic valve disease: the role of oxidative stress in Lrp5 bone formation. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(3):168–176. DOI: 10.1016/j.carpath.2010.11.007.
9. Abdulkareem N, Smelt J, Jahangiri M. Bicuspid aortic valve aortopathy: genetics, pathophysiology and medical therapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17(3):554–559. DOI: 10.1093/icvts/ivt196.
10. Yetkin E., Waltensberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2009;135(1):4–13. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.03.108.
11. Irtuga OB, Zhiduleva EV, Murtazaliev PP, et al. Pathogenetic mechanisms of the development of aortic valve calcification: a clinician's view. *Translational medicine*. 2015;34–44. In Russian [Иртюга О.Б., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.П. и др. Патогенетические механизмы раз-

вития кальциноза аортального клапана: взгляд клинициста. Трансляционная медицина. 2015;34–44].

12. Guarray M, Mohler III ER. Models of Aortic Valve Calcification J Invest Med. 2007;55(6):278–283. DOI: 10.2310/6650.2007.00012.

13. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, et al. Association aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. N Engl J Med. 1999;341(3):142–147. DOI: 10.1056/NEJM199907153410302.

14. Ferrari R, Rizzo P. The Notch pathway: a novel target for myocardial remodeling therapy? Eur Heart J. 2014;35(32):2140–2145. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu244.

15. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, et al. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease J Mol Med (Berl). 2009;87(1):17–24. DOI: 10.1007/s00109-008-0400-9.

16. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. Development. 2004;131(5):965–973. DOI: 10.1242/dev.01074.

17. Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293(1):C1–11. DOI: 10.1152/ajpcell.00415.2006.

18. Mathieu P, Boulanger M-C, Bouchareb R. Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2014;12(7):851–862. DOI: 10.1586/14779072.2014.923756.

19. Zhou X.L., Liu J.C. Role of Notch signaling in the mammalian heart. Braz J Med Biol Res. 2014;47(1):1–10. DOI: 10.1590/1414-431X20133177.

20. Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, et al. Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(27):E1868–1877. DOI: 10.1073/pnas.1116889109.

21. Garg V. Molecular genetics of aortic valve disease. Curr Opin Cardiol. 2006;21(3):180–184. DOI: 10.1097/01.hco.0000221578.18254.70.

22. Kostina A, Shishkova A, Ignatieva E, et al. Different Notch signaling in cells from bicuspid and tricuspid aortic valves. J Mol Cell Cardiol. 2018;114:211–219. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.009.

23. Shishkova AA, Rutkovskii AV, Irtyuga OB, et al. Molecular cell mechanisms of aortic valve calcification. Translational medicine. 2015:45–52. In Russian [Шишкова А.А., Рутковский А.В., Иртюга О.Б. и др. Молекулярно-клеточные механизмы кальцификации аортального клапана. Трансляционная медицина. 2015:45–52].

24. Acharya A, Hans CP, Koenig SN, et al. Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. PLoS One. 2011;6(11):e27743. DOI: 10.1371/journal.pone.0027743.

25. Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy Cardiol Clin. 2020;38(1):1–12. DOI: 10.1016/j.ccl.2019.09.010.

26. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis: Methods, Models and Mechanisms.

Circ Res. 2011;108(11):1392–1412. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234138.

27. Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart. Eur Heart J. 2018;39(28):2618–2624. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx653.

28. Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in aortic stenosis. The skeleton key. J Am Coll Cardiol. 2015;66(5):561–577. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.05.066.

29. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, et al. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. J Mol Med (Berl). 2009;87(1):17–24. DOI: 10.1007/s00109-008-0400-9.

30. Zhiduleva EV, Irtyuga OB, Shishkova AA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017;164(9):356–360. In Russian [Жидулева Е.В., Иртюга О.Б., Шишкова А.А. и др. Клеточные механизмы кальцификации аортального клапана. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017;164(9):356–360].

31. Irtyuga OB, Zhiduleva EV, Murtazaliev PM, et al. The role of osteoprotegerin system/RANKL/RANK in pathogenesis of aortic stenosis. Russian Journal of Cardiology. 2018;2(154):39–43. In Russian [Иртюга О.Б., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М. и др. Роль системы остеопротегерина/RANKL/RANK в патогенезе аортального стеноза. Российский кардиологический журнал. 2018;2(154):39–43].

32. Kostina DA, Uspensky VE, Semenova DS, et al. Role of calcification in aortic degeneration. Translational Medicine. 2020;7(1):6–21. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21. In Russian [Костина Д.А., Успенский В.Е., Семенова Д.С. и др. Молекулярные механизмы сосудистой кальцификации. Трансляционная медицина. 2020;7(1):6–21].

33. Mohler ER. Mechanisms of aortic valve calcification. Am J Cardiol. 2004;94(11):1396–1402, A6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.08.013.

34. Osman L, Chester AH, Sarathchandra P, et al. A novel role of the sympatho-adrenergic system in regulating valve calcification. Circulation. 2007;116(11 Suppl):I282–7. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681072.

35. Shin V, Zebboudi AF, Bostrom K. Endothelial Cells Modulate Osteogenesis in Calcifying Vascular Cells. J Vasc Res. 2004;41(2):193–201. DOI: 10.1159/000077394.

36. Venardos N, Nadlonek NA, Zhan Q, et al. Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. J Surg Res. 2014;190(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jss.2014.03.051.

37. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. Curr Opin Lipidol. 2007;18(5):483–491. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3282a66099.

38. Golovkin AS, Zhiduleva EV, Shishkova AA, et al. CD39 and CD73 expression in interstitial cells of calcified aortic stenosis. Russian Journal of Immunology. 2017;11(2):287–289. In Russian [Головкин А.С., Жидулева Е.В., Шишкова А.А. и др. Экспрессия CD39 и CD73

на интерстициальных клетках при кальцинозе аортального клапана. Российский иммунологический журнал. 2017;11(2,20):287–289].

39. Golovkin AS, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, et al. Calcification of the aortic valve: subpopulation composition of circulating T cells and purinergic regulation. Russian Journal of Immunology. 2016;10(2, 1):189–191. In Russian [Головкин А.С., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К. и др. Кальциноз аортального клапана: субпопуляционный состав циркулирующих Т-клеток и пуринергическая регуляция. Российский иммунологический журнал. 2016;10(2, 1):189–191].

40. New SPE, Aikawa E. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. Circ J. 2011;75(6):1305–1313. DOI: 10.1253/circj.cj-11-0395.

41. Osman L, Yacoub MH, Latif N, et al. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. Circulation. 2006;114(1 Suppl):1547–552. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115.

42. Cawley PJ, Otto CM. Prevention of calcific aortic valve stenosis – fact or fiction? Ann Med. 2009;41(2):100–108. DOI: 10.1080/07853890802331394.

43. Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;298(1):H5–15. DOI: 10.1152/ajpheart.00824.2009.

44. Innasimuthu AL, Katz WE. Effect of bisphosphonates on the progression of degenerative aortic stenosis. Echocardiography. 2011;28(1):1–7. DOI: 10.1111/j.1540-8175.2010.01256.x.

45. Aksoy O, Cam A, Goel SS, et al. Do bisphosphonates slow the progression of aortic stenosis? J Am Coll Cardiol. 2012;59(16):1452–1459. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.01.024.

46. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Denosumab could be a potential inhibitor of valvular interstitial cells calcification in vitro. Int J Cardiovasc Res. 2016;5(1):10.4172/2324-8602.1000249. DOI: 10.4172/2324-8602.1000249.

47. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(4-5):242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.

48. Brandenburg VM, Reinartz S, Kaesler N, et al. Slower progress of aortic valve calcification with vitamin K supplementation. Circulation. 2017;135(21):2081–2083. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.027011.

49. Parra-Izquierdo I, Castaños-Mollor I, López J, et al. Lipopolysaccharide and interferon- β team up to activate HIF-1 β via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(9):2168–2179. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.04.014.

50. Blaser MC, Kraler S, Luscher TF, et al. Multi-omics approaches to define calcific aortic valve disease pathogenesis. Circ Res. 2021;128(9):1371–1397. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317979.

51. Surendan A, Edel A, Chandran M, et al. Metabolomic signature of human aortic valve stenosis. JACC Basic Transl Sci. 2020;5(12):1163–1177. DOI: 10.1016/j.jacbts.2020.10.001.

52. Baek D, Villen J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output. Nature. 2008;455(7209):64–71. DOI: 10.1038/nature07242.

53. Khudiakov AA, Smolina NA, Perepelina KI, et al. Extracellular micrornas and mitochondrial DNA as potential biomarkers of arrhythmogenic cardiomyopathy. Biochemistry (Moscow). 2019;84(3):272–282. In Russian [Худяков А.А., Смолина Н.А., Перепелина К.И. и др. Внеклеточные микроРНК и митохондриальная ДНК как потенциальные биомаркеры аритмогенной кардиомиопатии. Биохимия. 2019;84(3):392–403].

54. Toshima T, Watanabe T, Narumi T, et al. Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signalling. Cardiovasc Res. 2020;116(5):983–994. DOI: 10.1093/cvr/cvz210.

55. Theodoris CV, Zhou P, Liu L, et al. Network-based screen in iPSC-derived cells reveals therapeutic candidate for heart valve disease. Science. 2021;371(6530):eabd0724. DOI: 10.1126/science.abd0724.

Author information:

Shishkova Anastasia A., Cardiologist of the Cardiology Department of the Clinical Diagnostic Center of the Almazov National Medical Research Centre; Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Lobov Arseniy A., Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine of the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Dokshin Pavel M., Junior Researcher, Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, Assistant of the Department of Biology, Faculty of Biomedical Sciences of the Almazov National Medical Research Centre; Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases, National Center for Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Boyarskaya Nadezhda V., Junior Researcher, Laboratory of Biomedicine Regeneration of the

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Junior Researcher, Research Institute of Mechanical Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Kachanova Olga S., Research Assistant, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Malashicheva Anna B., Dr. Sc., Head of the Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics of the Almazov National Medical Research Centre; Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine of the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Senior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 575.1

ИЗУЧЕНИЕ ВРОЖДЕННЫХ РИСКОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ГЕНЕТИКИ

Артемов Н. Н.^{1, 2, 3, 4, 5}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт Броуда, Кембридж, США

⁵Массачусетская больница общего профиля, Бостон, США

Контактная информация:

Артемов Никита Николаевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: artemov_nn@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
03.09.2021 и принята к печати
25.10.2021.

РЕЗЮМЕ

Обширный объем накопленных геномных данных за последние годы сделал возможным переход от ассоциативных исследований, направленных на поиск новых генов риска, к интерпретации индивидуальных рисков и прогнозу.

В данном обзоре рассмотрены ключевые этапы развития вычислительной биологии, а также основные принципы и ограничения методов прогнозирования рисков моногенных и полигенных наследственных заболеваний.

Ключевые слова: GWAS, биоинформатика, врожденные риски, вычислительная биология, генетика, история науки.

Для цитирования: Артемов Н.Н. Изучение врожденных рисков заболеваний с помощью методов вычислительной генетики. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):136-145.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящий момент массив накопленных геномных данных начинает становиться достаточным не только для понимания молекулярных причин заболеваний, но и для оценки индивидуальных врожденных рисков. Таким образом, происходит переход к прогнозированию заболеваний и персонализации медицинских вмешательств, особенно в сфере превентивной медицины.

Использование вычислительных методов в биологии открыло возможности для развития целой отрасли исследований — биоинформатики. Разработка методов для эффективной работы с массивами геномных и клинических данных — ключ для извлечения максимальной практической пользы из фундаментальных генетических исследований.

В данном обзоре представлена краткая история развития вычислительной биологии и текущее состояние научной области, посвященной оценке врожденных рисков заболеваний.

РАЗВИТИЕ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

19 сентября 1957 года Френсис Крик обозначил ключевые идеи о функции генов. В частности, сформулировал так называемую «центральную догму» молекулярной биологии, утверждающую, что генетическая информация может передаваться от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении [1, 2].

Несмотря на ключевую роль ДНК в качестве носителя генетической информации, возможность установить последовательность аминокислот в белке появилась значительно раньше, чем методы секвенирования нуклеиновых кислот. К примеру, секвенирование Эдмана, ставшее доступным в 1949 году благодаря автоматизации, в последующее десятилетие позволило получить последовательности более 15 семейств белков [3]. Одно из важных ограничений метода Эдмана — невозможность секвенировать более 50–60 аминокислот за один раунд [4]. Для секвенирования белков, состоящих из большого количества аминокислот, их необходимо было предварительно фрагментировать.

Таким образом, основной проблемой стал не сам процесс секвенирования, а сборка последовательности аминокислот в белке, исходя из сотен небольших полипептидов, секвенированных с помощью метода Эдмана. Данная задача дала основной толчок для появления биоинформатики. Задача сборки последовательности больших белков оказалась чрезвычайно сложной для аналитического реше-

ния. Это привело к тому, что в начале 1960-х годов была создана первая биоинформатическая программа, которая позволяла автоматически решать данную задачу [2].

Маргарет Дейхофф (англ. Margaret Dayhoff) и Роберт С. Ледли (англ. Robert S. Ledley), считающиеся прародителями современной вычислительной биологии, в 1962 году создали COMPROTEIN — первую компьютерную программу, записанную на перфокартах, которая решала задачу, актуальную и в настоящее время, *de novo* сборку секвенированной последовательности [5]. Стоит отметить, что внедрение программных решений и существовавшие ограничения производительности вычислительной техники привели к нововведениям, которые мы используем и сейчас, говоря о белковых последовательностях. Так, из-за сложности хранения трехбуквенных названий аминокислот в памяти компьютеров того времени Маргарет Дейхофф предложила современную однобуквенную кодировку аминокислот [6]. Вслед за COMPROTEIN применение вычислительных методов для анализа аминокислотных замен и последовательностей дало значительный толчок к развитию биоинформатики.

К 1970-м годам стало очевидно, что секвенирование отдельных белков является неэффективным, так как требует выделения и очистки каждого белка в отдельности, в то время как секвенирование ДНК позволит определить аминокислотную последовательность всех белков одновременно. Появление секвенирования Максама-Гилберта [7] и Сангера [8] привело к тому, что поиск генов и изучение влияния мутаций в ДНК на возникновение заболеваний стали одним из основных направлений в биологии.

Первые попытки обнаружить положение генов в ДНК и связать мутации с риском заболевания начались задолго до начала проекта «Геном человека». Джеймс Гузелла (англ. James Gusella), Ненси Векслер (англ. Nancy Wexler) и коллеги в 1976–1983 годах, в ходе изучения болезни Хантингтона — редкого моногенного заболевания с аутосомным доминантным наследованием, смогли обнаружить и описать ген *HT*, мутации в котором приводили к возникновению заболевания. Это стало первым примером гена, связанного с генетическим заболеванием. В ходе исследования был сделан анализ сегрегации ДНК-маркеров с фенотипом у большого количества семей с наследственной болезнью Хантингтона [9]. Очевидно, что масштабный анализ генеалогических деревьев — чрезвычайно трудоемкая задача, которая с успехом может решаться алгоритмически, что и привело к разработке целого ряда методов для анализа сцепленного наследо-

вания генов (англ. Linkage analysis) [10] и построения карт сцепленности генов [11].

В случае с полигенными заболеваниями проведение подобного анализа затрудняется необходимостью следить за совместной сегрегацией многих ДНК-маркеров одновременно. Программа GENEHUNTER позволила решить эту задачу и обнаружить сотни ДНК-локусов, ассоциированных с заболеваниями еще до завершения проекта «Геном человека» [12].

С появлением современных методов высокопроизводительного секвенирования, а также генотипирования с помощью микрочипов, удалось накопить большой массив данных для проведения ассоциативных исследований. На текущий момент накопленные результаты таких исследований позволили обнаружить тысячи генов и индивидуальных ДНК-вариантов, связанных с рисками заболеваний [13, 14]. Как следствие, более глубокое понимание молекулярных причин нарушения функционирования организма постепенно приводит к смещению фокуса исследований в сторону использования данных об эффектах ДНК-вариантов на фенотип для оценки индивидуальных предрасположенностей к заболеваниям.

МОНОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Для примерно 20 % генов, кодирующих белки в геноме человека, к текущему моменту достоверно установлена связь с одним или несколькими фенотипами, что показывает значительный прогресс, достигнутый за последние 40 лет, но в то же время показывает огромный объем работы, который еще предстоит выполнить.

Моногенные болезни могут быть вызваны ДНК-вариантами различного типа, от однонуклеотидных полиморфизмов до комплексных геномных перестроек [15, 16]. В случае конкретного пациента оценка риска моногенного заболевания заключается в понимании роли и пенетрантности отдельных ДНК-вариантов, обнаруженных в гене, связанном с заболеванием. К примеру, наследственный рак молочной железы часто вызван отдельными ДНК-вариантами в гене *BRCA1*. Задача отделения полиморфизмов с незначимым риском от высокорисковых редких ДНК-вариантов — одна из наиболее актуальных тем для изучения рисков наследственных заболеваний и постановки молекулярных диагнозов [17].

На текущий момент обширное количество вычислительных методов, основанных на различных источниках функциональной информации (консервативности аминокислот, функции белковых доменов и т. д.), используется для численной оценки риска,

связанного с конкретным ДНК-вариантом [18–20]. Однако проверка качества таких предсказаний, основанных на вычислительных моделях, до последнего времени оставалась затруднительной.

Финдлей (англ. Findlay) и коллеги в 2018 году с помощью технологии CRISPR создали все возможные однонуклеотидные мутанты в гаплоидной клеточной линии HAP1, чувствительной к нормальному функционированию гена *BRCA1* [21]. Измеряя клеточную виабильность для каждой мутантной клеточной линии, была проведена оценка функциональной важности каждого из ДНК-вариантов. Данный подход позволил с высокой точностью (~98 %) воспроизвести фенотип для известных клинически значимых вариантов в *BRCA1* [22], а также оценить эффективность популярных алгоритмов для функциональной аннотации ДНК-вариантов. Их невысокая чувствительность остается основной проблемой для интерпретации индивидуальных рисков моногенных заболеваний, однако достаточной для приоритизации ДНК-вариантов при поиске новых генов риска.

В 2018 году Каммингс (англ. Cummings) и соавторы смогли показать, что анализ геномного секвенирования для постановки молекулярного диагноза у пациентов с мышечными дистрофиями по-прежнему недостаточен для ~50 % пациентов. Однако одновременный анализ геномного или экзомного секвенирования с РНК-секвенированием помогает идентифицировать генетическую причину заболевания для дополнительных 35 % пациентов [23].

Секвенирование ДНК предоставляет уникальные возможности для постановки молекулярных диагнозов моногенных болезней. Разработка методов для приоритизации и классификации ДНК-вариантов, в частности в некодирующей последовательности ДНК, в будущем позволит в еще большей степени раскрыть ценность генетической информации для медицины моногенных болезней.

ПОЛИГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

В отличие от моногенных болезней, врожденный компонент риска возникновения комплексных (или полигенных) заболеваний в большей степени связан с кооперативным действием целого набора ДНК-вариантов, каждый из которых имеет небольшой эффект. Однако у отдельных пациентов, несмотря на комплексный характер заболевания, риск может быть связан с редкими вариантами, оказывающими большой фенотипический эффект в одном гене [24–26]. Такого рода суммирование рисков от разных групп ДНК-вариантов еще более усложняет оценку индивидуальных рисков.

Информации от одного ДНК-варианта для оценки риска полигенной болезни недостаточно. Вместо интерпретации генотипов отдельных вариантов используется оценка генетической «нагрузки» с помощью величины, включающей все рисковые ДНК-варианты. Существует несколько подходов к комбинированию информации, полученной из нескольких ДНК-локусов. Наиболее распространенным способом является оценка полигенного риска (polygenic risk score — PRS) — взвешенной суммы количества рисковых аллелей, присутствующих у пациента [27]. В отдельных случаях данный критерий оказывается достаточным для идентификации пациентов, имеющих врожденный полигенный риск, сравнимый с наличием высокопенетрантных мутаций, предрасполагающих к моногенным заболеваниям [28].

Изначально PRS применялся в исследованиях «случай-контроль» для детекции генетических отличий между когортами, что позволило подтвердить важность генетических факторов риска для широкого спектра комплексных заболеваний. Это стало особенно важным для исследований генетики психиатрических заболеваний, требующих наличия десятков тысяч участников для достижения достаточной статистической мощности [29].

Использование данного подхода для выявления пациентов с повышенным риском полигенных заболеваний сталкивается с рядом сложностей на пути к реальному применению в клинической практике. Одним из важных ограничений является отсутствие стандартизованного перевода относительного риска, который предоставляет метрика PRS, в абсолютный риск [30].

Также ограничена возможность трансфера между популяциями результатов GWAS, которые используются в качестве референса для построения модели полигенного риска. Методы, позволяющие делать поправку на популяционную структуру, стали появляться совсем недавно [31].

Модели для предсказания риска комплексных заболеваний, включающие комбинацию из клинических и биохимических факторов, а также факторов, связанных с образом жизни, достаточно хорошо показывают себя в реальных условиях [32, 33]. Однако добавление PRS к данным моделям может значительно помочь в более ранней идентификации людей с повышенными рисками, еще задолго до появления клинических симптомов [34].

Таким образом, оценка полигенных рисков находится в процессе трансформации из метода, позволяющего детектировать разницу в генетической «нагрузке» в исследованиях типа «случай-контроль», в метод, который нуждается в стандартиза-

ции и более глубоком понимании на пути трансляции в клиническую практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка методов для работы с «большими данными» стала достаточно привычной в экономике и статистике. Применение подобного подхода в медицине и генетике — очень динамично развивающаяся область исследований. Накопление данных о геномном разнообразии, структуризация и объединение клинических данных — ключевые шаги для создания фундаментальной базы персонифицированной медицины.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cobb M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol.* 2017; 15 (9): e2003243. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003243.
2. Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, et al. A brief history of bioinformatics. *Brief Bioinform.* 2019; 20(6):1981–1996. DOI: 10.1093/bib/bby063.
3. Hagen JB. The origins of bioinformatics. *Nat Rev Genet.* 2000;1(3):231–236. DOI: 10.1038/35042090.
4. Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1967;1(1):80–91. DOI: 10.1007/978-3-662-25813-2_14.
5. Dayhoff MO, Ledley RS. Comproteins: A computer program to aid primary protein structure determination. *AFIPS.* 1962;1:262–274. DOI: 10.1145/1461518.1461546.
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *Biochemistry.* 1968;7(8):2703–2705. DOI: 10.1021/bi00848a001.
7. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):560–564. DOI: 10.1073/pnas.74.2.560.
8. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
9. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* 1983;306(5940):234–238. DOI: 10.1038/306234a0.
10. Bryant SP. Software for genetic linkage analysis. In: Mathew CG. (eds) *Protocols in human molecular genetics. Methods in Molecular Biology.* Springer, Totowa, NJ, 1991;9:403–418. doi: 10.1385/0-89603-205-1:403.

11. Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987;1(2):174–181. DOI: 10.1016/0888-7543(87)90010-3.
12. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, et al. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*. 1996;58(6):1347–1363.
13. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D514–7. DOI: 10.1093/nar/gki033.
14. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D896–D901. DOI: 10.1093/nar/gkw1133.
15. Posey JE. Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):1–10. DOI: 10.1186/s13023-019-1127-0.
16. Lupski JR. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(5):419–436. DOI: 10.1002/em.21943.
17. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*. 2013;132(10):1077–130. DOI: 10.1007/s00439-013-1331-2.
18. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248–249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.
19. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812–3814. DOI: 10.1093/nar/gkg509.
20. Samocha KE, Kosmicki JA, Karczewski KJ, et al. Regional missense constraint improves variant deleteriousness prediction. *bioRxiv*. 2017;148353. DOI: 10.1101/148353.
21. Findlay GM, Daza RM, Martin B, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature*. 2018;562(7726):217–222. DOI: 10.1038/s41586-018-0461-z.
22. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062–D1067. DOI: 10.1093/nar/gkx1153.
23. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med*. 2017;9(386):eaal5209. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal5209.
24. Saint Pierre A, Génin E. How important are rare variants in common disease? *Brief Funct Genomics*. 2014;13(5):353–361. DOI: 10.1093/bfgp/elu025.
25. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43(11):1066–1073. DOI: 10.1038/ng.952.
26. Singh T, Neale BM, Daly MJ. Exome sequencing identifies rare coding variants in 10 genes which confer substantial risk for schizophrenia. *medRxiv*. 2020.09.18.20192815. DOI: 10.1101/2020.09.18.20192815.
27. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome Med*. 2020;12(1):44. DOI: 10.1186/s13073-020-00742-5.
28. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet*. 2018;50(9):1219–1224. DOI: 10.1038/s41588-018-0183-z.
29. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia that overlaps with bipolar disorder. *Nature*. 2009;460(7256):748–752. DOI: 10.1038/nature08185.
30. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet*. 2018;19(9):581–590. DOI: 10.1038/s41576-018-0018-x.
31. Martin AR, Kanai M, Kamatani Y, et al. Clinical use of current polygenic risk scores may exacerbate health disparities. *Nat Genet*. 2019;51(4):584–591. DOI: 10.1038/s41588-019-0379-x.
32. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105(3):310–305. DOI: 10.1161/hc0302.102575.
33. Wilson PWF, Meigs JB, Sullivan L, et al. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med*. 2007;167(10):1068–1074. DOI: 10.1001/archinte.167.10.1068.
34. Mars N, Koskela JT, Ripatti P, et al. Polygenic and clinical risk scores and their impact on age at onset and prediction of cardiometabolic diseases and common cancers. *Nat Med*. 2020;26(4):549–557. DOI: 10.1038/s41591-020-0800-0.

Информация об авторе:

Артемов Никита Николаевич, руководитель НИЛ популяционной генетики НМИЦ им. В. А. Алмазова, доцент-исследователь Университета ИТМО, научный сотрудник Института Брода, инструктор по исследованиям Массачусетской больницы общего профиля.

INVESTIGATING INHERITED DISEASE RISKS USING COMPUTATIONAL GENETICS METHODOLOGY

Artomov M. ^{1, 2, 3, 4, 5}

¹Almazov National Medical Research Center, Saint Petersburg, Russia

²World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

³ITMO University, Saint Petersburg, Russia

⁴Broad Institute, Cambridge, USA

⁵Massachusetts General Hospital, Boston, USA

Corresponding author:

Artomov Mykyta,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: artemov_nn@almazovcentre.ru

Received 03 September 2021; accepted
25 October 2021.

ABSTRACT

Large amount of genetic data accumulated over the recent years enabled the transition from association studies, aimed on the search for novel risk genes to the interpretation of personal risks and prognosis.

In this review the key milestones of computational biology are presented and the strengths and limitations of current genetic risk prediction methods are discussed.

Key words: bioinformatics, computational biology, genetics, GWAS, history of science, inherited risks.

For citation: Artomov N.N. Investigating inherited disease risks using computational genetics methodology. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):136-145.

INTRODUCTION

At the moment, the array of accumulated genomic data is becoming sufficient not only to understand the molecular causes of diseases, but also to assess individual congenital risks. Thus, there is a transition to the prediction of diseases and the personalization of medical interventions, especially in the field of preventive medicine.

The use of computational methods in biology has opened up opportunities for the development of a whole branch of research — bioinformatics. The development of methods for effective work with arrays of genomic and clinical data is the key to maximizing practical benefits from fundamental genetic research.

This review presents a brief history of the development of computational biology and the current state of the scientific field dedicated to the assessment of congenital disease risks.

DEVELOPMENT OF COMPUTATIONAL BIOLOGY AND BIOINFORMATICS

On September 19, 1957, Francis Crick outlined key ideas about the function of genes. In particular, he formulated the so-called “central dogma” of molecular biology, which states that genetic information can be transmitted from nucleic acids to protein, but not in the opposite direction [1, 2].

Despite the key role of DNA as a carrier of genetic information, the ability to establish the sequence of amino acids in a protein appeared much earlier than the methods of sequencing nucleic acids. For example, the Edman degradation, which became available in 1949 due to automation, resulted in sequences of more than 15 protein families in the following decade [3]. One of the important limitations of the Edman method is the inability to sequence more than 50-60 amino acids in one round [4]. In order to sequence proteins consisting of more amino acids, they had to be fragmented beforehand.

Thus, the main problem was not the sequencing process itself, but the assembly of a sequence of amino acids in a protein, based on hundreds of small polypeptides sequenced using the Edman method. This task gave the main impetus for the emergence of bioinformatics. The task of assembling a sequence of large proteins turned out to be extremely difficult for an analytical solution. This led to the fact that in the early 1960s, the first bioinformatics program was created, which allowed solving this problem automatically [2].

Margaret Dayhoff and Robert S. Ledley, considered the ancestors of modern computational biology, in 1962 created COMPROTEIN — the first comput-

er program recorded on punch cards, which solved a problem that is relevant in present, *de novo* sequence assembly [5]. It should be noted that the introduction of software solutions and the existing limitations of computer performance led to innovations that we still use today, speaking about protein sequences. Thus, due to the complexity of storing three-letter names of amino acids in the memory of computers of that time, Margaret Dayhoff proposed a modern single-letter encoding of amino acids [6]. Following COMPROTEIN, the use of computational methods for the analysis of amino acid substitutions and sequences gave a significant impetus to the development of bioinformatics.

By 1970s, it became obvious that sequencing individual proteins was inefficient, since it required isolation and purification of each protein separately, while DNA sequencing would allow determining the amino acid sequence of all proteins simultaneously. The emergence of the Maxam-Gilbert [7] and Sanger [8] sequencing has led to the fact that the search for genes and the study of the effect of mutations in DNA on the occurrence of diseases have become one of the main directions in biology.

The first attempts to detect the position of genes in DNA and link mutations to the risk of disease began long before the start of the Human Genome Project. James Gusella, Nancy Wexler and colleagues in 1976-1983, during the study of Huntington's disease, a rare monogenic disease with autosomal dominant inheritance, were able to detect and describe the *HT gene*, in which mutations led to the onset of the disease. This was the first example of a gene associated with a genetic disease. The study analyzed the segregation of DNA markers with a phenotype in a large number of families with hereditary Huntington's disease [9]. Obviously, large-scale analysis of family trees is an extremely laborious task that can be successfully solved algorithmically, which led to the development of a number of methods for Linkage analysis) [10] and gene linkage mapping [11].

In the case of polygenic diseases, such an analysis is complicated by the need to monitor the joint segregation of many DNA markers simultaneously. The GENEHUNTER program made it possible to solve this problem and detect hundreds of DNA loci associated with diseases even before the completion of the Human Genome project [12].

With the advent of modern methods of high-performance sequencing, as well as genotyping using microchips, it became possible to accumulate a large array of data for associative studies. To date, the accumulated results of such studies have made it possible to detect thousands of genes and individual DNA variants associated with disease risks [13, 14]. As a result, a deep-

er understanding of the molecular causes of impaired functioning of the body gradually leads to a shift in the focus of research towards the use of data on the effects of DNA variants on the phenotype to assess individual predispositions to diseases.

MONOGENIC DISEASES

For about 20% of the genes encoding proteins in the human genome, a connection with one or more phenotypes has been reliably established to date, which shows significant progress made over the past 40 years, but at the same time shows a huge amount of work that remains to be done.

Monogenic diseases can be caused by DNA variants of various types, from single-nucleotide polymorphisms to complex genomic rearrangements [15, 16]. In the case of a particular patient, the risk assessment of a monogenic disease consists in understanding the role and penetrance of individual DNA variants found in the gene associated with the disease. For example, hereditary breast cancer is often caused by individual DNA variants in the *BRCA1* gene. The task of separating low-risk polymorphisms from high-risk rare DNA variants is one of the most relevant topics for studying the risks of hereditary diseases and formulating molecular diagnoses [17]. Currently, a large number of computational methods based on various sources of functional information (conservation of amino acids, functions of protein domains, etc.) are used for numerical risk assessment associated with a specific DNA variant [18–20]. However, checking the quality of such predictions based on computational models has remained difficult until recently.

Findlay and colleagues in 2018, using CRISPR technology, created all possible single-nucleotide mutants in the haploid HAP1 cell line sensitive to the normal functioning of the *BRCA1* gene [21]. By measuring the cellular viability for each mutant cell line, the functional importance of each of the DNA variants was assessed. This approach made it possible to reproduce the phenotype with high accuracy (~98%) for known clinically significant variants in *BRCA1* [22], as well as to evaluate the effectiveness of popular algorithms for functional annotation of DNA variants. Their low sensitivity remains the main problem for interpreting individual risks of monogenic diseases, but it is sufficient to prioritize DNA variants when searching for new risk genes.

In 2018, Cummings and co-authors were able to show that genomic sequencing analysis for making a molecular diagnosis in patients with muscular dystrophy is still insufficient for ~50% of patients. However, simultaneous analysis of genomic or exomic sequencing with RNA sequencing helps to identify the genetic

cause of the disease for an additional 35% of patients [23].

DNA sequencing provides unique opportunities for making molecular diagnoses of monogenic diseases. The development of methods for prioritizing and classifying DNA variants, in particular in a non-coding DNA sequence, in the future will allow to reveal even more the value of genetic information for the medicine of monogenic diseases.

POLYGENIC DISEASES

Unlike monogenic diseases, the congenital component of the risk of complex (or polygenic) diseases is more associated with the cooperative action of a whole set of DNA variants, each of which has little effect. However, in some patients, despite the complex nature of the disease, the risk may be associated with rare variants that have a large phenotypic effect in one gene [24–26]. This kind of aggregation of risks from different groups of DNA variants makes it even more difficult to assess individual risks.

Information from one DNA variant is not enough to assess the risk of a polygenic disease. Instead of interpreting the genotypes of individual variants, an assessment of the genetic “load” is used using a value that includes all risky DNA variants. There are several approaches to combining information obtained from several DNA loci. The most common method is the polygenic risk score (PRS), a weighted sum of the number of risk alleles present in a patient [27]. In some cases, this criterion is sufficient to identify patients with a congenital polygenic risk comparable to the presence of highly penetrant mutations predisposing to monogenic diseases [28].

Initially, PRS was used in “case-control” studies to detect genetic differences between cohorts, which made it possible to confirm the importance of genetic risk factors for a wide range of complex diseases. This has become particularly important for research on the genetics of psychiatric diseases, which require tens of thousands of participants to achieve sufficient statistical power [29].

The use of this approach to identify patients with an increased risk of polygenic diseases faces a number of difficulties on the way to real application in clinical practice. One of the important limitations is the lack of a standardized translation of the relative risk provided by the PRS metric to absolute risk [30].

The possibility of transfer between populations of GWAS results, which are used as a reference for building a polygenic risk model, is also limited. Methods that allow making adjustments to the population structure have started to appear quite recently [31].

Models for predicting the risk of complex diseases, including a combination of clinical and biochemical factors, as well as lifestyle-related factors, work quite well in real conditions [32, 33]. However, the addition of PRS to these models can significantly help identify people at higher risk earlier, long before clinical symptoms occur [34].

Thus, the assessment of polygenic risks is in the process of transformation from a method that allows detecting a difference in genetic “load” in case-control type of studies, to a method that needs standardization and deeper understanding on its way to translation into clinical practice.

CONCLUSION

The development of methods for working with “big data” has become quite common in economics and statistics. The application of this approach in medicine and genetics is a booming field of research. The accumulation of data on genomic diversity, structuring and integration of clinical data are key steps for creating a fundamental base for personalized medicine.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Cobb M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol.* 2017; 15 (9): e2003243. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003243.
2. Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, et al. A brief history of bioinformatics. *Brief Bioinform.* 2019; 20(6):1981–1996. DOI: 10.1093/bib/bby063.
3. Hagen JB. The origins of bioinformatics. *Nat Rev Genet.* 2000;1(3):231–236. DOI: 10.1038/35042090.
4. Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1967;1(1):80–91. DOI: 10.1007/978-3-662-25813-2_14.
5. Dayhoff MO, Ledley RS. Comproteins: A computer program to aid primary protein structure determination. *AFIPS.* 1962;1:262–274. DOI: 10.1145/1461518.1461546.
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *Biochemistry.* 1968;7(8):2703–2705. DOI: 10.1021/bi00848a001.
7. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):560–564. DOI: 10.1073/pnas.74.2.560.
8. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
9. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* 1983;306(5940):234–238. DOI: 10.1038/306234a0.
10. Bryant SP. Software for genetic linkage analysis. In: Mathew CG. (eds) *Protocols in human molecular genetics. Methods in Molecular Biology.* Springer, Totowa, NJ, 1991;9:403–418. doi: 10.1385/0-89603-205-1:403.
11. Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics.* 1987;1(2):174–181. DOI: 10.1016/0888-7543(87)90010-3.
12. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, et al. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet.* 1996;58(6):1347–1363.
13. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D514–7. DOI: 10.1093/nar/gki033.
14. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D896–D901. DOI: 10.1093/nar/gkw1133.
15. Posey JE. Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):1–10. DOI: 10.1186/s13023-019-1127-0.
16. Lupski JR. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. *Environ Mol Mutagen.* 2015;56(5):419–436. DOI: 10.1002/em.21943.
17. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet.* 2013;132(10):1077–130. DOI: 10.1007/s00439-013-1331-2.
18. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.
19. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812–3814. DOI: 10.1093/nar/gkg509.
20. Samocha KE, Kosmicki JA, Karczewski KJ, et al. Regional missense constraint improves variant deleteriousness prediction. *bioRxiv.* 2017;148353. DOI: 10.1101/148353.
21. Findlay GM, Daza RM, Martin B, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature.* 2018;562(7726):217–222. DOI: 10.1038/s41586-018-0461-z.
22. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062–D1067. DOI: 10.1093/nar/gkx1153.
23. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease

with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med*. 2017;9(386):eaal5209. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal5209.

24. Saint Pierre A, Génin E. How important are rare variants in common disease? *Brief Funct Genomics*. 2014;13(5):353–361. DOI: 10.1093/bfpg/elu025.

25. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43(11):1066–1073. DOI: 10.1038/ng.952.

26. Singh T, Neale BM, Daly MJ. Exome sequencing identifies rare coding variants in 10 genes which confer substantial risk for schizophrenia. *medRxiv*. 2020.09.18.20192815. DOI: 10.1101/2020.09.18.20192815.

27. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome Med*. 2020;12(1):44. DOI: 10.1186/s13073-020-00742-5.

28. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet*. 2018;50(9):1219–1224. DOI: 10.1038/s41588-018-0183-z.

29. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia that overlaps with bipolar disorder. *Nature*. 2009;460(7256):748–752. DOI: 10.1038/nature08185.

30. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet*. 2018;19(9):581–590. DOI: 10.1038/s41576-018-0018-x.

31. Martin AR, Kanai M, Kamatani Y, et al. Clinical use of current polygenic risk scores may exacerbate health disparities. *Nat Genet*. 2019;51(4):584–591. DOI: 10.1038/s41588-019-0379-x.

32. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105(3):310–305. DOI: 10.1161/hc0302.102575.

33. Wilson PWF, Meigs JB, Sullivan L, et al. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med*. 2007;167(10):1068–1074. DOI: 10.1001/archinte.167.10.1068.

34. Mars N, Koskela JT, Ripatti P, et al. Polygenic and clinical risk scores and their impact on age at onset and prediction of cardiometabolic diseases and common cancers. *Nat Med*. 2020;26(4):549–557. DOI: 10.1038/s41591-020-0800-0.

Author information:

Artomov Mykyta, Head of Research Laboratory of Population Genetics, Almazov National Medical Research Center, Research-professor, ITMO University, Researcher, Broad Institute, Instructor in Investigation, Massachusetts General Hospital.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 577:612.017.1

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК ПРОТОТИПЫ НОВЫХ СРЕДСТВ БОРЬБЫ С АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Шамова О. В.^{1, 2}, Жаркова М. С.^{1, 2}, Чернов А. Н.^{1, 2},
Владимирова Е. В.¹, Сухарева М. С.¹, Комлев А. С.¹,
Коченда О. Л.^{1, 2}, Орлов Д. С.²

¹Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Шамова Ольга Валерьевна,
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12,
Санкт-Петербург, Россия, 197376.
E-mail: shamova@iems.spb.ru

Статья поступила в редакцию
20.09.2021 и принята к печати
25.10.2021.

РЕЗЮМЕ

В обзоре проводится анализ литературных данных об антимикробных пептидах (АМП) системы врожденного иммунитета как о перспективных прототипах новых антибиотических средств для преодоления антибиотикорезистентности микроорганизмов. Описаны структурно-функциональные свойства данных пептидов, приведены сведения о механизмах антимикробного действия и, кратко, об эффектах на клетки высших эукариот. Обсуждаются преимущества АМП по сравнению с конвенциональными антибиотиками и проблемы практического применения АМП. Приводятся примеры разработанных на основе АМП препаратов, находящихся на стадии клинических испытаний, обосновывается необходимость создания новых пептидных препаратов для применения в медицине в терапии инфекционных заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами.

Ключевые слова: антибактериальное действие, антимикробные пептиды, инфекционные заболевания, клинические испытания, микробная резистентность.

Для цитирования: Шамова О.В., Жаркова М.С., Чернов А.Н. и др. Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):146-172.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы резистентность патогенных микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам стремительно растет. По прогнозам, к 2050 году смертность от инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями, достигнет 10 млн человек в год [1]. Особенно остро стоит проблема борьбы с госпитальными инфекциями. К числу наиболее опасных представителей таких бактерий, отнесенных ВОЗ к I категории приоритетности, принадлежат мультирезистентные грамотрицательные бактерии рода *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства Enterobacteriaceae (включая *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* и *Proteus*), устойчивые к карбопенемам и другим антибиотикам [2]. Данный список предоставляет ориентиры первоочередных разработок для научно-исследовательских организаций. Согласно указаниям ВОЗ, необходим срочный поиск принципиально новых противоинфекционных лекарственных средств, а также развитие фундаментальных и прикладных научных исследований, связанных с расшифровкой естественных противоинфекционных защитных механизмов организма.

Особую проблему составляют бактерии, формирующие биопленки, что многократно повышает их устойчивость к химиопрепаратам [3–5]. Поиск средств борьбы с такими бактериями является актуальной задачей экспериментальной и практической медицины.

В качестве принципиально новых антибиотиков в настоящее время рассматриваются аналоги природных антимикробных пептидов (АМП) системы врожденного иммунитета вследствие затрудненного формирования резистентности микроорганизмов к этим соединениям и отсутствия негативного влияния на иммунную систему, свойственного некоторым конвенциональным антибиотикам.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И СТРУКТУРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕПТИДОВ

АМП известны как молекулы, выступающие в качестве важнейшего эффекторного звена системы врожденного иммунитета животных [6–8]. Кроме того, пептиды, обладающие антимикробной активностью, обнаружены не только у животных, но и у растений, грибов, бактерий [7, 9, 10]. Эти соединения представляют собой положительно заряженные пептидные молекулы, в состав которых входит 15–45 аминокислотных остатков. Антимикробными рассматриваемые пептиды были названы вследствие

обнаружения у этих веществ широкого спектра антибиотической активности — эти пептиды подавляют рост и развитие грамотрицательных, грамположительных бактерий, грибов (включая дрожжи), паразитов (включая планарий и нематод) и даже вирусов, таких как ВИЧ и вирус герпеса [8, 11–17].

Антимикробные пептиды имеют разнообразные первичные структуры и различные конформации молекул. Одна из классификаций АМП основана на различиях в их вторичной структуре и разделяет известные пептиды на несколько основных групп [18–20]:

- пептиды, имеющие конформацию α -спирали;
- линейные пептиды, имеющие в составе молекулы повышенное содержание той или иной аминокислоты: обогащенные пролином, триптофаном, гистидином или глицином пептиды;
- цистинсодержащие пептиды — пептиды, имеющие одну, две и более дисульфидных связей. К этой группе обычно относят и пептиды со смешанной структурой, в состав которых кроме β -слоев входят и спиральные участки; а также макроциклические пептиды, замкнутые в кольцо пептидной связью (θ -дефенсины RTD-1, -2, -3).

Подавляющее большинство антимикробных пептидов — катионные молекулы. Однако описано несколько анионных пептидов [21, 22], например, дермасептин — пептид, обнаруженный в секретах потовых желез человека и проявляющий антибактериальную и фунгицидную активности, — максимин H5 из кожи жабы *Bombina maxima* [23] и другие.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

У млекопитающих имеется две основные группы антимикробных пептидов: семейство структурно-родственных цистинсодержащих АМП дефенсинов и группа пептидов с разнообразными структурами, составляющая семейство кателицидинов [18, 24].

Существование низкомолекулярных катионных белков, обладающих антимикробным действием, впервые было показано американскими исследователями Зея и Спитцнагелем в шестидесятых годах [25], обнаружившими их в нейтрофилах кролика и морской свинки и давшими им название «лизосомальные катионные белки». В нашей стране исследования этих полипептидов были инициированы в НИИ экспериментальной медицины и на кафедре биохимии Ленинградского университета; была продемонстрирована их бактерицидная и антивирусная активности [26–30].

Термин «дефенсины» (в другой транслитерации — дефензины) для обозначения этой группы веществ был введен в 1985 году [31], когда начался новый период в изучении этих пептидов. Была расшифрована первичная структура дефенсинов кролика [32], дефенсинов человека [31, 33], морской свинки [34] и крысы [35]. Показано, что они обладают универсальной антимикробной активностью, инактивируя *in vitro* грамположительные, грамотрицательные бактерии, грибки, некоторые оболочечные вирусы. Впоследствии эти пептиды были названы α -дефенсинами, чтобы подчеркнуть их отличие от других АМП, сходных по структуре, но отличающихся по характеру замыкания дисульфидных связей, получивших в свою очередь название β -дефенсинов.

Из нейтрофилов человека было выделено четыре изоформы α -дефенсинов, три из которых HNP-1, HNP-2 и HNP-3 отличаются друг от друга только по одной N-концевой аминокислоте. HNP-4 присутствует в нейтрофилах в количествах, в сто раз меньших, чем HNP 1-3 [14]. Пептиды этой группы были обнаружены не только в нейтрофилах, но и в лимфоцитах человека, естественных киллерных клетках [36], в эпителиальных клетках мочевого тракта [37], хотя и в значительно меньших количествах, чем в нейтрофилах. Кроме того, в криптах кишечника в клетках Панета обнаружены α -дефенсины, получившие название HD-5 и HD-6 [38].

Шесть α -дефенсинов человека кодируются пятью генами DEFA, локализованными в хромосоме 8p23.1. Дефенсин HNP-2 отличается от HNP-1 и HNP-3 отсутствием N-концевого остатка (аланина у HNP-1 или аспарагиновой кислоты у HNP-3); таким образом, данный дефенсин является продуктом гена DEFA1, кодирующего HNP-1, или DEFA3, кодирующего HNP-3, и образуется в результате протеолитического отщепления N-концевых остатков этих пептидов. В 1×10^6 нейтрофилов человека содержится примерно 4–5 мкг дефенсинов HNP-1-3, причем каждый день в костном мозге в ходе гемопоэза в нейтрофилах продуцируется около 250 мг этих АМП [14].

В то время как α -дефенсины содержатся преимущественно в фагоцитах, — причем у многих видов животных (кошек, собак, лошадей, овец и других) эти пептиды вообще отсутствуют, — пептиды группы β -дефенсинов встречаются более широко. Они присутствуют в эпителиальных клетках всех изученных видов млекопитающих, выявлены у рептилий и птиц; кроме того, сходные по структуре пептиды обнаружены также у грибов, растений, бактерий.

У человека описано 28 генов, кодирующих различные β -дефенсины. Выделяют четыре основные изоформы этих пептидов: hBD-1 содержится в эпи-

телиальных клетках респираторного и мочеполового трактов, кератиноцитах, астроцитах, микроглии [39, 40] и лейкоцитах; hBD-2 — в эпителиальных клетках кожи, респираторного, мочеполового, пищеварительного трактов [41]; hBD-3 — в различных типах эпителиальных клеток: наиболее высокая его концентрация выявлена в слюне и мочеполовом тракте, также он имеется в печени, сердце, плаценте [42, 43]; hBD-4 обнаружен в клетках мочеполового и пищеварительного трактов [44, 45]. Биосинтез hBD-1 конститутивен, hBD-2 и hBD-3 — индуцибелен: уровень экспрессии генов hBD2 и hBD3 повышается при контакте эпителиальных клеток с микроорганизмами [46].

Другая необычная группа дефенсинов — циклические θ -дефенсины. Пептиды этой группы были обнаружены в лейкоцитах макаки резус [47, 48] и павиана гамадрила [49]. Было показано, что пептид RTD-1 (rhesus θ -defensin 1) является продуктом сшивки двух укороченных α -дефенсинов, кодируемых двумя разными генами. Циклическая структура θ -дефенсинов делает их относительно нечувствительными к присутствию в среде хлорида натрия и позволяет осуществлять антимикробную функцию при физиологических концентрациях солей. Хотя сами гены, кодирующие θ -дефенсины, есть и у человека, их экспрессия не осуществляется вследствие наличия стоп-кодона в области ДНК, ответственной за синтез пре-части этих молекул.

Представители семейства кателицидинов были найдены в гранулах фагоцитов, а также в клетках различных барьерных эпителиев. Кателицидины, в отличие от дефенсинов, демонстрируют широкое структурное разнообразие. Эти различающиеся по структуре пептиды объединены в одно семейство в силу того обстоятельства, что все они образуются из молекул-предшественниц [50], в состав которых входит участок, гомологичный белку кателину (то есть ингибитору катепсина L, являющемуся белком с массой 11 кДа, который был впервые выделен из лейкоцитов свиньи [51]). Молекулы-предшественницы не проявляют антимикробных эффектов; зрелый активный пептид образуется только после отщепления препрочасти ферментами активированных нейтрофилов [52].

Кателицидины были обнаружены в защитных клетках человека млекопитающих, птиц, рептилий, рыб [52–54].

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ

Спектр антимикробной активности АМП зависит от структуры пептида. Некоторые АМП имеют широкий спектр антибиотического действия и ак-

тивны в отношении грамотрицательных грамположительных бактерий, грибов. Другие АМП имеют более ограниченный спектр антимикробной активности: так, например, обогащенные пролином пептиды инактивируют преимущественно грамотрицательные бактерии [55]. Ряд АМП обладает фунгицидной активностью; она продемонстрирована для α -дефенсинов кролика и человека, β -дефенсинов человека, гистатинов, протегринов и других пептидов [8, 12, 14, 56]. Многие пептиды проявляют выраженную активность в отношении штаммов микроорганизмов, устойчивых к большинству антибиотических препаратов, применяемых в медицине [57–60]. Эти свойства пептидов обусловлены механизмом их антимикробного действия, который будет рассмотрен ниже.

Несмотря на огромное структурное разнообразие описанных к настоящему времени природных антимикробных пептидов, все они, как правило, представляют собой катионные и амфипатические молекулы, в которых пространственно разобщены гидрофильные и гидрофобные группы аминокислотных остатков. Наличие положительного заряда позволяет им электростатически связываться с анионными компонентами мембран микробных клеток (анионными фосфолипидами, липополисахаридами, тейхоевыми кислотами), а благодаря гидрофобным свойствам — встраиваться в липидные бислои мембран, что может вызывать необратимые повреждения структуры бактериальной мембраны и нарушения ее функций и приводить к гибели клеток-мишеней [8, 18, 20, 61].

Таким образом, мишенью действия большинства природных АМП являются бактериальные мембраны. В настоящее время в литературе имеется большое количество работ, посвященных изучению действия антимикробных пептидов на искусственные липидные мембраны (монослой, бислои, липосомы), состав которых приближен к липидному составу мембран бактерий либо эукариотических клеток. Хотя механизм встраивания антимикробных пептидов в мембраны живых клеток до сих пор полностью не выяснен, но в экспериментах на модельных мембранах получены данные, в результате анализа которых было предложено несколько моделей взаимодействия антибиотических пептидов с липидными мембранами [62].

Амфипатическая природа антимикробных пептидов — их ключевое физико-химическое свойство, важное для реализации процесса встраивания пептидов в липидные мембраны: гидрофобные области необходимы, чтобы взаимодействовать непосредственно с липофильной фазой мембран, в то время как гидрофильные области или взаимо-

действуют с отрицательно заряженными группами фосфолипидов, или направлены в полость поры.

На первом этапе контакта АМП с мембраной пептиды преимущественно принимают ориентацию параллельно мембране, электростатически связываясь с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов на мембранной поверхности [8, 62, 63]. При этом многие пептиды меняют конформацию при переходе из водной среды в липидное окружение, в частности, многие пептиды из группы α -спиральных приобретают упорядоченную α -спиральную структуру именно при адсорбции на мембране [64, 65].

В зависимости от структуры пептидов, механизм повреждения мембран различается. Также предполагается, что пептиды могут оказывать влияние на мембраны, сочетая несколько разных способов воздействия. Согласно классическим представлениям о механизме нарушения структурной целостности мембран, пептиды, сорбируясь на ее поверхности, достигают определенной пороговой концентрации, после чего начинается их встраивание в мембрану с формированием образованной молекулами пептидов поры (модель «сборки бочки»), либо поры, составленной из молекул пептида и липидов (тороидальная пора), или с образованием мицеллярных структур в мембране (модель «ковра») [19, 63, 64, 66].

Модель тороидальной поры предполагает, что скопления пептидов приобретают ориентацию перпендикулярно мембране, изгибая её внутрь для формирования поры и образования «хода», выстланного гидрофильными группами (в том числе головками мембранных фосфолипидов), направленными внутрь полости.

В модели «сборки бочки» или «бочарной клепки» молекулы пептида переориентируются, выполняя роль «досок» («клепок»), образующих стенки «бочки»-поры, т. е. формируют кластер, расположенный перпендикулярно поверхности мембраны, так, что гидрофобные области каждого пептида в кластере связаны с липидным кором мембраны, в то время как гидрофильные области смотрят в полость образовавшейся трансмембранной поры.

В отличие от моделей образования пор, модель «ковра» предполагает, что молекулы пептидов, располагающиеся параллельно липидному бислою, покрывают целые локальные области подобно ковру [67] и, при достижении достаточно высокой концентрации, проявляют подобную детергентам активность, вызывая местные нарушения целостности мембран. Участки мембраны могут разбиваться на мицеллы, что может привести к формированию пор. Могут образовываться и интермедиатные сое-

динения, составленные из липидных молекул, связанных с пептидом.

Уменьшение толщины липидного бислоя в присутствии АМП тоже было описано [19, 61] и рассматривается как один из способов воздействия, приводящего к нарушению барьерной функции мембран.

Адсорбция пептидов на мембране повышается при контакте их с окисленными фосфолипидами. В некоторых случаях не выявляется значительных повреждений мембраны при воздействии пептидов, однако мембранный потенциал клеток-мишеней резко падает. Предложена также модель «электропорации» [19, 68], согласно которой аккумуляция пептидов в наружном листке липидного бислоя мембраны приводит к возрастанию мембранного потенциала свыше порогового значения, что влечет за собой увеличение проницаемости мембраны для различных молекул, включая и сами пептиды.

Некоторые АМП при минимальной эффективной концентрации не вызывают дезинтеграции мембраны, и все же бактерии погибают. Эти пептиды перемещаются через мембрану и накапливаются внутри клеток, где нарушают множество важных клеточных процессов, опосредуя клеточную гибель: ингибируют синтез нуклеиновых кислот, белковый синтез, ферментативную активность и синтез клеточной стенки [18, 66, 69].

Например, антимикробный пептид лягушки буфорин проникает через бактериальную мембрану, не вызывая ее разрушения, и связывается с ДНК и РНК в цитоплазме *E. coli* [70]. Подобным же образом некоторые α -спиральные пептиды, такие как дермасептин, выделенный из кожи лягушки, или производные плеуроцидина, полученного из рыб АМП, вызывают ингибирование синтеза ДНК и РНК, не дестабилизируя мембрану клетки *E. coli* [71]. Ингибирование синтеза нуклеиновых кислот было также продемонстрировано для антимикробных пептидов из различных структурных классов, таких как включающий β -структуру α -дефенсин человека HNP-1 [72] или линейный, обогащенный триптофаном пептид нейтрофилов быка индолицидин [73].

Кроме того, было показано, что некоторые из таких АМП могут влиять на белковый синтез. Снижение уровня белкового синтеза наблюдается в том числе при действии плеуроцидина и дермасептина, PR-39 и индолицидина. На примере пролин-богатого АМП насекомых пирхокорицина для сходных с ним пептидов был выявлен механизм, согласно которому пептид поступает в клетку-мишень (*E. coli*) и связывается с DnaK, белком теплового шока, который вовлечен в шаперон-зависимый белковый

фолдинг. Пептид ингибирует АТФ-азную активность DnaK, нарушая пространственную свертку белковых молекул, что заканчивается накоплением белков с нарушенной конформацией и гибелью клетки [74]. Подобная активность подтверждена также для бактенецина 7 быка и бактенецина 7.5 овцы [75–77]. Для ряда богатых пролином АМП, включая апидаецины и онкоцины насекомых, а также бактенецины быка 5 и 7, была также выявлена возможность блокировки ими трансляции на рибосомах за счет связывания с 70S субъединицей (в области выходного туннеля) [55, 78–82].

Мишенью антимикробных пептидов может также быть формирование структурных компонентов, таких как клеточная стенка. Лантибиотик низин, в дополнение к его способности к формированию пор, может связывать липид 2, ингибируя, таким образом, синтез клеточной стенки [83]. Интересно, что те же стадии процесса ее биосинтеза являются мишенью действия антибиотика ванкомицина. Однако предполагается, что низин и ванкомицин проявляют свое действие, взаимодействуя с различными молекулярными частями в пределах липида 2, вследствие чего пептид низин активен и против ванкомицин-устойчивых бактерий [84].

Многие исследователи склоняются к мысли, что механизм действия каждого пептида может несколько изменяться в зависимости от особенностей клетки-мишени. Кроме того, АМП возможно инактивируют бактерии с помощью двух или более механизмов действия, сочетая дестабилизацию мембраны клетки и нарушение внутриклеточных процессов. Считают, что АМП могут действовать по «мультицелевому» механизму [85, 86], а именно что пептиды, имеющие высокий положительный заряд молекулы, помимо нарушения мембран бактерий, проникают в микробные клетки и связываются с анионными соединениями в цитоплазме, такими как нуклеиновые кислоты или ферменты, таким образом вмешиваясь в процессы, в которые вовлечены эти молекулы. Так, показано, что катионные пептиды различных структурных классов могут связать и специфично ингибировать активность аминогликозид-модифицирующих ферментов, которые содержат анион-связывающий карман [87]. Высокая степень сложности подобного механизма и множественность мишеней антимикробного действия являются причинами маловероятности появления и отбора мутантов, устойчивых к катионным пептидам [86, 88].

Кроме активности, связанной с непосредственной инактивацией бактерий, грибов и вирусов, АМП проявляют целый ряд эффектов в отношении собственных клеток организма. Многие пептиды

обладают цитотоксичностью в отношении различных опухолевых и нормальных эукариотических клеток [63, 89–91], выступают хемоаттрактантами для макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [92–94], увеличивают проницаемость сосудов и стимулируют их рост [95–98], вызывают дегрануляцию тучных клеток [96, 99–102], влияют на цитодифференцировку [103–105], ингибируют продукцию кортикостерона клетками коркового слоя надпочечников *in vitro* [106–108].

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

В свете стремительно развивающейся резистентности патогенных микроорганизмов к используемым в клинике антибиотикам и все более остро встающей проблемы поиска новых эффективных антимикробных препаратов, одним из привлекательных свойств АМП животного происхождения как кандидатов на роль последних является высокая активность многих из них, в том числе в отношении антибиотикоустойчивых клинических изолятов бактерий и грибов [109–114]. Показана их действенность и против биопленок, с формированием которых связана значительная часть трудно-излечимых хронических бактериальных инфекций [115–117]. При этом то, что некоторые АМП обладают не только антимикробной, но и упомянутой в предыдущем разделе иммуномодулирующей активностью, делает эти соединения особенно перспективными для разработки на их основе антибиотических препаратов для коррекции различных осложненных патологических процессов, в том числе сопровождающихся иммунодефицитными состояниями. В целом, предполагаемые направления практического использования АМП достаточно разнообразны и связаны с их применением как непосредственных антибиотических агентов, вызывающих гибель патогенных микроорганизмов или трансформированных клеток; как иммуномодулирующих веществ или же как переносчиков других лекарственных соединений через мембраны клеток [12, 118–120]. При этом большинство текущих разработок связано именно с первой возможностью.

Прямое антимикробное действие большинства активных АМП осуществляется за короткий промежуток времени — несколько минут, так как связано с повреждением целостности мембран бактерий. Затрудненное развитие резистентности микроорганизмов к АМП в природе во многом связывают с этим обстоятельством [60, 88, 121]. Однако именно АМП с выраженным мембранолитическим дей-

ствием чаще токсичны и для собственных клеток организма, что осложняет разработку лекарственных препаратов непосредственно на основе этих соединений. Поэтому усилия ученых направлены на создание модификаций АМП с оптимальным сочетанием свойств: высокой антимикробной активностью и низкой токсичностью для собственных клеток организма.

К сожалению, несмотря на прогресс в анализе взаимосвязи структуры и активности АМП последних десятилетий, попытки разработки структурных аналогов АМП *de novo* с использованием только средств компьютерного моделирования имеют весьма ограниченный успех. Остается актуальным поиск новых природных пептидов, например их выделение из лейкоцитов животных. Учитывая длительный эволюционный отбор, обращение к природным источникам часто приводит к выявлению структур пептидных молекул, обладающих перспективными с точки зрения практического применения свойствами, и дальнейшая модификация ведется уже на этой основе.

К настоящему времени разработан ряд лекарственных препаратов на основе АМП, большая часть из которых находится на различных стадиях клинических и доклинических испытаний. Многие из них созданы на основе природных пептидов. Например, на базе короткого триптофан-богатого кателицидина быка индолицидина фирмой Migenix предложены препараты MX-594AN (для лечения угревой сыпи) и MBI-226 (омиганан; изначально для применения при катетер-ассоциированных инфекциях) [122]. К настоящему времени омиганан завершил фазу III клинических испытаний как средство лечения розацеа и проходит фазу II как препарат против акне, атопического дерматита и вагинальной интраэпителиальной неоплазии [123, 124]. Другой препарат, P-113 (PAC-113), разработанный фирмой Demegen на основе гистатина 5 (одного из группы богатых гистидином катионных пептидов слюны), завершил фазу II клинических испытаний как препарат для обработки ротовой полости при кандидозе у ВИЧ-пациентов [56, 123]. OctoPlus, дочернее предприятие Dr. Reddy's Research, успешно завершило фазу II клинических испытаний 24-аминокислотного производного кателицидина LL-37 OP-145 для лечения хронических инфекций среднего уха [123, 125], а фирма ProMore Pharma проводит фазу IIb испытаний самого LL-37 в качестве препарата против хронических язв нижних конечностей [123, 126].

Интересно отметить также разрабатываемые фирмой PLANTON GmbH препараты на основе β -дефенсина 2 человека (hBD2), которые предполагается использовать при лечении атопического дерматита;

повреждений кожи, связанных с ожогами и осложненных инфекционной патологией; легочных инфекций. Примечательно то, что препараты рекомбинантных пептидов производятся с использованием биотехнологических подходов, позволяющих нарабатывать пептид в клубнях трансгенного картофеля, что значительно удешевляет производство препарата по сравнению с более часто используемым получением пептидов с помощью культивируемых бактериальных или эукариотических клеток [127].

На основе цитокиноподобных пептидов насекомых (личинок мух семейства *Calliphoridae*) был разработан отечественный препарат Аллоферон, который в настоящее время используется в медицинской практике как лекарственное средство, стимулирующее антивирусную, антимикробную и противоопухолевую активность иммунной системы человека [128, 129].

Несмотря на скромные на данный момент успехи внедрения, интерес к возможностям использования АМП не ослабевает и список пополняется новыми препаратами, проходящими доклинические испытания. Примерами могут служить препарат NZ2114 на основе β -дефенсин-подобного пептида гриба *Pseudoplectania nigrella* плектазина, разработанный компанией Novozymes для лечения инфекций, связанных с антибиотикоустойчивыми бактериями [130–132], или препарат АЗ-АРО, созданный на основе обогащенного пролином пептида из гемолимфы насекомых [133–135]. Последний пептид интересен тем, что, несмотря на низкую антибактериальную активность *in vitro*, при использовании *in vivo* (на модели кожной инфекции, инфекции дыхательных путей у мышей) демонстрирует высокую эффективность, превышающую показатели традиционно используемых антибиотиков при внутримышечном введении или применении в виде аэрозоля [133].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже из анализа проходящих в настоящий момент испытаний препаратов очевидно, что наиболее близкие перспективы применения АМП в медицине исследователи связывают с их использованием в качестве средств местного применения: для обработки инфицированных, в том числе ожоговых, ран, инфекций кожи и слизистых, хронических трофических язв, в частности при синдроме диабетической стопы, и т. п. Кроме того, рассматриваются возможности включения АМП в состав антибактериальных покрытий, которые могут использоваться при создании различных изделий медицинского назначения: катетеров, стентов, стоматологических имплантов и пр. [136–138]. Оба эти направления

позволяют в определенной мере отодвинуть на второй план ряд существующих проблем, таких как побочная токсичность, вопросы таргетной доставки или ограниченного времени жизни свободных пептидов в биологических средах [139, 140]. Препятствием также остается и вероятное отсутствие экономического преимущества в случае равной эффективности новых пептидных антибиотиков с уже применяемыми препаратами [16, 140].

Тем не менее несомненно привлекательной остается перспектива использования основанных на АМП препаратов для решения более сложных и глобальных задач. Совокупность имеющихся данных подтверждает представление о том, что эти компоненты системы врожденного иммунитета человека и животных проявляют широкий спектр биологических свойств, реализующихся в ходе различных адаптивных и защитных процессов, — при инфекции, воспалении, дистрессе. Более углубленное понимание лежащих в основе этого взаимосвязей и молекулярных механизмов может позволить комплексно реализовать потенциал АМП не только как антимикробных, но и как иммуномодулирующих агентов.

Помимо собственно эффективности в отношении резистентных бактерий, для ряда АМП показаны эффекты синергического антимикробного действия с антибиотиками различной природы, в частности в случаях, когда бактерии обладают устойчивостью непосредственно к антибиотикам, входящим в комбинацию [141–146]. В свете этого перспективна разработка комбинированных антибиотических препаратов для персонализированной терапии инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями.

Выбор в пользу потенциальных препаратов на основе АМП может быть целесообразен в случае развития тяжелых госпитальных инфекций, когда стандартные подходы к химиотерапии оказываются неэффективными и имеется информация о спектре антибиотикоустойчивых патогенов у конкретного пациента. Препараты на основе АМП могут также иметь преимущество в случаях комплексного воздействия: пептиды, обладающие помимо антимикробного ангиогенным и репаративным эффектами, могут дополнительно способствовать заживлению трофических язв, а пептиды, обладающие дополнительно противоопухолевыми свойствами, могут оказаться оптимальным выбором при профилактике и коррекции инфекционных осложнений у онкологических больных (на фоне снижения иммунного статуса, например при химиотерапии).

Таким образом, благодаря выдающемуся потенциалу АМП, разработка терапевтических препаратов на базе этих соединений не теряет актуальность,

несмотря на ряд непростых проблем, стоящих перед исследователями.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization. No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections — Report to the Secretary-General of the United Nations. 2019. https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf (4 October 2021).
- World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> (4 October 2021).
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018; 81(1):7–11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, et al. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(2):59. DOI: 10.3390/antibiotics9020059.
- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013; (136):1–51. DOI: 10.1111/apm.12099.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009; 30(3):131–141. DOI: 10.1016/j.it.2008.12.003.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* 2016; 148(2):125–139. DOI: 10.1111/imm.12597.
- Kokryakov VN. Essays on innate immunity. Saint Petersburg: Nauka, 2006. 261 p. In Russian [Кокряков В.Н. Очерки о врождённом иммунитете. СПб: Наука, 2006. 261 с.].
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides.* 2012; 37(2):207–215. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.07.001.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol.* 2012; 32(2):143–171. DOI: 10.3109/07388551.2011.594423.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(11):2810–2816. DOI: 10.1681/ASN.2007050611.
- Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J.* 2009; 2:e1. DOI: 10.3134/ehth.09.001.
- Wiesner J, Vilcinskis A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010; 1(5):440–464. DOI: 10.4161/viru.1.5.12983.
- Lehrer RI, Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev.* 2012; 245(1):84–112. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x.
- Wang G. Antimicrobial peptides: Discovery, design, and novel therapeutic strategies. Wallingford: CABI Publishing, 2010. 230 p.
- Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(5):311–332. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
- Pachón-Ibáñez ME, Smani Y, Pachón J, et al. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(3):323–342. DOI: 10.1093/femsre/fux012.
- Huan Y, Kong Q, Mou H, et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 2020; 11:582779. DOI: 10.3389/fmicb.2020.582779.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(9):464–472. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules.* 2018; 8(1):4. DOI: 10.3390/biom8010004.
- Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.* 2009; 10(6):585–606. DOI: 10.2174/138920309789630589.
- Phoenix DA, Dennison SR, Harris F. Antimicrobial Peptides. Singapore: Wiley-VCH, 2013. 231 p.
- Lai R, Liu H, Hui Lee W, et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(4):796–799. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00762-3.
- Dorin JR, McHugh BJ, Cox SL, et al. Chapter 30—Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, et al. eds. *Molecular Medical Microbiology.* 2nd ed. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2015:539–565. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00030-5.
- Zeya HI, Spitznagel JK. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science.* 1963; 142(3595):1085–1087. DOI: 10.1126/science.142.3595.1085.

26. Ashmarin IP, Kokryakov VN, Lyzlova SN, et al. Interaction of cationic proteins of granules and myeloperoxidase of leukocytes. Problems of medicinal chemistry (Biomedical chemistry since 2003). 1977; 3:534–537. In Russian [Ашмарин И.П., Кокряков В.Н., Лызлова С.Н., и др. Взаимодействие катионных белков гранул и миелопероксидазы лейкоцитов. Вопросы медицинской химии (Биомедицинская химия с 2003). 1977; 3:534–537].
27. Kokryakov VN, Ashmarin IP, Pigarevsky VE. On the nature of some fractions of lysosomal cationic proteins of leukocytes. Biochemistry. 1973; 38(6):1276–1280. In Russian [Кокряков В.Н., Ашмарин И.П., Пигаревский В.Е. О природе некоторых фракций лизосомальных катионных белков лейкоцитов. Биохимия. 1973; 38(6):1276–1280].
28. Masing YuA. Neutrophilic granulocytes and the body's defense system. Archive of pathology. 1991; 9:70–73. In Russian [Мазинг Ю.А. Нейтрофильные гранулоциты и система защиты организма. Архив патологии. 1991; 9:70–73].
29. Pigarevsky VE, Ashmarin IP, Tolybekov AS, et al. On the in vitro effect of leukocyte and thymic giton and their fractions on the activity of the causative agent of meningopneumonia. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1975; 10:76–78. In Russian [Пигаревский В.Е., Ашмарин И.П., Толыбеков А.С., и др. О влиянии in vitro лейкоцитарного и тимусного гитона и их фракций на активность возбудителя менингопневмонии. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1975; 10:76–78].
30. Pigarevsky VE, Kokryakov VN, Taros LY, et al. Antiviral properties of defensins in experimental herpes infection. In: Pathomorphology of tumors and background diseases. Leningrad, 1989:122–124. In Russian [Пигаревский В.Е., Кокряков В.Н., Тарос Л.Ю., и др. Антивирусные свойства дефенсинов при экспериментальной герпетической инфекции. В кн.: Патоморфология опухолей и фоновых заболеваний. Л., 1989: 122–124].
31. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985; 76(4):1427–1435. DOI: 10.1172/JCI112120.
32. Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, et al. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. J Biol Chem. 1985; 260(8):4579–4584.
33. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, et al. Primary structures of three human neutrophil defensins. J Clin Invest. 1985; 76(4):1436–1439. DOI: 10.1172/JCI112121.
34. Selsted ME, Harwig SS. Purification, primary structure, and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. Infect Immun. 1987; 55(9):2281–2286. DOI: 10.1128/iai.55.9.2281-2286.1987.
35. Eisenhauer PB, Harwig SS, Szklarek D, et al. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. Infect Immun. 1989; 57(7):2021–2027. DOI: 10.1128/iai.57.7.2021-2027.1989.
36. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood. 2000; 96(9):3086–3093.
37. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nat Immunol. 2005; 6(6):551–557. DOI: 10.1038/ni1206.
38. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. J Biol Chem. 1992; 267(32):23216–23225.
39. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, et al. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. J Clin Invest. 1998; 101(8):1633–1642. DOI: 10.1172/JCI1861.
40. Nakayama K, Okamura N, Arai H, et al. Expression of human beta-defensin-1 in the choroid plexus. Ann Neurol. 1999; 45(5):685. DOI: 10.1002/1531-8249(199905)45:5<685::aid-ana25>3.0.co;2-6.
41. McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997; 16(3):343–349. DOI: 10.1165/ajrcmb.16.3.9070620.
42. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001; 276(8):5707–5713. DOI: 10.1074/jbc.M008557200.
43. Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, et al. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. Clin Chem. 2007; 53(4):757–765. DOI: 10.1373/clinchem.2006.081430.
44. Shestakova T, Zhuravel E, Bolgova L, et al. Expression of human beta-defensins-1, 2 and 4 mRNA in human lung tumor tissue: a pilot study. Exp Oncol. 2008; 30(2):153–156.
45. Otte JM, Neumann HM, Brand S, et al. Expression of beta-defensin 4 is increased in human gastritis. Eur J Clin Invest. 2009; 39(2):126–138. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.02071.x.
46. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human beta-defensins. Cell Mol Life Sci. 2006; 63(11):1294–1313. DOI: 10.1007/s00018-005-5540-2.
47. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. Science. 1999; 286(5439):498–502. DOI: 10.1126/science.286.5439.498.
48. Leonova L, Kokryakov VN, Aleshina G, et al. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. J Leukoc Biol. 2001; 70(3):461–464.

49. Stegemann C, Tsvetkova EV, Aleshina GM, et al. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010; 24(5):599–604. DOI: 10.1002/rcm.4424.
50. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*. 1995; 374(1):1–5. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01050-o.
51. Kopitar M, Ritonja A, Popovic T, et al. A new type of low-molecular mass cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1989; 370(10):1145–1151. DOI:10.1515/bchm3.1989.370.2.1145.
52. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol*. 2005; 7(2):179–196.
53. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(12):10957–10970. DOI: 10.1007/s11033-012-1997-x.
54. Wang Y, Wang M, Shan A, et al. Avian host defense cathelicidins: structure, expression, biological functions, and potential therapeutic applications. *Poult Sci*. 2020; 99(12):6434–6445. DOI: 10.1016/j.psj.2020.09.030.
55. Graf M, Wilson DN. Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1117:73–89. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4_6.
56. Mercer DK, O'Neil DA. Innate Inspiration: Antifungal Peptides and Other Immunotherapeutics From the Host Immune Response. *Front Immunol*. 2020; 11:2177. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02177.
57. Mechkarska M, Ahmed E, Coquet L, et al. Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010; 152(4):467–472. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.07.007.
58. Wang J, Wong ES, Whitley JC, et al. Ancient antimicrobial peptides kill antibiotic-resistant pathogens: Australian mammals provide new options. *PLoS One*. 2011; 6(8):e24030. DOI: 10.1371/journal.pone.0024030.
59. Roque-Borda CA, da Silva PB, Rodrigues MC, et al. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics*. 2021; 13(6):773. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060773.
60. León-Buitimea A, Garza-Cárdenas CR, Garza-Cervantes JA, et al. The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Front Microbiol*. 2020; 11:1669. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01669.
61. Lohner K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen Physiol Biophys*. 2009; 28(2):105–116. DOI: 10.4149/gpb_2009_02_105.
62. Hollmann A, Martinez M, Maturana P, et al. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. *Front Chem*. 2018; 6:204. DOI: 10.3389/fchem.2018.00204.
63. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, et al. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*. 2020; 25(12):2850. DOI: 10.3390/molecules25122850.
64. Li J, Koh JJ, Liu S, et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci*. 2017; 11:73. doi: 10.3389/fnins.2017.00073.
65. Tuerkova A, Kabelka I, Králová T, et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *Elife*. 2020; 9:e47946. DOI: 10.7554/eLife.47946.
66. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(3):238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
67. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*. 1992; 31(49):12416–12423. DOI: 10.1021/bi00164a017.
68. Miteva M, Andersson M, Karshikoff A, et al. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett*. 1999; 462(1–2):155–158. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01520-3.
69. Le CF, Fang CM, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(4):e02340-16. DOI: 10.1128/AAC.02340-16.
70. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244(1):253–257. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8159.
71. Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(3):605–614. DOI: 10.1128/AAC.46.3.605-614.2002.
72. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*. 1989; 84(2):553–561. DOI: 10.1172/JCI114198.
73. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett*.

- 1998; 160(1):91–96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x.
74. Kragol G, Lovas S, Varadi G, et al. The anti-bacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*. 2001; 40(10):3016–3026. DOI: 10.1021/bi002656a.
75. Scocchi M, Lüthy C, Decarli P, et al. The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits in vitro the Molecular Chaperone DnaK. *Int J Pept Res Therapeut*. 2009; 15(2):147–155. DOI: 10.1007/s10989-009-9182-3.
76. Zahn M, Berthold N, Kieslich B, et al. Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK. *J Mol Biol*. 2013; 425(14):2463–2479. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.03.041.
77. Zahn M, Kieslich B, Berthold N, et al. Structural identification of DnaK binding sites within bovine and sheep batenecin Bac7. *Protein Pept Lett*. 2014; 21:407–412. DOI: 10.2174/09298665113206660111.
78. Krizsan A, Prah C, Goldbach T, et al. Short proline-rich antimicrobial peptides inhibit either the bacterial 70S ribosome or the assembly of its large 50S subunit. *Chembiochem*. 2015; 16(16):2304–2308. DOI: 10.1002/cbic.201500375.
79. Krizsan A, Volke D, Weinert S, et al. Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014; 53:12236–12239. DOI: 10.1002/anie.201407145.
80. Roy RN, Lomakin IB, Gagnon MG, et al. The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nat Struct Mol Biol*. 2015; 22:466–469. DOI: 10.1038/nsmb.3031.
81. Mardirossian M, Grzela R, Giglione C, et al. The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem Biol*. 2014; 21:1639–1647. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.10.009.
82. Mardirossian M, Barrière Q, Timchenko T, et al. Fragments of the Nonlytic Proline-Rich Antimicrobial Peptide Bac5 Kill *Escherichia coli* Cells by Inhibiting Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(8):e00534-18. DOI: 10.1128/AAC.00534-18.
83. Brötz H, Bierbaum G, Reynolds PE, et al. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem*. 1997; 246(1):193–199. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x.
84. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(4):321–332. DOI: 10.1038/nrd2004.
85. Liu SP, Zhou L, Lakshminarayanan R, et al. Multivalent Antimicrobial Peptides as Therapeutics: Design Principles and Structural Diversities. *Int J Pept Res Ther*. 2010; 16(3):199–213. DOI: 10.1007/s10989-010-9230-z.
86. Guilhemelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol*. 2013; 4:353. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00353.
87. Boehr DD, Draker KA, Koteva K, et al. Broad-spectrum peptide inhibitors of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes. *Chem Biol*. 2003; 10(2):189–196. DOI: 10.1016/s1074-5521(03)00026-7.
88. Wimley WC, Hristova K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J Membr Biol*. 2011; 239(1–2):27–34. DOI: 10.1007/s00232-011-9343-0.
89. Lichtenstein AK, Ganz T, Nguyen TM, et al. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. *J Immunol*. 1988; 140(8):2686–2694.
90. Lichtenstein A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J Clin Invest*. 1991; 88(1):93–100. DOI: 10.1172/JCI115310.
91. McKeown ST, Lundy FT, Nelson J, et al. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral Oncol*. 2006; 42(7):685–690. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.11.005.
92. Huang HJ, Ross CR, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol*. 1997; 61(5):624–629. DOI: 10.1002/jlb.61.5.624.
93. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol*. 2001; 167(11):6644–6653. DOI: 10.4049/jimmunol.167.11.6644.
94. Dürr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun*. 2002; 70(12):6515–6517. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6515-6517.2002.
95. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med*. 2000; 6(1):49–55. DOI: 10.1038/71527.
96. Kanazawa K, Okumura K, Ogawa H, et al. An antimicrobial peptide with angiogenic properties, AG-30/5C, activates human mast cells through the MAPK and NF- β B pathways. *Immunol Res*. 2016; 64(2):594–603. DOI: 10.1007/s12026-015-8759-5.
97. Koczulla R, Bals R. Cathelicidin antimicrobial peptides modulate angiogenesis. In: E. Deindl and C.

Kupatt eds. *Therapeutic Neovascularization-Quo Vadis?* Netherlands: Springer, 2007:191–196. DOI: 10.1007/1-4020-5955-8_10.

98. Takahashi M, Umehara Y, Yue H, et al. The Antimicrobial Peptide Human β -Defensin-3 Accelerates Wound Healing by Promoting Angiogenesis, Cell Migration, and Proliferation Through the FGFR/JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2021; 12:712781. DOI: 10.3389/fimmu.2021.712781.

99. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, et al. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84(6):2017–2020. DOI: 10.1172/JCI114394.

100. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, et al. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31(4):1066–1075. DOI: 10.1002/1521-4141(200104)31:4<1066::aid-immu1066>3.0.co;2-#.

101. Yoshioka M, Fukuishi N, Kubo Y, et al. Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(2):212–216. DOI: 10.1248/bpb.31.212.

102. Gupta K, Kotian A, Subramanian H, et al. Activation of human mast cells by retrocyclin and protegrin highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties. *Oncotarget.* 2015; 6(30):28573–28587. DOI: 10.18632/oncotarget.5611.

103. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol.* 2004; 172(2):1146–1156. DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.1146.

104. Fu L, Jin P, Hu Y, et al. KR12a6 promotes the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via BMP/SMAD signaling. *Mol Med Rep.* 2020; 21(1):61–68. DOI: 10.3892/mmr.2019.10843.

105. van der Does AM, Joosten SA, Vroomans E, et al. The antimicrobial peptide hLF1-11 drives monocyte-dendritic cell differentiation toward dendritic cells that promote antifungal responses and enhance Th17 polarization. *J Innate Immun.* 2012; 4(3):284–292. DOI: 10.1159/000332941.

106. Zhu QZ, Hu J, Mulay S, et al. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(2):592–596. DOI: 10.1073/pnas.85.2.592.

107. Zhu Q, Solomon S. Isolation and mode of action of rabbit corticostatic (antiadrenocorticotropin) peptides. *Endocrinology.* 1992; 130(3):1413–1423. DOI: 10.1210/endo.130.3.1311240.

108. Zhu QZ, Singh AV, Bateman A, et al. The corticostatic (anti-ACTH) and cytotoxic activity of pep-

tides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung. *J Steroid Biochem.* 1987; 27(4–6):1017–1022. DOI: 10.1016/0022-4731(87)90184-1.

109. Cho JH, Kim SC. Non-membrane targets of antimicrobial peptides: novel therapeutic opportunities? In: Wang G, ed. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies.* Wallingford: CABI Publishing, 2010: 128–140.

110. Mangoni ML. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(13):2157–2159. DOI: 10.1007/s00018-011-0709-3.

111. Alba A, López-Abarrategui C, Otero-González AJ. Host defense peptides: an alternative as anti-infective and immunomodulatory therapeutics. *Biopolymers.* 2012; 98(4):251–267. DOI: 10.1002/bip.22076.

112. Deslouches B, Steckbeck JD, Craigo JK, et al. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(6):2511–2521. DOI: 10.1128/AAC.02218-12.

113. Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12(12):1477–1486. DOI: 10.1586/14787210.2014.976613.

114. Mwangi J, Hao X, Lai R, et al. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res.* 2019; 40(6):488–505. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062.

115. Pletzer D, Hancock RE. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. *J Bacteriol.* 2016; 198(19):2572–2578. DOI: 10.1128/JB.00017-16.

116. Yasir M, Willcox MDP, Dutta D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel).* 2018; 11(12):2468. DOI: 10.3390/ma11122468.

117. Shahrour H, Ferrer-Espada R, Dandache I, et al. AMPs as Anti-biofilm Agents for Human Therapy and Prophylaxis. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1117:257–279. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4_14.

118. Piotrowska U, Sobczak M, Oledzka E. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides—Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(6):1079–1093. DOI: 10.1111/cbdd.13031.

119. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:194. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194.

120. Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, et al. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules.* 2018; 23(2):295. DOI: 10.3390/molecules23020295.

121. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, et al. Predicting drug resistance evolution: insights from antimi-

- crobial peptides and antibiotics. *Proc Biol Sci.* 2018; 285(1874):20172687. DOI: 10.1098/rspb.2017.2687.
122. Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial peptides and their analogs: searching for new potential therapeutics. *Perspect. Medicin. Chem.* 2014; 6:73–80. DOI: 10.4137/PMC.S13215.
 123. Koo HB, Seo J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Pept. Sci.* 2019; 111:e24122. DOI: 10.1002/pep2.24122.
 124. Rubinchik E, Dugourd D, Algara T, et al. Antimicrobial and antifungal activities of a novel cationic antimicrobial peptide, omiganan, in experimental skin colonisation models. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(5):457–461. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.05.003.
 125. Ming L, Huang JA. The Antibacterial Effects of Antimicrobial Peptides OP-145 against Clinically Isolated Multi-Resistant Strains. *Jpn J Infect Dis.* 2017; 70(6):601–603. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.090.
 126. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo).* 2013; 66(10):571–591. DOI: 10.1038/ja.2013.86.
 127. Ma JK, Drake PM, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(10):794–805. DOI: 10.1038/nrg1177.
 128. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):12628–12632. DOI: 10.1073/pnas.192301899.
 129. Chernysh SI. Insects defend themselves: molecules and cells of the immune response. *St. Petersburg University: Journal.* 2000; 20(3543):11–12. In Russian [Черныш С.И. Насекомые защищаются: молекулы и клетки иммунного ответа. Санкт-Петербургский университет : Журнал. 2000; 20(3543):11–12].
 130. Xiong YQ, Hady WA, Deslandes A, et al. Efficacy of NZ2114, a novel plectasin-derived cationic antimicrobial peptide antibiotic, in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11):5325–5330. DOI: 10.1128/AAC.00453-11.
 131. Breidenstein EB, Courvalin P, Meziane-Cherif D. Antimicrobial Activity of Plectasin NZ2114 in Combination with Cell Wall Targeting Antibiotics Against VanA-Type *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist.* 2015; 21(4):373–379. DOI: 10.1089/mdr.2014.0221.
 132. Zheng X, Wang X, Teng D, et al. Mode of action of plectasin-derived peptides against gas gangrene-associated *Clostridium perfringens* type A. *PLoS One.* 2017; 12(9):e0185215. DOI: 10.1371/journal.pone.0185215.
 133. Ostorhazi E, Holub MC, Rozgonyi F, et al. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37(5):480–484. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.003.
 134. Ostorhazi E, Horvath A, Szabo D, et al. Transdermally administered proline-arginine-rich host defense peptides show systemic efficacy in a lethal mouse bacteremia model. *Amino Acids.* 2017; 49(9):1647–1651. DOI: 10.1007/s00726-017-2457-7.
 135. Ostorhazi E, Voros E, Nemes-Nikodem E, et al. Rapid systemic and local treatments with the antibacterial peptide dimer A3-APO and its monomeric metabolite eliminate bacteria and reduce inflammation in intradermal lesions infected with *Propionibacterium acnes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42(6):537–543. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.08.001.
 136. Riool M, de Breij A, Drijfhout JW, et al. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. *Front Chem.* 2017; 5:63. DOI: 10.3389/fchem.2017.00063.
 137. Yu K, Alzahrani A, Khoddami S, et al. Rapid Assembly of Infection-Resistant Coatings: Screening and Identification of Antimicrobial Peptides Works in Cooperation with an Antifouling Background. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021; 13(31):36784–36799. DOI: 10.1021/acsami.1c07515.
 138. Shahid A, Aslam B, Muzammil S, et al. The prospects of antimicrobial coated medical implants. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2021; 19:22808000211040304. DOI: 10.1177/22808000211040304.
 139. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res.* 2005; 30(7):505–515. DOI: 10.1080/02713680590968637.
 140. Dijksteel GS, Ulrich MMW, Middelkoop E, et al. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front Microbiol.* 2021; 12:616979. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616979.
 141. Cassone M, Otvos L Jr. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8(6):703–716. DOI: 10.1586/eri.10.38.
 142. Ruden S, Rieder A, Chis Ster I, et al. Synergy Pattern of Short Cationic Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2019; 10:2740. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02740.
 143. Duong L., Gross S.P., Siryaporn A. Developing Antimicrobial Synergy With AMPs. *Front. Med. Technol.* 2021; 3:9. DOI: 10.3389/fmedt.2021.640981.
 144. Pollini S, Brunetti J, Sennati S, et al. Synergistic activity profile of an antimicrobial peptide against multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains of Gram-negative bacterial pathogens. *J Pept Sci.* 2017; 23(4):329–333. DOI: 10.1002/psc.2978.
 145. Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY, et al. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Im-

mune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9:128. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00128.

146. Kopeikin PM, Zharkova MS, Kolobov AA, et al. Caprine Bactenecins as Promising Tools for Developing New Antimicrobial and Antitumor Drugs. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:552905. DOI: 10.3389/fcimb.2020.552905.

Информация об авторах:

Шамова Ольга Валерьевна, д.б.н., чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», заведующий НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Жаркова Мария Сергеевна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», старший научный сотрудник НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Чернов Александр Николаевич, научный сотрудник отдела микробной терапии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Владимирова Елизавета Васильевна, младший научный сотрудник НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Сухарева Мария Сергеевна, младший научный сотрудник НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Комлев Алексей Сергеевич, младший научный сотрудник НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Коченда Ольга Леонидовна, лаборант-исследователь отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», лаборант-исследователь НИЛ альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Орлов Дмитрий Сергеевич, к.м.н., доцент, заведующий лабораторией иммунопатофизиологии отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ».

ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF INNATE IMMUNITY AS PROTOTYPES OF NEW AGENTS TO FIGHT ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA

**Shamova O. V.^{1, 2}, Zharkova M. S.^{1, 2}, Chernov A. N.^{1, 2},
Vladimirova E. V.¹, Sukhareva M. S.¹, Komlev A. S.¹,
Kochenda O. L.^{1, 2}, Orlov D. S.²**

¹World-Class Research Center for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Shamova Olga V.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str. 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
E-mail: shamova@iemspb.ru

Received day 20 September 2021;
accepted 25 October 2021.

ABSTRACT

The review represents the analysis of the literature data on antimicrobial peptides (AMPs) of the innate immune system as promising prototypes of new antibiotic agents for overcoming the antibiotic resistance of microorganisms. Structural and functional properties of these peptides are highlighted, information on the mechanisms of antimicrobial action and, briefly, on their effects on the cells of higher eukaryotes is provided. The advantages of AMPs in comparison with conventional antibiotics and the problems of practical application of AMPs are discussed. Examples of drugs developed based on AMPs that are at the stage of clinical trials are given, the necessity of creating new peptide drugs for medical application in the treatment of infectious diseases caused by antibiotic-resistant microorganisms is substantiated.

Key words: antibacterial action, antimicrobial peptides, clinical trials, infectious diseases, microbial resistance.

For citation: Shamova OV, Zharkova MS, Chernov AN, et al. Antimicrobial peptides of innate immunity as prototypes of new agents to fight antibiotic-resistant bacteria. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):146-172.

INTRODUCTION

In recent years, the resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics used in medicine has been growing rapidly. According to forecasts, by 2050, mortality from infections caused by antibiotic-resistant bacteria will reach 10 million people per year [1]. The problem of fighting hospital infections is particularly acute. Among the most dangerous representatives of such bacteria, assigned by the WHO to the 1st priority category, are multiresistant gram-negative bacteria of the genus *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and various species of Enterobacteriaceae family (including *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* and *Proteus*) resistant to carbapenems and other antibiotics [2]. This list provides guidelines for priority developments for research organizations. According to WHO guidelines, an urgent search for fundamentally new anti-infective medicines is needed, as well as the development of fundamental and applied scientific research related to the decoding of the natural anti-infective defense mechanisms of the body.

Bacteria that form biofilms are a particular problem, which greatly increases their resistance to chemotherapy [3–5]. The search for means to combat such bacteria is an urgent task of experimental and practical medicine.

Analogues of natural antimicrobial peptides (AMP) of the innate immunity system are currently considered as fundamentally new antibiotics due to the difficult formation of the resistance of microorganisms to these compounds and the absence of negative effects on the immune system, characteristic for some conventional antibiotics.

GENERAL CHARACTERISTICS AND STRUCTURAL CLASSIFICATION OF PEPTIDES

AMPs are known as molecules acting as the most important effector link in the system of innate immunity of animals [6–8]. In addition, peptides with antimicrobial activity are found not only in animals, but also in plants, fungi, bacteria [7, 9, 10]. These compounds are positively charged peptide molecules, which include 15–45 amino acid residues. The peptides in question were named antimicrobial due to the discovery of a wide range of antibiotic activity in these substances — these peptides inhibit the growth and development of gram-negative, gram-positive bacteria, fungi (including yeasts), parasites (including planarians and nematodes), and even viruses such as HIV and herpes virus [8, 11–17].

Antimicrobial peptides have a variety of primary structures and different conformations of molecules.

One of the classifications of AMPs is based on differences in their secondary structure and divides the known peptides into several main groups [18–20]:

- * peptides having an α -helix conformation;
- * linear peptides having an increased content of one or another amino acid in the composition of the molecule: peptides enriched with proline, tryptophan, histidine or glycine;

- * cystine-containing peptides are peptides having one, two or more disulfide bonds. This group usually includes peptides with a mixed structure, which, in addition to β -layers, also include spiral sections; as well as macrocyclic peptides closed in a ring by a peptide bond (θ - defensins RTD-1, -2, -3).

The vast majority of antimicrobial peptides are cationic molecules. However, several anionic peptides have been described [21, 22], for example, dermaseptin, a peptide found in the secretions of human sweat glands and exhibiting antibacterial and fungicidal activity — maximin H5 from the skin of toad *Bombina maxima* [23] and others.

MAIN GROUPS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN MAMMALS

Mammals have two main groups of antimicrobial peptides: a family of structurally related cystine-containing AMP defensins and a group of peptides with diverse structures that make up the family of cathelicidins [18, 24].

The existence of low molecular weight cationic proteins with antimicrobial action was first shown by American researchers Zeya and Spitznagel in the sixties [25], who discovered them in rabbit and guinea pig neutrophils and named them “lysosomal cationic proteins”. In our country, studies of these polypeptides were initiated at the Research Institute of Experimental Medicine and at the Department of Biochemistry of Leningrad University; their bactericidal and antiviral activity was demonstrated [26–30].

The term “defensins” as a definition of this group of substances was introduced in 1985 [31] with the beginning of a new period in the study of these peptides. The primary structure of defensins in rabbit [32], humans [31, 33], guinea pig [34] and rat [35] was deciphered. It is shown that they have universal antimicrobial activity, inactivating *in vitro* gram-positive, gram-negative bacteria, fungi, and some envelope viruses. Subsequently, these peptides were called α -defensins to emphasize their difference from other AMPs, similar in structure, but different in the nature of the closure of disulfide bonds, which in turn received the name β -defensins.

Four isoforms of α -defensins were isolated from human neutrophils, three of which HNP-1, HNP-2 and

HNP-3 differ from each other only in one N-terminal amino acid. HNP-4 is present in neutrophils in amounts one hundred times less than HNP 1-3 [14]. Peptides of this group were found not only in neutrophils, but also in human lymphocytes, natural killer cells [36], in epithelial cells of the genitourinary tract [37], although in much smaller quantities than in neutrophils. In addition, α -defensins, called HD-5 and HD-6, were found in intestinal crypts in Paneth cells [38].

Six human α -defensins are encoded by five DEFA genes localized on chromosome 8p23.1. Defensin HNP-2 differs from HNP-1 and HNP-3 by the absence of an N-terminal residue (alanine in HNP-1 or aspartic acid in HNP-3); thus, this defensin is a product of the DEFA1 gene encoding HNP-1, or DEFA3 encoding HNP-3, and is formed as a result of proteolytic cleavage of N-terminal residues of these peptides. 1×10^6 human neutrophils contain approximately 4-5 μg of defensins HNP-1-3, and about 250 mg of these AMPs are produced in the bone marrow every day during hematopoiesis in neutrophils [14].

While α -defensins are found mainly in phagocytes, and in many animal species (cats, dogs, horses, sheep and others) these peptides are completely absent, the peptides of the β -defensin group are more widespread. They are present in the epithelial cells of all studied mammalian species and have been identified in reptiles and birds; in addition, peptides similar in structure have also been found in fungi, plants, and bacteria.

28 genes encoding various β -defensins have been described in humans. Four main isoforms of these peptides are distinguished: HBD-1 is found in epithelial cells of the respiratory and genitourinary tract, keratinocytes, astrocytes, microglia [39, 40] and leukocytes; HbD-2 — in epithelial cells of the skin, respiratory, genitourinary, digestive tracts [41]; HbD-3 in various types of epithelial cells: its highest concentration was found in saliva and genitourinary tract it is also found in the liver, heart, placenta [42, 43]; HBD-4 is found in cells of the genitourinary and digestive tracts [44, 45]. HbD-1 biosynthesis is constitutive, HbD-2 and HbD-3 are inducible: the expression level of HbD2 and HbD3 genes increases when epithelial cells come into contact with microorganisms [46].

Another unusual group of defensins is cyclic θ -defensins. Peptides of this group were found in white blood cells of rhesus macaque [47, 48] and hamadryl baboon [49]. It has been shown that the RTD-1 peptide (rhesus θ -defensin 1) is a crosslinking product of two shortened α -defensins encoded by two different genes. The cyclic structure of θ -defensins makes them relatively insensitive to the presence of sodium chloride in the medium and allows for antimicrobial function at physiological concentrations of salts. Although humans

also have genes encoding θ -defensins, they are not expressed due to the presence of a stop codon in the DNA region responsible for the synthesis of the pre-part of these molecules.

Representatives of the family of cathelicidins were found in phagocyte granules, as well as in cells of various barrier epitheliums. Cathelicidins, unlike defensins, exhibit a wide structural diversity. These structurally different peptides are grouped into one family due to the fact that they are all formed from precursor molecules [50], which include a site region, homologous to the protein katelin (i. e., the inhibitor of cathepsin L, a protein with a mass of 11 kDa which was first isolated from pig leukocytes [51]). Precursor molecules do not show antimicrobial effects; a mature active peptide is formed only after cleavage of the prepro part by enzymes of activated neutrophils [52].

Cathelicidins have been found in human protective cells of mammals, birds, reptiles, and fish [52-54].

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEPTIDES

The spectrum of antimicrobial activity of AMPs depends on the peptide structure. Some AMPs have a wide spectrum of antibiotic effects and are active against gram-negative gram-positive bacteria, fungi. Other AMPs have a more limited spectrum of antimicrobial activity: for example, peptides enriched with proline inactivate mainly gram-negative bacteria [55]. A number of AMPs has fungicidal activity; it has been demonstrated for rabbit and human α -defensins, human β -defensins, histatins, protegrins and other peptides [8, 12, 14, 56]. Many peptides exhibit pronounced activity against strains of microorganisms resistant to most antibiotic drugs used in medicine [57-60]. These properties of peptides are due to the mechanism of their antimicrobial action, which will be discussed below.

Despite the huge structural diversity of the natural antimicrobial peptides described to date, all of them, as a rule, are cationic and amphipathic molecules in which hydrophilic and hydrophobic groups of amino acid residues are spatially separated. The presence of a positive charge allows them to bind electrostatically to the anionic components of microbial cell membranes (anionic phospholipids, lipopolysaccharides, teichoic acids), and due to their hydrophobic properties, embed in the lipid bilayers of membranes, which can cause irreversible damage to the structure of the bacterial membrane and disruption of its functions, and lead to the death of target cells [8, 18, 20, 61].

Thus, bacterial membranes are the target of the action of most natural AMPs. Currently, there is a large number of works in the literature dedicated to the study

of the action of antimicrobial peptides on artificial lipid membranes (monolayers, bilayers, liposomes), the composition of which is close to the lipid composition of bacterial membranes or eukaryotic cells. Although the mechanism of embedding antimicrobial peptides into the membranes of living cells has not yet been fully understood, experiments on model membranes resulted in data that have been analyzed, making it possible to propose several models of interaction of antibiotic peptides with lipid membranes [62].

The amphipathic nature of antimicrobial peptides is their key physicochemical property, important for the implementation of the process of embedding peptides into lipid membranes: hydrophobic regions are necessary to interact directly with the lipophilic phase of membranes, while hydrophilic regions either interact with negatively charged groups of phospholipids or are directed into the pore cavity.

At the first stage of AMP-membrane contact, peptides preferentially assume an orientation parallel to the membrane, electrostatically binding to negatively charged phosphate groups of phospholipids on the membrane surface [8, 62, 63]. At the same time, many peptides change their conformation during the transition from an aqueous medium to a lipid environment, in particular, many peptides from the α -helical group acquire an ordered α -helical structure precisely during adsorption on the membrane [64, 65].

Depending on the structure of peptides, the mechanism of membrane damage varies. It is also assumed that peptides can influence membranes by combining several different methods of action. According to classical ideas about the mechanism of violation of the structural integrity of membranes, peptides, being sorbed on its surface, reach a certain threshold concentration, after which their embedding into the membrane begins with the formation of a pore formed by peptide molecules (the “barrel assembly” model), or a pore composed of peptide and lipid molecules (a toroidal pore), or with the formation of micellar structures in the membrane (the “carpet” model) [19, 63, 64, 66].

The toroidal pore model assumes that peptide clusters acquire an orientation perpendicular to the membrane, bending it inward to form a pore and form a “passage” lined with hydrophilic groups (including heads of membrane phospholipids) directed into the cavity.

In the “barrel assembly” or “barrel riveting” model, the peptide molecules are reoriented, acting as “boards” (“rivets”) forming the walls of the “barrel”-pores, i.e. they form a cluster located perpendicular to the membrane surface, so that the hydrophobic regions of each peptide in the cluster are connected to the lipid core of the membrane, while the hydrophilic regions look into the cavity of the transmembrane pore formed.

In contrast to the models of pore formation, the “carpet” model assumes that peptide molecules located parallel to the lipid bilayer cover entire local areas like a carpet [67] and, when a sufficiently high concentration is reached, exhibit detergent-like activity, causing local violations of membrane integrity. Sections of the membrane can break into micelles, which can lead to the formation of pores. Intermediate compounds composed of lipid molecules bound to a peptide can also be formed.

A decrease in the thickness of the lipid bilayer in the presence of AMPs has also been described [19, 61] and is considered as one of the methods of action leading to disruption of the barrier function of membranes.

The adsorption of peptides on the membrane increases when they come into contact with oxidized phospholipids. In some cases, no significant damage to the membrane is detected when exposed to peptides, but the membrane potential of target cells drops sharply. A model of “electroporation” has also been proposed [19, 68], according to which the accumulation of peptides in the outer sheet of the lipid bilayer of the membrane leads to an increase in the membrane potential above the threshold value, which entails an increase in the permeability of the membrane to various molecules, including the peptides themselves.

Some AMPs at the lowest effective concentration do not cause membrane disintegration, and yet bacteria die. These peptides move through the membrane and accumulate inside cells, where they disrupt many important cellular processes, mediating cell death: inhibit nucleic acid synthesis, protein synthesis, enzymatic activity and cell wall synthesis [18, 66, 69].

For example, the frog antimicrobial peptide buforin penetrates the bacterial membrane without causing its destruction, and binds to DNA and RNA in the *E. coli* cytoplasm [70]. Similarly, some α -helical peptides, such as dermaseptin isolated from frog skin, or pleurocidin derivatives obtained from fish AMPs, cause inhibition of DNA and RNA synthesis without destabilizing the *E. coli* cell membrane [71]. Inhibition of nucleic acid synthesis has also been demonstrated for antimicrobial peptides from various structural classes, such as the human β -structure α -defensin HNP-1 [72] or the linear, tryptophan-enriched peptide of bovine neutrophils indolicidin [73].

In addition, it has been shown that some of these AMPs can affect protein synthesis. A decrease in the level of protein synthesis is observed, including under the action of pleurocidin and dermaseptin, PP-39 and indolicidin. Using the example of proline-rich insect AMP pyrrhocorycin, a mechanism for similar peptides has been revealed, according to which the peptide enters the target cell (*E. coli*) and binds to DnaK, a heat

shock protein that is involved in chaperone-dependent protein folding. The peptide inhibits ATP-ase activity of DnaK, disrupting the spatial convolution of protein molecules, which results in the accumulation of proteins with impaired conformation and cell death [74]. This activity was also confirmed for bovine bactenecin 7 and sheep bactenecin 7.5 [75–77]. For a number of proline-rich AMPs, including insect apidaecins and oncocins, as well as bovine bactencins 5 and 7, the possibility of blocking their translation on ribosomes due to binding to the 70S subunit (in the area of the exit tunnel) was also revealed [55, 78–82].

Antimicrobial peptides can also target the formation of structural components, such as the cell wall. The antibiotic nisin, in addition to its ability to form pores, can bind lipid 2, thus inhibiting cell wall synthesis [83]. Interestingly, the same stages of its biosynthesis process are the target of the action of the antibiotic vancomycin. However, it is assumed that nisin and vancomycin show their effect by interacting with different molecular parts within lipid 2, as a result of which the nisin peptide is also active against vancomycin-resistant bacteria [84].

Many researchers tend to think that the mechanism of action of each peptide may vary slightly, depending on the characteristics of the target cell. In addition, AMP can inactivate bacteria using two or more mechanisms of action, combining the destabilization of the cell membrane and the violation of intracellular processes. It is believed that AMP can act as a “multi-purpose” mechanism [85, 86], namely that peptides with a high positive charge of the molecule, in addition to disrupting bacterial membranes, penetrate microbial cells and bind to anionic compounds in the cytoplasm, such as nucleic acids or enzymes, thus interfering with the processes in which these molecules are involved. Thus, it has been shown that cationic peptides of various structural classes can bind and specifically inhibit the activity of aminoglycoside-modifying enzymes that contain an anion-binding pocket [87]. The high degree of complexity of such a mechanism and the multiplicity of antimicrobial targets are the reasons for the unlikely appearance and selection of mutants resistant to cationic peptides [86, 88].

In addition to the activity associated with the direct inactivation of bacteria, fungi and viruses, AMPs show a number of effects on the body's own cells. Many peptides have cytotoxicity against various tumor and normal eukaryotic cells [63, 89–91], act as chemoattractants for macrophages, neutrophils, immature dendritic cells [92–94], increase vascular permeability and stimulate their growth [95–98], cause mast cell degranulation [96, 99–102], affect cytodifferentiation [103–105], inhibit corticosterone production by the cells of the adrenal cortex *in vitro* [106–108].

DRUGS BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES

In light of the rapidly developing resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics used in the clinic and the increasingly acute problem of finding new effective antimicrobials, one of the attractive properties of AMPs of animal origin as candidates for the role of the latter is the high activity of many of them, also in relation to antibiotic-resistant clinical isolates of bacteria and fungi [109–114]. It has been shown that they are also efficient against biofilms, the formation of which is associated with a significant part of intractable chronic bacterial infections [115–117]. At the same time, the fact that some AMPs have not only antimicrobial, but also immunomodulatory activity mentioned in the previous section, makes these compounds especially promising for their development the basis of antibiotic drugs for the correction of various complicated pathological processes, including those accompanied by immunodeficiency states. In general, the proposed areas of practical use of AMPs are quite diverse and are associated with their use as direct antibiotic agents that cause the death of pathogenic microorganisms or transformed cells; as immunomodulating substances or as carriers of other medicinal compounds through cell membranes [12, 118–120]. At the same time, most of the current developments are related to the first opportunity.

The direct antimicrobial effect of most active AMPs is carried out in a short period of time — a few minutes, as it is associated with damage to the integrity of the membranes of bacteria. The labored development of resistance of microorganisms to AMPs in the wild is largely associated with this circumstance [60, 88, 121]. However, it is AMPs with pronounced membranolytic effects that are more often toxic to the body's own cells, which complicates the development of drugs directly based on these compounds. Therefore, the efforts of scientists are aimed at creating modifications of AMPs with an optimal combination of properties: high antimicrobial activity and low toxicity for the own body's cells.

Unfortunately, despite the progress in analyzing the relationship between the structure and activity of AMP in recent decades, attempts to develop structural analogues of AMP *de novo* using only computer modeling tools have had very limited success. The search for new natural peptides, for example, their isolation from animal leukocytes, remains relevant. Taking into account the long evolutionary selection, the appeal to natural sources often leads to the identification of structures of peptide molecules with promising properties from the point of view of practical application, and further mod-

ification is already under way on this basis.

To date, a number of AMP-based drugs have been developed, most of which are at various stages of clinical and preclinical trials. Many of them are based on natural peptides. For example, on the basis of the short tryptophan-rich cathelicidin, bovine indolicidin, Migenix has proposed the drugs MX-594AN (for the treatment of acne) and MBI-226 (omiganan; initially for use in catheter-associated infections) [122]. To date, omiganan has completed phase III clinical trials as a treatment for rosacea and is undergoing phase II as a drug against acne, atopic dermatitis and vaginal intraepithelial neoplasia [123, 124]. Another drug, P-113 (PAC-113), developed by Demegen on the basis of histatin 5 (one of the group of histidine-rich cationic peptides of saliva), has completed phase II clinical trials as a drug for oral cavity treatment in candidiasis in HIV patients [56, 123]. OctoPlus, a subsidiary of Dr. Reddy's Research has successfully completed phase II clinical trials of the 24-amino acid derivative of cathelicidin LL-37 OP-145 for the treatment of chronic middle ear infections [123, 125], and ProMore Pharma is conducting phase IIb trials of LL-37 itself as a drug against chronic ulcers of the lower extremities [123, 126].

It is also interesting to note the drugs developed by PLANTON GmbH based on human β -defensin 2 (HbD2), which are intended to be used in the treatment of atopic dermatitis; skin damage, burns and complications of infectious diseases, and pulmonary infections. It is noteworthy that recombinant peptide preparations are produced using biotechnological approaches that make it possible to produce a peptide in the tubers of transgenic potatoes, which significantly reduces the cost of drug production compared to the more commonly used production of peptides using cultured bacterial or eukaryotic cells [127].

On the basis of cytokine-like peptides of insects (larvae of the *Calliphoridae* family), the domestic drug Alloferon was developed, which is currently used in medical practice as a drug that stimulates the antiviral, antimicrobial and anticancer activity of the human immune system [128, 129].

Despite the modest success of implementation at the moment, interest in the possibilities of using AMPs does not weaken and the list is being updated with new drugs undergoing preclinical trials. Examples are the drug NZ2114 based on the beta-defensin-like peptide of the fungus *Pseudoplectania nigrella* plectazine, developed by Novozymes for the treatment of infections associated with antibiotic-resistant bacteria [130-132], or the drug A3-ARO, created on the basis of a proline-enriched peptide from insect hemolymph [133-135]. The latter peptide is interesting because, despite the low antibacterial activity *in vitro*, when used *in vivo* (on the model of skin

infection, respiratory tract infections in mice) shows high efficacy, exceeding the values of traditionally used antibiotics when administered intramuscularly or used in the form of an aerosol [133].

CONCLUSION

Even the analysis of the trials of drugs in progress makes it obvious that the researchers associate the closest prospects for applying AMPs in medicine with their use as topical agents: for the treatment of infected wounds, including burns, mucocutaneous infections, chronic trophic ulcers, in particular with diabetic foot syndrome, etc. In addition, the possibilities of including AMP in the composition of antibacterial coatings that can be used in the creation of various medical devices: catheters, stents, dental implants, etc. are being considered. [136—138]. Both of these areas allow reprioritizing to some extent a number of existing problems, such as collateral toxicity, targeted delivery issues or limited lifetime of free peptides in biological media [139, 140]. The probable lack of economic advantage in case of equal effectiveness of new peptide antibiotics in comparison with the drugs already in use remains an obstacle as well [16, 140].

Nevertheless, the prospect of using AMP-based drugs to solve more complex and global problems is still undoubtedly attractive. The totality of available data confirms the idea that these components of the innate immunity system in humans and animals exhibit a wide range of biological properties that are realized during various adaptive and protective processes, such as infection, inflammation, and distress. A deeper understanding of the underlying relationships and molecular mechanisms can make it possible to comprehensively realize the potential of AMPs not only as antimicrobial, but also as immunomodulatory agents.

In addition to the actual effectiveness against resistant bacteria, the effects of synergistic antimicrobial action with antibiotics of various nature have been shown for a number of AMPs in particular in cases where bacteria are resistant directly to antibiotics included in the combination [141-146]. In light of this, the development of combined antibiotic drugs for personalized therapy of infections caused by antibiotic-resistant bacteria is promising.

The choice in favor of potential AMP-based drugs may be appropriate in the case of severe hospital infections, when standard approaches to chemotherapy are ineffective and there is information about the spectrum of antibiotic-resistant pathogens in a particular patient. AMP-based drugs may also have an advantage in cases of complex action: peptides having also angiogenic and reparative effects alongside antimicrobial ones may additionally promote the healing of trophic ulcers, and peptides with additional antitumor properties may be

the optimal choice for the prevention and correction of infectious complications in cancer patients (against the background of a decrease in immune status, for example, during chemotherapy).

Thus, due to the outstanding potential of AMPs, the development of therapeutic drugs based on these compounds does not lose relevance, despite a number of difficult problems facing researchers.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- World Health Organization. No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections — Report to the Secretary-General of the United Nations. 2019. https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf (4 October 2021).
- World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> (4 October 2021).
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018; 81(1):7–11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, et al. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(2):59. DOI: 10.3390/antibiotics9020059.
- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013; (136):1–51. DOI: 10.1111/apm.12099.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009; 30(3):131–141. DOI: 10.1016/j.it.2008.12.003.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* 2016; 148(2):125–139. DOI: 10.1111/imm.12597.
- Kokryakov VN. Essays on innate immunity. Saint Petersburg: Nauka, 2006. 261 p. In Russian [Кокряков В.Н. Очерки о врождённом иммунитете. СПб: Наука, 2006. 261 с.].
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides.* 2012; 37(2):207–215. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.07.001.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol.* 2012; 32(2):143–171. DOI: 10.3109/07388551.2011.594423.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(11):2810–2816. DOI: 10.1681/ASN.2007050611.
- Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J.* 2009; 2:e1. DOI: 10.3134/ehthj.09.001.
- Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010; 1(5):440–464. DOI: 10.4161/viru.1.5.12983.
- Lehrer RI, Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev.* 2012; 245(1):84–112. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x.
- Wang G. Antimicrobial peptides: Discovery, design, and novel therapeutic strategies. Wallingford: CABI Publishing, 2010. 230 p.
- Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, et al. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(5):311–332. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
- Pachón-Ibáñez ME, Smani Y, Pachón J, et al. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41(3):323–342. DOI: 10.1093/femsre/fux012.
- Huan Y, Kong Q, Mou H, et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 2020; 11:582779. DOI: 10.3389/fmicb.2020.582779.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(9):464–472. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules.* 2018; 8(1):4. DOI: 10.3390/biom8010004.
- Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.* 2009; 10(6):585–606. DOI: 10.2174/138920309789630589.
- Phoenix DA, Dennison SR, Harris F. Antimicrobial Peptides. Singapore: Wiley-VCH, 2013. 231 p.
- Lai R, Liu H, Hui Lee W, et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(4):796–799. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00762-3.
- Dorin JR, McHugh BJ, Cox SL, et al. Chapter 30—Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, et al. eds. *Molecular Medical Microbiology.* 2nd ed. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2015:539–565. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00030-5.

25. Zeya HI, Spitznagel JK. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science*. 1963; 142(3595):1085–1087. DOI: 10.1126/science.142.3595.1085.
26. Ashmarin IP, Kokryakov VN, Lyzlova SN, et al. Interaction of cationic proteins of granules and myeloperoxidase of leukocytes. *Problems of medicinal chemistry (Biomedical chemistry since 2003)*. 1977; 3:534–537. In Russian [Ашмарин И.П., Кокряков В.Н., Лызлова С.Н., и др. Взаимодействие катионных белков гранул и миелопероксидазы лейкоцитов. *Вопросы медицинской химии (Биомедицинская химия с 2003)*. 1977; 3:534–537].
27. Kokryakov VN, Ashmarin IP, Pigarevsky VE. On the nature of some fractions of lysosomal cationic proteins of leukocytes. *Biochemistry*. 1973; 38(6):1276–1280. In Russian [Кокряков В.Н., Ашмарин И.П., Пигаревский В.Е. О природе некоторых фракций лизосомальных катионных белков лейкоцитов. *Биохимия*. 1973; 38(6):1276–1280].
28. Masing YuA. Neutrophilic granulocytes and the body's defense system. *Archive of pathology*. 1991; 9:70–73. In Russian [Мазинг Ю.А. Нейтрофильные гранулоциты и система защиты организма. *Архив патологии*. 1991; 9:70–73].
29. Pigarevsky VE, Ashmarin IP, Tolybekov AS, et al. On the in vitro effect of leukocyte and thymic giton and their fractions on the activity of the causative agent of meningopneumonia. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1975; 10:76–78. In Russian [Пигаревский В.Е., Ашмарин И.П., Толыбеков А.С., и др. О влиянии in vitro лейкоцитарного и тимусного гитона и их фракций на активность возбудителя менингопневмонии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1975; 10:76–78].
30. Pigarevsky VE, Kokryakov VN, Taros LYu, et al. Antiviral properties of defensins in experimental herpes infection. In: *Pathomorphology of tumors and background diseases*. Leningrad, 1989:122–124. In Russian [Пигаревский В.Е., Кокряков В.Н., Тарос Л.Ю., и др. Антивирусные свойства дефенсинов при экспериментальной герпетической инфекции. В кн.: *Патоморфология опухолей и фоновых заболеваний*. Л., 1989: 122–124].
31. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*. 1985; 76(4):1427–1435. DOI: 10.1172/JCI112120.
32. Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, et al. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem*. 1985; 260(8):4579–4584.
33. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, et al. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*. 1985; 76(4):1436–1439. DOI: 10.1172/JCI112121.
34. Selsted ME, Harwig SS. Purification, primary structure, and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. *Infect Immun*. 1987; 55(9):2281–2286. DOI: 10.1128/iai.55.9.2281-2286.1987.
35. Eisenhauer PB, Harwig SS, Szklarek D, et al. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect Immun*. 1989; 57(7):2021–2027. DOI: 10.1128/iai.57.7.2021-2027.1989.
36. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000; 96(9):3086–3093.
37. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*. 2005; 6(6):551–557. DOI: 10.1038/ni1206.
38. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem*. 1992; 267(32):23216–23225.
39. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, et al. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*. 1998; 101(8):1633–1642. DOI: 10.1172/JCI1861.
40. Nakayama K, Okamura N, Arai H, et al. Expression of human beta-defensin-1 in the choroid plexus. *Ann Neurol*. 1999; 45(5):685. DOI: 10.1002/1531-8249(199905)45:5<685::aid-ana25>3.0.co;2-6.
41. McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 16(3):343–349. DOI: 10.1165/ajrcmb.16.3.9070620.
42. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. 2001; 276(8):5707–5713. DOI: 10.1074/jbc.M008557200.
43. Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, et al. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem*. 2007; 53(4):757–765. DOI: 10.1373/clinchem.2006.081430.
44. Shestakova T, Zhuravel E, Bolgova L, et al. Expression of human beta-defensins-1, 2 and 4 mRNA in human lung tumor tissue: a pilot study. *Exp Oncol*. 2008; 30(2):153–156.
45. Otte JM, Neumann HM, Brand S, et al. Expression of beta-defensin 4 is increased in human gastritis. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39(2):126–138. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.02071.x.
46. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(11):1294–1313. DOI: 10.1007/s00018-005-5540-2.
47. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999; 286(5439):498–502. DOI: 10.1126/science.286.5439.498.

48. Leonova L, Kokryakov VN, Aleshina G, et al. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. *J Leukoc Biol.* 2001; 70(3):461–464.
49. Stegemann C, Tsvetkova EV, Aleshina GM, et al. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(5):599–604. DOI: 10.1002/rcm.4424.
50. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995; 374(1):1–5. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01050-o.
51. Kopitar M, Ritonja A, Popovic T, et al. A new type of low-molecular mass cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1989; 370(10):1145–1151. DOI:10.1515/bchm3.1989.370.2.1145.
52. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7(2):179–196.
53. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(12):10957–10970. DOI: 10.1007/s11033-012-1997-x.
54. Wang Y, Wang M, Shan A, et al. Avian host defense cathelicidins: structure, expression, biological functions, and potential therapeutic applications. *Poult Sci.* 2020; 99(12):6434–6445. DOI: 10.1016/j.psj.2020.09.030.
55. Graf M, Wilson DN. Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1117:73–89. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4_6.
56. Mercer DK, O'Neil DA. Innate Inspiration: Antifungal Peptides and Other Immunotherapeutics From the Host Immune Response. *Front Immunol.* 2020; 11:2177. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02177.
57. Mechkarska M, Ahmed E, Coquet L, et al. Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010; 152(4):467–472. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.07.007.
58. Wang J, Wong ES, Whitley JC, et al. Ancient antimicrobial peptides kill antibiotic-resistant pathogens: Australian mammals provide new options. *PLoS One.* 2011; 6(8):e24030. DOI: 10.1371/journal.pone.0024030.
59. Roque-Borda CA, da Silva PB, Rodrigues MC, et al. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics.* 2021; 13(6):773. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060773.
60. León-Buitimea A, Garza-Cárdenas CR, Garza-Cervantes JA, et al. The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Front Microbiol.* 2020; 11:1669. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01669.
61. Lohner K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen Physiol Biophys.* 2009; 28(2):105–116. DOI: 10.4149/gpb_2009_02_105.
62. Hollmann A, Martinez M, Maturana P, et al. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. *Front Chem.* 2018; 6:204. DOI: 10.3389/fchem.2018.00204.
63. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, et al. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules.* 2020; 25(12):2850. DOI: 10.3390/molecules25122850.
64. Li J, Koh JJ, Liu S, et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci.* 2017; 11:73. doi: 10.3389/fnins.2017.00073.
65. Tuerkova A, Kabelka I, Králová T, et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *Elife.* 2020; 9:e47946. DOI: 10.7554/eLife.47946.
66. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(3):238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
67. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* 1992; 31(49):12416–12423. DOI: 10.1021/bi00164a017.
68. Miteva M, Andersson M, Karshikoff A, et al. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.* 1999; 462(1–2):155–158. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01520-3.
69. Le CF, Fang CM, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(4):e02340-16. DOI: 10.1128/AAC.02340-16.
70. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 244(1):253–257. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8159.
71. Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(3):605–614. DOI: 10.1128/AAC.46.3.605-614.2002.
72. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* 1989; 84(2):553–561. DOI: 10.1172/JCI114198.

73. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 160(1):91–96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x.
74. Kragol G, Lovas S, Varadi G, et al. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry.* 2001; 40(10):3016–3026. DOI: 10.1021/bi002656a.
75. Scocchi M, Lüthy C, Decarli P, et al. The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits in vitro the Molecular Chaperone DnaK. *Int J Pept Res Therapeut.* 2009; 15(2):147–155. DOI: 10.1007/s10989-009-9182-3.
76. Zahn M, Berthold N, Kieslich B, et al. Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK. *J Mol Biol.* 2013; 425(14):2463–2479. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.03.041.
77. Zahn M, Kieslich B, Berthold N, et al. Structural identification of DnaK binding sites within bovine and sheep bactenecin Bac7. *Protein Pept Lett.* 2014; 21:407–412. DOI: 10.2174/09298665113206660111.
78. Krizsan A, Prah C, Goldbach T, et al. Short proline-rich antimicrobial peptides inhibit either the bacterial 70S ribosome or the assembly of its large 50S subunit. *Chembiochem.* 2015; 16(16):2304–2308. DOI: 10.1002/cbic.201500375.
79. Krizsan A, Volke D, Weinert S, et al. Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014; 53:12236–12239. DOI: 10.1002/anie.201407145.
80. Roy RN, Lomakin IB, Gagnon MG, et al. The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22:466–469. DOI: 10.1038/nsmb.3031.
81. Mardirossian M, Grzela R, Giglione C, et al. The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem Biol.* 2014; 21:1639–1647. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.10.009.
82. Mardirossian M, Barrière Q, Timchenko T, et al. Fragments of the Nonlytic Proline-Rich Antimicrobial Peptide Bac5 Kill *Escherichia coli* Cells by Inhibiting Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(8):e00534-18. DOI: 10.1128/AAC.00534-18.
83. Brötz H, Bierbaum G, Reynolds PE, et al. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem.* 1997; 246(1):193-199. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x.
84. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(4):321–332. DOI: 10.1038/nrd2004.
85. Liu SP, Zhou L, Lakshminarayanan R, et al. Multivalent Antimicrobial Peptides as Therapeutics: Design Principles and Structural Diversities. *Int J Pept Res Ther.* 2010; 16(3):199–213. DOI: 10.1007/s10989-010-9230-z.
86. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 2013; 4:353. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00353.
87. Boehr DD, Draker KA, Koteva K, et al. Broad-spectrum peptide inhibitors of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes. *Chem Biol.* 2003; 10(2):189–196. DOI: 10.1016/s1074-5521(03)00026-7.
88. Wimley WC, Hristova K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J Membr Biol.* 2011; 239(1–2):27–34. DOI: 10.1007/s00232-011-9343-0.
89. Lichtenstein AK, Ganz T, Nguyen TM, et al. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. *J Immunol.* 1988; 140(8):2686–2694.
90. Lichtenstein A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J Clin Invest.* 1991; 88(1):93–100. DOI: 10.1172/JCI115310.
91. McKeown ST, Lundy FT, Nelson J, et al. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral Oncol.* 2006; 42(7):685–690. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.11.005.
92. Huang HJ, Ross CR, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol.* 1997; 61(5):624–629. DOI: 10.1002/jlb.61.5.624.
93. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol.* 2001; 167(11):6644–6653. DOI: 10.4049/jimmunol.167.11.6644.
94. Dürr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6515–6517. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6515-6517.2002.
95. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med.* 2000; 6(1):49–55. DOI: 10.1038/71527.
96. Kanazawa K, Okumura K, Ogawa H, et al. An antimicrobial peptide with angiogenic properties, AG-30/5C, activates human mast cells through the MAPK and NF- β B pathways. *Immunol Res.* 2016; 64(2):594–603. DOI: 10.1007/s12026-015-8759-5.

97. Koczulla R, Bals R. Cathelicidin antimicrobial peptides modulate angiogenesis. In: E. Deindl and C. Kupatt eds. *Therapeutic Neovascularization-Quo Vadis?* Netherlands: Springer, 2007:191–196. DOI: 10.1007/1-4020-5955-8_10.
98. Takahashi M, Umehara Y, Yue H, et al. The Antimicrobial Peptide Human β -Defensin-3 Accelerates Wound Healing by Promoting Angiogenesis, Cell Migration, and Proliferation Through the FGFR/JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2021; 12:712781. DOI: 10.3389/fimmu.2021.712781.
99. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, et al. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84(6):2017–2020. DOI: 10.1172/JCI114394.
100. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, et al. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31(4):1066–1075. DOI: 10.1002/1521-4141(200104)31:4<1066::aid-immu1066>3.0.co;2-#.
101. Yoshioka M, Fukuishi N, Kubo Y, et al. Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(2):212–216. DOI: 10.1248/bpb.31.212.
102. Gupta K, Kotian A, Subramanian H, et al. Activation of human mast cells by retrocyclin and proteoglycan highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties. *Oncotarget.* 2015; 6(30):28573–28587. DOI: 10.18632/oncotarget.5611.
103. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol.* 2004; 172(2):1146–1156. DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.1146.
104. Fu L, Jin P, Hu Y, et al. KR12a6 promotes the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via BMP/SMAD signaling. *Mol Med Rep.* 2020; 21(1):61–68. DOI: 10.3892/mmr.2019.10843.
105. van der Does AM, Joosten SA, Vroomans E, et al. The antimicrobial peptide hLF1-11 drives monocyte-dendritic cell differentiation toward dendritic cells that promote antifungal responses and enhance Th17 polarization. *J Innate Immun.* 2012; 4(3):284–292. DOI: 10.1159/000332941.
106. Zhu QZ, Hu J, Mulay S, et al. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(2):592–596. DOI: 10.1073/pnas.85.2.592.
107. Zhu Q, Solomon S. Isolation and mode of action of rabbit corticostatic (antiadrenocorticotropin) peptides. *Endocrinology.* 1992; 130(3):1413–1423. DOI: 10.1210/endo.130.3.1311240.
108. Zhu QZ, Singh AV, Bateman A, et al. The corticostatic (anti-ACTH) and cytotoxic activity of peptides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung. *J Steroid Biochem.* 1987; 27(4–6):1017–1022. DOI: 10.1016/0022-4731(87)90184-1.
109. Cho JH, Kim SC. Non-membrane targets of antimicrobial peptides: novel therapeutic opportunities? In: Wang G, ed. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies.* Wallingford: CABI Publishing, 2010: 128–140.
110. Mangoni ML. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(13):2157–2159. DOI: 10.1007/s00018-011-0709-3.
111. Alba A, López-Abarrategui C, Otero-González AJ. Host defense peptides: an alternative as anti-infective and immunomodulatory therapeutics. *Biopolymers.* 2012; 98(4):251–267. DOI: 10.1002/bip.22076.
112. Deslouches B, Steckbeck JD, Craigo JK, et al. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(6):2511–2521. DOI: 10.1128/AAC.02218-12.
113. Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12(12):1477–1486. DOI: 10.1586/14787210.2014.976613.
114. Mwangi J, Hao X, Lai R, et al. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res.* 2019; 40(6):488–505. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062.
115. Pletzer D, Hancock RE. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. *J Bacteriol.* 2016; 198(19):2572–2578. DOI: 10.1128/JB.00017-16.
116. Yasir M, Willcox MDP, Dutta D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel).* 2018; 11(12):2468. DOI: 10.3390/ma11122468.
117. Shahrour H, Ferrer-Espada R, Dandache I, et al. AMPs as Anti-biofilm Agents for Human Therapy and Prophylaxis. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1117:257–279. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4_14.
118. Piotrowska U, Sobczak M, Oledzka E. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides-Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(6):1079–1093. DOI: 10.1111/cbdd.13031.
119. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:194. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194.
120. Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, et al. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules.* 2018; 23(2):295. DOI: 10.3390/molecules23020295.

121. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, et al. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proc Biol Sci.* 2018; 285(1874):20172687. DOI: 10.1098/rspb.2017.2687.
122. Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial peptides and their analogs: searching for new potential therapeutics. *Perspect. Medicin. Chem.* 2014; 6:73–80. DOI: 10.4137/PMC.S13215.
123. Koo HB, Seo J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Pept. Sci.* 2019; 111:e24122. DOI: 10.1002/pep2.24122.
124. Rubinchik E, Dugourd D, Algara T, et al. Antimicrobial and antifungal activities of a novel cationic antimicrobial peptide, omiganan, in experimental skin colonisation models. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(5):457–461. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.05.003.
125. Ming L, Huang JA. The Antibacterial Effects of Antimicrobial Peptides OP-145 against Clinically Isolated Multi-Resistant Strains. *Jpn J Infect Dis.* 2017; 70(6):601–603. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.090.
126. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo).* 2013; 66(10):571–591. DOI: 10.1038/ja.2013.86.
127. Ma JK, Drake PM, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(10):794–805. DOI: 10.1038/nrg1177.
128. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):12628–12632. DOI: 10.1073/pnas.192301899.
129. Chernysh SI. Insects defend themselves: molecules and cells of the immune response. *St. Petersburg University: Journal.* 2000; 20(3543):11–12. In Russian [Черныш С.И. Насекомые защищаются: молекулы и клетки иммунного ответа. Санкт-Петербургский университет : Журнал. 2000; 20(3543):11–12].
130. Xiong YQ, Hady WA, Deslandes A, et al. Efficacy of NZ2114, a novel plectasin-derived cationic antimicrobial peptide antibiotic, in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11):5325–5330. DOI: 10.1128/AAC.00453-11.
131. Breidenstein EB, Courvalin P, Meziane-Cherif D. Antimicrobial Activity of Plectasin NZ2114 in Combination with Cell Wall Targeting Antibiotics Against VanA-Type *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist.* 2015; 21(4):373–379. DOI: 10.1089/mdr.2014.0221.
132. Zheng X, Wang X, Teng D, et al. Mode of action of plectasin-derived peptides against gas gangrene-associated *Clostridium perfringens* type A. *PLoS One.* 2017; 12(9):e0185215. DOI: 10.1371/journal.pone.0185215.
133. Ostorhazi E, Holub MC, Rozgonyi F, et al. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37(5):480–484. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.003.
134. Ostorhazi E, Horvath A, Szabo D, et al. Transdermally administered proline-arginine-rich host defense peptides show systemic efficacy in a lethal mouse bacteremia model. *Amino Acids.* 2017; 49(9):1647–1651. DOI: 10.1007/s00726-017-2457-7.
135. Ostorhazi E, Voros E, Nemes-Nikodem E, et al. Rapid systemic and local treatments with the antibacterial peptide dimer A3-APO and its monomeric metabolite eliminate bacteria and reduce inflammation in intradermal lesions infected with *Propionibacterium acnes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42(6):537–543. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.08.001.
136. Riool M, de Breij A, Drijfhout JW, et al. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. *Front Chem.* 2017; 5:63. DOI: 10.3389/fchem.2017.00063.
137. Yu K, Alzahrani A, Khoddami S, et al. Rapid Assembly of Infection-Resistant Coatings: Screening and Identification of Antimicrobial Peptides Works in Cooperation with an Antifouling Background. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021; 13(31):36784–36799. DOI: 10.1021/acsami.1c07515.
138. Shahid A, Aslam B, Muzammil S, et al. The prospects of antimicrobial coated medical implants. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2021; 19:22808000211040304. DOI: 10.1177/22808000211040304.
139. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res.* 2005; 30(7):505–515. DOI: 10.1080/02713680590968637.
140. Dijksteel GS, Ulrich MMW, Middelkoop E, et al. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front Microbiol.* 2021; 12:616979. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616979.
141. Cassone M, Otvos L Jr. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8(6):703–716. DOI: 10.1586/eri.10.38.
142. Ruden S, Rieder A, Chis Ster I, et al. Synergy Pattern of Short Cationic Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2019; 10:2740. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02740.
143. Duong L., Gross S.P., Siryaporn A. Developing Antimicrobial Synergy With AMPs. *Front. Med. Technol.* 2021; 3:9. DOI: 10.3389/fmedt.2021.640981.
144. Pollini S, Brunetti J, Sennati S, et al. Synergistic activity profile of an antimicrobial peptide against multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains of Gram-negative bacterial pathogens. *J Pept Sci.* 2017; 23(4):329–333. DOI: 10.1002/psc.2978.

145. Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY, et al. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:128. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00128.

146. Kopeikin PM, Zharkova MS, Kolobov AA, et al. Caprine Bactenecins as Promising Tools for Developing New Antimicrobial and Antitumor Drugs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:552905. DOI: 10.3389/fcimb.2020.552905.

Author information:

Shamova Olga V., PhD, Corr. Member RAS – Deputy Director, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, Head of the laboratory of Alternative Antimicrobial Biopreparations, World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Zharkova Maria S., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Alternative Antimicrobial Biopreparations, World-Class Research Center for Personalized Medicine, Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine;

Chernov Alexander N., Researcher, Department of Microbial Therapy, World-Class Research for Personalized Medicine, Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental medicine;

Vladimirova Elizaveta V., Junior Researcher, Laboratory of Alternative Antimicrobial Biopreparations, World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Sukhareva Maria S., Junior Researcher, Laboratory of Alternative Antimicrobial Biopreparations, World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Komlev Aleksey S., Junior Researcher, Laboratory of Alternative Antimicrobial Biopreparations, World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Kochenda Olga L., Technician, Department of General Pathology and Pathophysiology FSBSI Institute of Experimental medicine, Research Laboratory Assistant at the Research Laboratory of Alternative Antimicrobial Biologicals, World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Orlov Dmitriy S., MD, PhD, Associate Professor, Head of the Laboratory of Immunopathophysiology, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.61:616.1-089

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК, ВЫЗВАННОГО КОНТРАСТИРОВАНИЕМ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ЧРЕСКОЖНЫЕ КОРОНАРНЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Лаврищева Ю. В.¹, Конради А. О.¹, Яковенко А. А.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Лаврищева Юлия Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: lavrischeva@gmail.com

Статья поступила в редакцию
04.10.2021 и принята к печати
02.11.2021.

РЕЗЮМЕ

В настоящее время наблюдается непрерывный рост числа интервенционных вмешательств в кардиологии с использованием рентгеноконтрастных веществ (РКВ), что зачастую приводит к такому грозному осложнению как контраст-индуцированное острое повреждение почек (КИ-ОПП). Проявления КИ-ОПП имеют все характеристики острого почечного повреждения (ОПП) и включают в себя абсолютное (более или равно 0,3 или более или равно 0,5 мг/дл) или относительное (более и равно 25 %) повышение сывороточного креатинина (sCr) по сравнению с исходными значениями, происходящее через 48-72 часа после внутрисосудистого введения РКВ.

Острое повреждение почек, вызванное контрастированием, является частым осложнением после внутрисосудистого введения йодсодержащих контрастных веществ и связано с увеличением длительности пребывания в стационаре и неблагоприятным отдаленным прогнозом, включая нежелательные сердечно-сосудистые события, а также полную потерю функции почек. КИ-ОПП встречается у 5-20 % госпитализированных пациентов, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам.

К сожалению, аналогов йодсодержащим РКВ в настоящее время не существует, в связи с чем актуальным остается о вопрос о поиске оптимальных биомаркеров КИ-ОПП с целью ранней диагностики и профилактики этого грозного осложнения.

Диагноз КИ-ОПП основан на повышении уровня креатинина в сыворотке крови, который является поздним биомаркером повреждения почек. В настоящее время идентифицированы новые и более ранние сывороточные и мочевые биомаркеры для диагностики повреждения почек, которые могут быть выявлены до момента повышения уровня креатинина в сыворотке крови.

В данной статье представлена информация о самых актуальных и современных биомаркерах КИ-ОПП.

Ключевые слова: биомаркеры, креатинин, острое повреждение почек, рентгеноконтрастные вещества, сердечно-сосудистые события, чрескожные коронарные вмешательства.

Для цитирования: Лаврищева Ю.В., Конради А.О., Яковенко А.А. Потенциальные биомаркеры острого повреждения почек, вызванного контрастированием у пациентов, перенесших чрескожные коронарные вмешательства. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2021;1(1):173-191.

Список сокращений: ЗПТ — заместительная почечная терапия, КИ-ОПП — острое повреждение почек, вызванное контрастированием, МК — мид-кин, ОПП — острое повреждение почек, РКВ — рентгеноконтрастные вещества, СКФ — скорость клубочковой фильтрации, ХБП — хроническая болезнь почек, ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство.

ВВЕДЕНИЕ

Острое повреждение почек, вызванное контрастированием (КИ-ОПП), является тяжелым осложнением воздействия рентгеноконтрастных веществ (РКВ), используемых в кардиологии с целью диагностики или при применении интервенционных методов лечения, и может быть связано с неблагоприятными краткосрочными и долгосрочными исходами [1, 2]. КИ-ОПП является третьей по частоте причиной внутрибольничного развития острого повреждения почек (ОПП) после снижения почечной перфузии (в рамках преренальной ОПП) и лекарственной нефротоксичности. Частота КИ-ОПП

колеблется до 20 % среди госпитализированных пациентов [2, 3]. КИ-ОПП обычно определяются как абсолютное (более или равно 0,3 или более или равно 0,5 мг/дл) или относительное (более и равно 25 %) повышение сывороточного креатинина (sCr) по сравнению с исходными значениями, происходящее через 48-72 часа после внутрисосудистого введения РКВ, и, достигая пика на 3-5 день, возвращается к исходному уровню в течение 10-14 день [1]. Такая динамика уровня креатинина не позволяет вовремя диагностировать КИ-ОПП. Кроме того, увеличение уровня креатинина сыворотки крови зависит не только от снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ), но и системного накопления sCr, вырабатываемого скелетными мышцами и не почечными факторами (возраст, пол, мышечная масса, состояние гидратации), что делает увеличение значения sCr неспецифическим для диагностики КИ-ОПП, в связи с чем в последнее время активно исследуются другие биомаркеры. В частности, растет интерес к наиболее чувствительным биомаркерам, позволяющим в более ранние сроки выявить повреждение почек, чем уровень sCr. Эти

биомаркеры можно разделить на 2 группы: 1) те, которые представляют изменения почечной функции [например, sCr или цистатин (Cys-C)], 2) те, которые отражают структурное повреждение почек [например, молекула 1 повреждения почек, интерлейкин-18 (ИЛ-18)]. В нескольких исследованиях сообщается о новых биомаркерах в моче/сыворотке крови, используемых для стратификации риска, диагностики и прогнозирования возможности КИ-ОПП. Комбинация функциональных биомаркеров и биомаркеров повреждения почек обеспечивает простой метод разделения пациентов с ОПП на 4 группы: 1) маркеры не меняются; 2) только повреждение; 3) только функциональные нарушения; 4) повреждение и функциональные нарушения [4]. Фактически использование новых биомаркеров повреждения почек было ограничено по нескольким причинам: поиск наиболее точных биомаркеров для каждого отдельного случая, неопределенность пороговых значений (которые могут отличаться в зависимости от условий), а также ограниченные клинические данные и финансовые затраты.

Характеристика оптимального биомаркера для определения КИ-ОПП: 1) скорость определения и специфичность для повреждения почек, вызванного контрастированием; 2) экономичность; 3) воз-

можность определения на субклинической фазе; 4) возможность мониторингирования биомаркера; 5) возможность стратификации риска и прогнозирования исхода почечного повреждения.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК, ВЫЗВАННОГО РЕНТГЕНОКОНТРАСТНЫМ ВЕЩЕСТВОМ

РКВ могут вызывать ОПП по двум основным механизмам: 1) цитотоксический эффект; 2) нарушение почечной гемодинамики [5, 6]. Цитотоксические эффекты РКВ включают: апоптоз, нарушение жизнеспособности клеток и повышение активности щеточной каймы и лизосомальных ферментов; фрагментацию клеточной ДНК; подавление сигнальных молекул, участвующих в выживании клеток, и усиление сигнальных молекул при гибели клеток, таких как члены N-концевой киназы p38 и c-Jun митоген-активированных протеинкиназ и ядерного фактора транскрипционного фактора kB, а также активация каспазы. Считается, что ядерный фактор kB и N-концевые киназы c-Jun участвуют в усилении регуляции провоспалительного IL-8. Дисбаланс между вазоконстрикторами и вазодилататорами является ведущим в патогене-



Рис. 1. Патопфизиология острого повреждения почек

незе КИ-ОПП. В действительности нарушение гемодинамики с увеличением почечного кровотока, скорости клубочковой фильтрации и темпа диуреза напрямую связаны с осмоляльностью РКВ. Из-за повышенной осмотической нагрузки больше натрия реабсорбируется канальцевыми клетками, что само по себе увеличивает потребление кислорода. После этого временного увеличения происходит уменьшение (с 10 до 25 %) почечного кровотока. Уменьшение кровотока, по-видимому, происходит под влиянием сосудорасширяющих веществ, таких как аденозин, оксид азота, предсердный натрийуретический пептид и простагландин E2. Также в патогенезе КИ-ОПП участвует увеличение продукции активных форм кислорода из-за снижения кровотока и повышенного потребления кислорода в мозговом веществе (рис. 1).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ

Креатинин

Креатинин является наиболее широко используемым эндогенным маркером скорости клубочковой фильтрации, продуцируемым с постоянной скоростью и свободно фильтрующимся в клубочках, при этом лишь от 10 до 40 % секретируется дистальными канальцами. Это удобный и дешевый маркер для измерения, но на его концентрацию влияют несколько факторов, включая возраст, пол, физические упражнения, лекарства, мышечную массу, статус питания и количество приемов пищи [1].

Увеличение sCr происходит через 24–72 часа после введения РКВ и достигает пика на 3–5 день, возвращаясь к исходному уровню в течение 10–14 дней. В дополнение к этой медленной кинетике, которая ограничивает его использование для ранней диагностики повреждения почек, sCr остается в пределах референсного интервала до тех пор, пока не будет потеряно 50 % почечной функции.

Микроальбуминурия

Микроальбуминурия — важный маркер изменения структуры и функции клубочков. Термин «микроальбуминурия» обозначает альбумин в моче в концентрации, которая ниже порога определения альбумина с помощью обычных индикаторных полосок для определения мочи. Его значение колеблется от 30 до 300 мг/л [7]. Микроальбуминурия использовалась в качестве биомаркера в исследовании профилактики КИ-ОПП с N-ацетилцистеином [8]. Ограничением использования микроальбуминурии как маркера ОПП является его присутствие не только при острых, но и при хронических со-

стояниях, таких как сахарный диабет, заболевания крови, хронической болезни почек и др.

Цистатин С (Cys-C)

Цистатин С — это функциональный биомаркер клубочковой фильтрации, более чувствительный, чем sCr, для выявления острых (в течение 24 часов) изменений функции почек. Это белок 13 кДа, член семейства ингибиторов цистеиновых протеиназ, который присутствует во всех ядродержащих клетках. Cys-C фильтруется клубочками и затем метаболизируется в клетках проксимальных почечных канальцев после опосредованного мегалином эндоцитоза [9]. Cys-C не секретируется проксимальными почечными канальцами. Все клетки тела, содержащие ядра, производят цистатин С со стабильной скоростью. Таким образом, концентрация цистатина С в крови коррелирует со скоростью клубочковой фильтрации [10, 11]. Уровень белка в крови не зависит от массы тела и роста, от мышечной массы и пола.

По этим причинам Cys-C может быть полезным маркером для выявления как хронических, так и острых изменений СКФ [12, 13]. Кроме того, Cys-C распределяется во внеклеточной жидкости, тогда как sCr распределяется в воде всего тела, объем которой в 3 раза больше [14, 15]. Таким образом, при снижении СКФ содержание Cys-C в сыворотке увеличивается быстрее, чем sCr [16, 17].

Было показано, что при КИ-ОПП пик уровня Cys-C в сыворотке крови достигается уже через 24 часа после введения РКВ, что позволяет выявлять даже незначительные изменения СКФ [18–20].

Brigoori C. и коллеги продемонстрировали, что у 410 пациентов с хроническим заболеванием почек, перенесших коронарную и / или периферическую ангиографию и / или ангиопластику, повышение концентрации Cys-C в сыворотке более или равное 10 % через 24 часа после воздействия РКВ было связано с увеличением sCr больше или равное 0,3 мг/дл и было независимым предиктором серьезных последствий в течение 1 года, включая смерть и заместительную почечную терапию (ЗПТ). Вместе с тем повышение уровня Cys-C в сыворотке менее чем на 10 % за 24 часа исключало КИ-ОПП [21].

Бета-2-микроглобулин (B2M, B₂M, Thymotaxin, Beta₂-Microglobulin).

Бета-2-микроглобулин представляет собой белок 11,8 кДж, который фильтруется клубочками и реабсорбируется проксимальными канальцами почек [22]. Хотя низкие уровни бета-2-микроальбумина обнаруживаются в моче и сыворотке здоровых людей, после повреждения почек его уровень

повышается из-за снижения реабсорбции поврежденными канальцами.

В частности, исходный уровень бета-2-микроглобулина в сыворотке является важным предиктором КИ-ОПП. Nozue и его коллеги включили 96 пациентов со стабильной стенокардией, перенесших плановое чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) [23].

Они измерили сывороточный Cys-C и b2M, а также белок, связывающий жирные кислоты в печени (FABP), b2M и N-ацетил- β -D-глюкозамид (NAG) до и через 1 день после ЧКВ. У пациентов с КИ-ОПП (5 %) исходные уровни сывороточного b2M и Cys-C были значительно выше, чем у пациентов без КИ-ОПП ($4,2 \pm 2,6$ против $2,2 \pm 1,0$ мг/л, $P = 0,0007$ и $(1,51 \pm 0,52)$ против $1,11 \pm 0,34$ мг/л, $P = 0,013$ соответственно).

Базовый уровень b2M $> 1,26$ мг/дл показал чувствительность 75 % и специфичность 80 % в прогнозировании КИ-ОПП. Сходные результаты были получены Li и его коллегами, которые рандомизировали 424 пациента, подвергшихся воздействию РКВ [24].

КИ-ОПП определялся как повышение уровня sCr на 25 % или выше или на 0,5 мг/дл выше от исходного уровня в течение 48 часов. Уровень b2M, Cys-C и креатинина в сыворотке измеряли через 0, 24 и 48 часов после коронарной ангиографии.

Перед использованием РКВ риск КИ-ОПП прогнозировался как исходным уровнем b2M, так и CysC. После введения РКВ КИ-ОПП определяли по уровню b2M, Cys-C, креатинина и СКФ. Однако многомерный регрессионный анализ подтвердил, что исходный уровень b2M, Cys-C, креатинина и расчетной СКФ были независимыми предикторами КИ-ОПП.

Ретинол-связывающий белок [Retinol-Binding protein (RBP)].

Ретинол-связывающий белок (RBP) представляет собой белок 21 кДа, который фильтруется клубочками и реабсорбируется проксимальными канальцами. Было показано, что это адекватный маркер диагностики ОПП; в частности, уровни RBP в моче до и после используются для оценки эффективности метода профилактики ОПП с помощью N-ацетилцистеина [25].

БИОМАРКЕРЫ СТРУКТУРНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК

N-ацетил- β -d-глюкозамид (NAG)

N-ацетил- β -d-глюкозамид (NAG) представляет собой лизосомальный фермент (>130 кДа), который

продуцируется клетками проксимальных канальцев почек. У здоровых людей NAG присутствует в моче в небольших количествах. Повреждение почечного канальца приводит к увеличению его концентрации в моче из-за того, что он не фильтруется клубочками из-за большого веса. Однако повышенные уровни NAG в моче также могут быть результатом повышенной лизосомальной активности без разрушения клеток [26].

Andreucci M. и коллеги включили 590 пациентов, которым была выполнена коронарная ангиография как по поводу стабильной, так и нестабильной ишемической болезни сердца [27]. Образцы NAG в моче, осмоляльность и sCr были взяты до и через 1, 2 и 6 дней после введения низкоосмолярного неионогенного РКВ. КИ-ОПП возник у 33 пациентов. У этих пациентов уровни NAG и sCr в моче в дни 1 и 2 были значительно выше, чем на исходном уровне, и по сравнению с пациентами без КИ-ОПП. Уровни NAG в моче достигали пика раньше и росли намного быстрее, чем уровни sCr у пациентов с КИ-ОПП.

Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL)

Липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), представляет собой белок 25 кДа, связанный с желатиназой нейтрофилов человека, который принадлежит к суперсемейству липокалинов [28]. Мономерная (в основном) и гетеродимерная формы являются преобладающими формами, продуцируемыми канальцами [29]. NGAL фильтруется клубочками, а затем реабсорбируется проксимальными канальцами, где он частично расщепляется мегалином и частично выводится с мочой. Концентрация NGAL у здорового человека составляет 20 нг/мл как в сыворотке, так и в моче. После повреждения клеток почечных канальцев NGAL выделяется в плазму и мочу; это вызывает повышение его концентрации в плазме и моче намного раньше, чем повышение концентрации sCr [30]. Таким образом, NGAL можно рассматривать как достаточно информативный и независимый маркер ОПП [31-33].

Согласно различным источникам, имеются данные о потенциальной роли NGAL, как надежного и прогностического маркера ОПП, поскольку его уровни в сыворотке и моче повышаются раньше, чем sCr. Некоторые исследователи говорят о том, что уровень NGAL в плазме менее специфичен, чем его концентрация в моче [34, 35].

Молекула повреждения почек 1 (KIM-1)

Молекула повреждения почек 1 (KIM-1), трансмембранный гликопротеин 1 типа, призна-

на потенциальным биомаркером для выявления ишемического или токсического повреждения проксимальных канальцев [36, 37]. Внеклеточный домен KIM-1 отделяется от поверхности клетки за счет металлопротеиназ-зависимого процесса. Это выделение с повышенным синтезом KIM-1, скорее всего, является причиной повышенного высвобождения KIM-1 с мочой на фоне ОПП [38, 39]. Использование мочевого KIM-1 в качестве биомаркера ОПП основано на том факте, что у здоровых людей не происходит экспрессии KIM-1 и его активации в апикальной клеточной мембране канальцев, как во время ОПП.

Liao В. и коллеги провели исследование, в которое было включено 3200 пациентов без хронической болезни почек (ХБП), которым была проведена коронарография. КИ-ОПП определялся как повышение сывороточного креатинина на 0,3 мг/дл от исходного уровня [40]. Уровни KIM-1 измеряли до, а также через 6 и 48 часов после воздействия РКВ [40]. Авторы заметили, что уровни KIM-1 через 6 и 48 часов, по сравнению с исходным уровнем, значительно повышались у пациентов с КИ-ОПП, но не в контрольной группе.

Роль KIM-1 как раннего биомаркера КИ-ОПП была подтверждена также у 145 пациентов с сахарным диабетом, подвергшихся воздействию РКВ [41]. У этих пациентов уровни sCr были измерены до и после 24-48 часов после введения РКВ. Значения KIM-1 в моче оценивали на исходном уровне и в течение 2, 6, 12, 24 и 48 часов после применения РКВ. Всего у 19 пациентов развилась КИ-ОПП, которую диагностировали по уровню sCr. Наблюдалась значительная разница между уровнями KIM-1 в моче, измеренными через 2, 6, 12, 24 часов после процедуры, и уровнями до процедуры в группе КИ-ОПП. Не наблюдалось никакой разницы в уровне sCr, измеренном до и после 24 часов после процедуры. Не так давно Wybraniec М. Т. и коллеги показали, что уровень KIM-1 в моче, превышающий 0,425 нг/мл через 6 часов после введения РКВ, с высокой чувствительностью и специфичностью предсказывает КИ-ОПП у пациентов, перенесших коронарную ангиографию [42].

Мочевой интерлейкин-18 (IL-18)

IL-18 представляет собой цитокин, повышающийся в проксимальных канальцах почек у пациентов с ОПП, и образуется из предшественника IL-18 под действием каспазы-1 [43]. Уровни IL-18 в моче повышаются при остром некрозе канальцев, но не при прerenальной ОПП. Это чувствительный и специфический биомаркер ОПП [36]. Метаанализ 23 исследований продемонстрировал, что IL-18

в моче является надежным биомаркером ОПП у пациентов, перенесших кардиохирургические операции, госпитализированных в отделения интенсивной терапии и кардиологические отделения [44-48].

Белок, связывающий жирные кислоты, печеночная форма (L-FABP)

Белок, связывающий жирные кислоты печеночного типа (L-FABP), экспрессируется в проксимальных канальцах почек человека и участвует в метаболизме жирных кислот [49]. В почках обнаружены два типа FABP: L-FABP, расположенный в проксимальных извитых и прямых канальцах почек (он также может реабсорбироваться из клубочкового фильтрата через мегалин, мультигандный эндцитарный рецептор проксимальных канальцев), и FABP сердечного типа, который не обнаруживается в моче. Таким образом, только L-FABP был одобрен в качестве биомаркера повреждения канальцев.

В промоторной области гена L-FABP присутствует элемент, реагирующий на гипоксию, и в некоторых исследованиях сообщалось, что концентрация L-FABP в моче увеличивалась параллельно со снижением перитубулярного кровотока, таким образом, L-FABP может определяться при изменении почечной гемодинамики после введения РКВ. Некоторые исследования показали, что исходные уровни L-FABP в моче коррелировали с возникновением КИ-ОПП [50].

Hishikari К. и коллеги сравнили уровни L-FABP в моче до и после коронарной ангиографии у 66 пациентов с sCr от 1,2 до 2,5 мг/дл и у 30 добровольцев [51]. Перед ангиографией уровни L-FABP были значительно выше у 13 пациентов, у которых в дальнейшем повысился уровень sCr и развилась КИ-ОПП. В частности, Menez S. и коллеги обнаружили, что уровень Cr в моче, превышающий или равный 24,5 мг/г до воздействия РКВ, был независимым предиктором КИ-ОПП [52]. Кроме того, измерение изменения уровня L-FABP в моче до и через 24 часа после процедуры катетеризации сердца у пациентов с почечной дисфункцией легкой и средней степени тяжести может являться важным показателем стратификации риска дебюта сердечно-сосудистых событий [53].

Мидкин (МК)

Мидкин (МК) представляет собой гепарин-связывающий фактор роста 13 кДа с различными биологическими функциями, такими как миграция воспалительных клеток и антиапоптотический эффект [54]. В почках МК экспрессируется как в клетках проксимальных канальцев, так и в эпителиальных клетках дистальных канальцев и в мень-

шей степени в эндотелиальных клетках и индуцируется окислительным стрессом через активацию фактора 1-альфа, вызванного гипоксией [54]. Патологические роли МК разнообразны, от возникновения ОПП до прогрессирования ХБП [55].

Malyszko J. и коллеги провели исследование, целью которого было уточнить, может ли МК представлять собой ранний биомаркер КИ-ОПП [56]. Обследовано 89 пациентов с нормальным уровнем sCr, перенесших ЧКВ. МК сыворотки оценивали на исходном уровне и через 2, 4, 8, 24 и 48 часов после введения РКВ, перенесших ЧКВ; sCr оценивали до и через 24 и 48 часов после введения РКВ. КИ-ОПП был определен как увеличение sCr более чем на 25 % от исходного уровня через 48 часов после ЧКВ и имело место у 10 % пациентов. У этих пациентов с КИ-ОПП значительное повышение уровня МК в сыворотке наблюдалось через 2 часа ($P < 0,0019$) и через 4 часа после воздействия РКВ; МК возвращался к исходному значению через 24 часа. В этом же исследовании уровни NGAL были значительно выше через 2 часа (sNGAL) или 4 часа (uNGAL) после ЧКВ. Cys-C был выше через 8 и 24 часа после ЧКВ у пациентов с КИ-ОПП.

Dickkopf-3 (DKK3)

Новый биомаркер для диагностики прогрессирующего тубулоинтерстициального фиброза. DKK3 относится к семейству гликопротеинов (DKK1-4), которые, прежде всего, модулируют сигнальный

путь Wnt. Этот сигнальный путь задействован в различных функциях клеток, таких, например, как пролиферация, миграция и экспрессия генов фиброгенных цитокинов. Ряд экспериментальных исследований показали, что сигнальный путь Wnt также участвует в прогрессировании хронического заболевания почек [57]. DKK3 высвобождается из «стрессовых» канальцевых клеток в моче. Таким образом, значительное поражение почек выявляется на ранней стадии. Недостатком данного метода может являться то, что данный метод идеально подходит в качестве дополнительной информации к СКФ, но более актуален для пациентов с хронической болезнью почек (рис. 2).

ДРУГИЕ БИОМАРКЕРЫ

Белок 7, связывающий инсулиноподобный фактор роста, и тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 — это 2 белка, участвующие в остановке клеточного цикла, которые могут быть предикторами ОПП. Фактически остановка клеточного цикла может быть результатом повреждения клеток, вызванного РКВ [54].

Гамма-глутамилтранспептидаза (GGT) — это фермент на щеточной кайме проксимальных канальцев почек, который появляется в моче при повреждении щеточной каймы. Повышенные исходные уровни GGT могут предсказывать CI-AKI [34, 57].

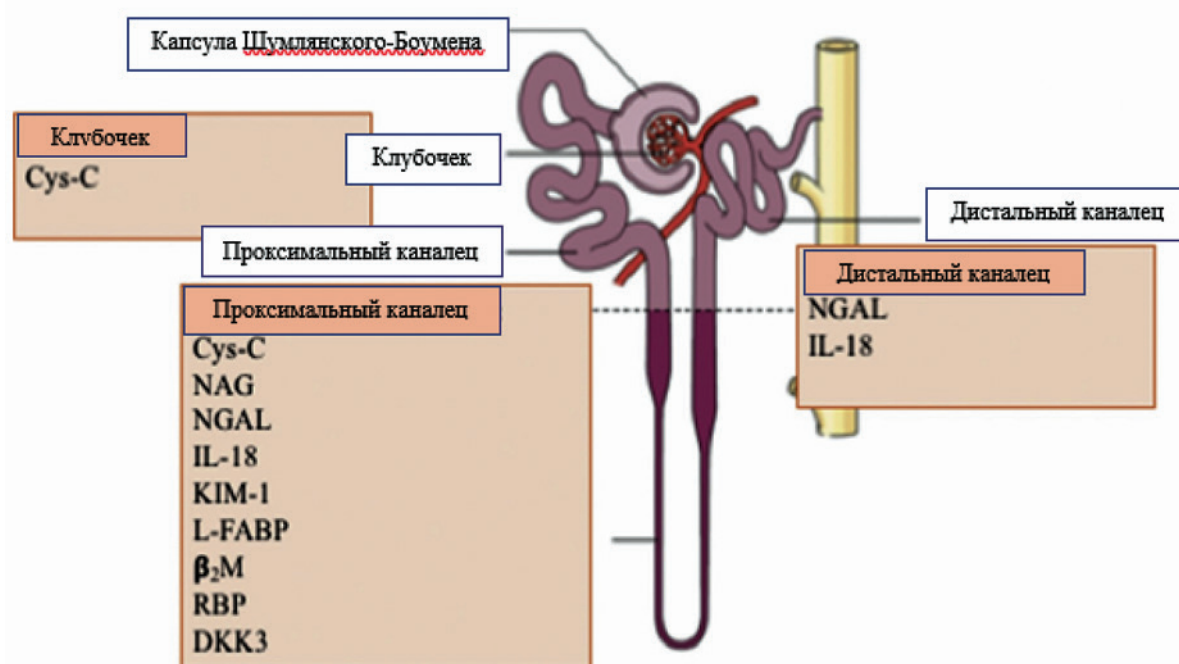


Рис. 2. Высвобождение биомаркеров КИ-ОПП в различных частях нефрона

МикроРНК (miRNA) представляет собой молекулы, участвующие в пролиферации, дифференцировке и гибели клеток, а также в воспалении, что предполагает их участие в патогенезе КИ-ОПП [58]. Молекулы miRNA обладают преимуществом их стабильности в сыворотке, моче и слюне.

ВЫВОДЫ

КИ-ОПП — одна из наиболее частых причин, после проведения чрескожных коронарных вмешательств, связанная с длительным пребыванием в стационаре и неблагоприятными исходами, включая различные неблагоприятные сердечно-сосудистые исходы и потерю функции почек вплоть до терминальной стадии. Учитывая непрерывный рост числа выполняемых ЧКВ с использованием РКВ, частота КИ-ОПП будет непрерывно расти. Также наблюдается увеличение числа коморбидных пациентов, имеющих эндокринологическую патологию, хроническую болезнь почек, что также увеличивает риск возникновения КИ-ОПП. В настоящее время в клинической практике sCr по-прежнему широко используется в качестве маркера повреждения почек несмотря на то, что его повышение носит отсроченный характер и его концентрация может зависеть от возраста, увеличения мышечной массы и сопутствующей терапии. В связи с этим возникла необходимость поиска новых ранних биомаркеров почечного повреждения.

В последнее время выявлено несколько многообещающих биомаркеров, которые предположительно могут являться предикторами повреждения почек у кардиологических пациентов до момента повышения sCr. Наиболее многообещающими маркерами КИ-ОПП являются Cys-C, NGAL, KI-1, IL-18 и L-FABP, так как их использование может помочь в диагностике острого повреждения почек в субклинической фазе заболевания. Однако остаются нерешенными некоторые вопросы относительно точности и надежности этих новых биомаркеров в контексте контраст-индуцированной нефропатии.

Желательно идеальный биомаркер должен быть не инвазивным, обнаруживаемым на ранней стадии заболевания, прогностически значимым, и, что наиболее важно, он должен быть специфичным для поражения почек при использовании РКВ и иметь патофизиологическую корреляцию с заболеванием. Следовательно, для поиска идеального биомаркера необходимо провести многоцентровое клиническое исследование, чтобы выяснить потенциал этих биомаркеров у разных групп пациентов.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tehrani S, Laing C, Yellon DM, et al. Contrast-induced acute kidney injury following PCI. *Eur J Clin Invest*. 2013;43:483–90. DOI: 10.1111/eci.12061.
2. Santiago G, Byungsoo K, Selcuk A. Contrast-Induced Nephropathy and Risk of Acute Kidney Injury and Mortality After Cardiac Operations. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2012;94(3):772–6. DOI: 10.1016/S0002-9343(97)00150-2.
3. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicentre study. *JAMA*. 2005;294(7):813–8. DOI: 10.1001/jama.294.7.813.
4. McCullough PA, Shaw AD, Haase M, et al. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth acute dialysis quality initiative consensus conference. *Contrib Nephrol*. 2013;182:13–29. DOI: 10.1159/000349963.
5. D'Amore C, Nuzzo S, Briguori C. Biomarkers of Contrast-Induced Nephropathy: Which Ones are Clinically Important? *Intervent Cardiol Clin*. 2020;9:335–44. DOI: 10.1016/j.iccl.2020.02.004.
6. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(1):288–96. DOI: 10.2215/CJN.02600607.
7. Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*. 2008;245:182–93. DOI: 10.1016/j.tox.2007.12.024.
8. Chousterman BG, Bouadma L, Moutereau S, et al. Prevention of contrast-induced nephropathy by N-acetylcysteine in critically ill patients: different definitions, different results. *J Crit Care*. 2013;28(5):701–9. DOI: 10.1016/j.jcrc.2013.03.007.
9. Weyer K, Nielsen R, Petersen SV, et al. Renal uptake of ^{99m}Tc-dimercaptosuccinic acid is dependent on normal proximal tubule receptor-mediated endocytosis. *J Nucl Med*. 2013;54(1):159–65. DOI: 10.2967/jnumed.112.110528.
10. Ghys LF, Meyer E, Paepe D, et al. Analytical validation of a human particle-enhanced nephelometric assay for cystatin C measurement in feline serum and urine. *Vet Clin Pathol*. 2014;43(2):226–34. DOI: 10.1111/vcp.12144.
11. Obiols J, Bargnoux AS, Kuster N, et al. Validation of a new standardized cystatin C turbidimetric assay: evaluation of the three novel CKD-EPI equations in hypertensive patients. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1542–7. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.056.
12. Schaeffner E. Determining the Glomerular Filtration Rate—An Overview. *J Ren Nutr*. 2017;27(6):375–80. DOI: 10.1053/j.jrn.2017.07.005.

13. Gaygisiz Ü, Aydoğdu M, Badoğlu M, et al. Can admission serum cystatin C level be an early marker subclinical acute kidney injury in critical care patients? *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(2):143-50. DOI: 10.3109/00365513.2015.1126854.
14. Shams E, Mayrovitz HN. Contrast-Induced Nephropathy: A Review of Mechanisms and Risks. *Cureus.* 2021;13(5):e14842. DOI: 10.7759/cureus.14842.
15. He Y, Deng Y, Zhuang K, et al. Predictive value of cystatin C and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in contrast-induced nephropathy: A meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0230934. DOI: 10.1371/journal.pone.0230934.
16. Wang ZY, Wang YL, Wei J, et al. Role of serum cystatin C in the prediction of contrast-induced nephropathy after intra-arterial interventions. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(4):408-414. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000641.
17. Briguori C, Quintavalle C, Donnarumma E, et al. Novel biomarkers for contrast-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2014;2014:568738. DOI: 10.1155/2014/568738.
18. Coppolino G, Comi N, Bolignano D, et al. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Predicts Renal Function Decline in Patients With Glomerular Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:336. DOI: 10.3389/fcell.2020.00336.
19. de Bhailis ÁM, Chrysochou C, Kalra PA. Inflammation and Oxidative Damage in Ischaemic Renal Disease. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6):845. DOI: 10.3390/antiox10060845.
20. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, et al. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(9):1451-8. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.014
21. Briguori C, Visconti G, Rivera NV, et al. Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. *Circulation.* 2010;121(19):2117-22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919639.
22. Andreucci M, Faga T, Riccio E, et al. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016;9:205-21. DOI: 10.2147/IJNRD.S105124.
23. Dalili N, Chashmian S, Khoormizi SMH, et al. Urine and serum NMR-based metabolomics in pre-procedural prediction of contrast-induced nephropathy. *Intern Emerg Med.* 2020;15(1):95-103. DOI: 10.1007/s11739-019-02128-x.
24. Li S, Zheng Z, Tang X. Preprocedure and postprocedure predictive values of serum b2-microglobulin for contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary computed tomography angiography: a comparison with creatinine-based parameters and cystatin C. *J Comput Assist Tomogr.* 2015;39(6):969-74. DOI: 10.1097/RCT.0000000000000294.
25. Ahmed K, McVeigh T, Cerneviute R, et al. Effectiveness of contrast-associated acute kidney injury prevention methods; a systematic review and network meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):323. DOI: 10.1186/s12882-018-1113-0.
26. Yao YL, Gao Y. Present Situation and Research Progress of Kidney Function Recoverability Evaluation of Acute Kidney Injury Patient. *Int J Gen Med.* 2021;14:1919-1925. DOI: 10.2147/IJGM.S303348.
27. Andreucci M, Faga T, Riccio E, et al. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016;9:205-21. DOI: 10.2147/IJNRD.S105124.
28. Miao S, Xue ZK, Zhang YR, et al. Comparison of Different Hydration Strategies in Patients with Very Low-Risk Profiles of Contrast-Induced Nephropathy. *Med Sci Monit.* 2021;27:e929115. DOI: 10.12659/MSM.929115.
29. Cai L, Rubin J, Han W, et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(12):2229-35. DOI: 10.2215/CJN.00980110.
30. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29(7):1301-11. DOI: 10.1093/ndt/gft510.
31. Zhou F, Luo Q, Wang L, et al. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016;49(3):746-55. DOI: 10.1093/ejcts/ezv199.
32. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(Pt 3):335-51. DOI: 10.1177/0004563214521795.
33. Ronco C. Biomarkers for acute kidney injury: is NGAL ready for clinical use? *Crit Care.* 2014;18(6):680. DOI: 10.1186/s13054-014-0680-0.
34. Clerico A, Galli C, Fortunato A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(9):1505-17. DOI: 10.1515/cclm-2011-0814.
35. Lupu L, Rozenfeld KL, Zahler D, et al. Detection of Renal Injury Following Primary Coronary Intervention among ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients: Doubling the Incidence Using Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Renal Biomarker. *J Clin Med.* 2021;10(10):2120. DOI: 10.3390/jcm10102120.
36. da Veiga GL, da Costa Aguiar Alves B, Perez MM, et al. Kidney Diseases: The Age of Molecular Markers. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1306:13-27. DOI: 10.1007/978-3-030-63908-2_2.
37. Quintavalle C, Anselmi CV, De Micco F, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and contrast-induced acute kidney injury. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015;8(9):e002673. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002673.
38. Li Q, Huang Y, Shang W, et al. The Predictive Value of Urinary Kidney Injury Molecular 1 for the Diagnosis of Contrast-Induced Acute Kidney Injury after Cardiac Catheterization: A Meta-Analysis. *J Interv Cardiol.* 2020;2020:4982987. DOI: 10.1155/2020/4982987.
39. Sabbisetti VS, Ito K, Wang C, et al. Novel assays for detection of urinary KIM-1 in mouse models of kidney

injury. *Toxicol Sci.* 2013;131(1):13-25. DOI: 10.1093/toxsci/kfs268.

40. Liao B, Nian W, Xi A, et al. Evaluation of a Diagnostic Test of Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Urine KIM-1 in Contrast-Induced Nephropathy (CIN). *Med Sci Monit.* 2019;25:565-70. DOI: 10.12659/MSM.912569.

41. Li W, Yu Y, He H, et al. Urinary Kidney injury molecule-1 as an early indicator to predict contrast induced acute Kidney injury in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention. *Biomed Rep.* 2015;3(4):509-12. DOI: 10.3892/br.2015.449.

42. Wybraniec MT, Chudek J, Bozentowicz-Wikarek M, et al. Prediction of contrast-induced acute kidney injury by early post-procedural analysis of urinary biomarkers and intra-renal Doppler flow indices in patients undergoing coronary angiography. *J Interv Cardiol.* 2017;30(5):465-72. DOI: 10.1111/joic.12404.

43. Altmann C, Andres-Hernando A, McMahan RH, et al. Macrophages mediate lung inflammation in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(4):F421-32. DOI: 10.1152/ajprenal.00559.2010.

44. Lin X, Yuan J, Zhao Y, et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J Nephrol.* 2015;28(1):7-16. DOI: 10.1007/s40620-014-0113-9.

45. Banda J, Duarte R, Dix-Peek T, et al. Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Outcomes in Contrast-Induced Nephropathy. *Int J Nephrol.* 2020;2020:8568139. DOI: 10.1155/2020/8568139.

46. He H, Li W, Qian W, et al. Urinary interleukin-18 as an early indicator to predict contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Exp Ther Med.* 2014;8(4):1263-6. DOI: 10.3892/etm.2014.1898.

47. Rear R, Bell RM, Hausenloy DJ. Contrast-induced nephropathy following angiography and cardiac interventions. *Heart.* 2016 Apr;102(8):638-48. DOI: 10.1136/heartjnl-2014-306962.

48. Lichosik M, Jung A, Jobs K. Interleukin 18 and neutrophil-gelatinase associated lipocalin in assessment of the risk of contrast-induced nephropathy in children. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(4):447-53. DOI: 10.5114/ceji.2015.56967.

49. Roberts LM, Buford TW. Lipopolysaccharide binding protein is associated with CVD risk in older adults. *Aging Clin Exp Res.* 2021;33(6):1651-8. DOI: 10.1007/s40520-020-01684-z.

50. Fujita D, Takahashi M, Doi K, et al. Response of urinary liver-type fatty acid-binding protein to contrast media administration has a potential to predict one year renal outcome in patients with ischemic heart disease. *Heart Vessels* 2015;30(3):296-303. DOI: 10.1007/s00380-014-0484-9.

51. Hishikari K, Hikita H, Nakamura S, et al. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Level as a Predictive Biomarker of Acute Kidney Injury in Patients

with Acute Decompensated Heart Failure. *Cardiorenal Med.* 2017;7(4):267-75. DOI: 10.1159/000476002.

52. Menez S, Parikh CR. Assessing the health of the nephron in acute kidney injury: biomarkers of kidney function and injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019;28(6):560-6. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000538.

53. Kamijo-Ikemoni A, Hashimoto N, Sugaya T. Elevation of urinary liver-type fatty acid binding protein after cardiac catheterization related to cardiovascular events. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2015; 8: 91-99. DOI: 10.2147/IJNRD.S88467.

54. Qin C, Li M, Bai T, et al. Tsp40 deficiency limits renal inflammation and promotes tubular cell proliferation in renal ischemia reperfusion injury. *Exp Cell Res* 2018;371(1):255-261. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.08.019.

55. Sato W, Sato Y. Midkine in nephrogenesis, hypertension and kidney diseases. *Br J Pharmacol* 2014;171(4):879-887. DOI: 10.1111/bph.12418.

56. Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, KocZorawska E. Midkine: a novel and early biomarker of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Biomed Res Int* 2015;2015:879509. DOI: 10.1155/2015/879509.

57. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, et al. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 2019;394(10197):488-496. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30769-X.

58. Zou YF, Zhang W. Role of microRNA in the detection, progression, and intervention of acute kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(2):129-136. DOI: 10.1177/1535370217749472.

Информация об авторах:

Лаврищева Юлия Владимировна, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ патогенеза и терапии артериальной гипертензии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Конради Александра Олеговна, д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, заместитель генерального директора ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России по научной работе, заведующий НИО артериальной гипертензии Института сердца и сосудов ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой организации управления и экономики здравоохранения Института медицинского образования Центра Алмазова;

Яковенко Александр Александрович, к.м.н., доцент кафедры нефрологии и диализа Факультета последипломного образования ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

POTENTIAL BIOMARKERS OF CONTRAST-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN PATIENTS UNDERGOING PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

Lavrishcheva Yu. V.¹, Konradi A. O.¹, Yakovenko A. A.²

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Lavrishcheva Yulia V.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: lavrishcheva@gmail.com

Received 04 October 2021; accepted 02
November 2021.

ABSTRACT

Currently, there is a continuous increase in the number of interventional interventions in cardiology using X-ray contrast agents (RKV), which often leads to such a formidable complication as contrast-induced acute kidney injury (CI-AKI). The manifestations of CI-AKI have all the characteristics of acute renal injury (AKI) and include an absolute (greater than or equal to 0.3 or more or equal to 0.5 mg/dL) or relative (greater than or equal to 25%) increases in serum creatinine (sCr) compared with baseline values, occurring 48-72 hours after intravascular administration of RVC.

Contrast-induced acute kidney injury is a common complication following intravascular administration of iodine-containing contrast media and is associated with prolonged hospital stay and poor long-term prognosis, including unwanted cardiovascular events, and complete loss of renal function. CI-AKI occurs in 5-20% of hospitalized patients undergoing percutaneous coronary interventions.

Unfortunately, there are currently no analogues of iodine-containing RVC, and therefore the question of finding optimal CI-AKI biomarkers for the purpose of early diagnosis and prevention of this formidable complication remains relevant.

The diagnosis of CI-AKI is based on an increase in serum creatinine, which is a late biomarker of kidney damage. New and earlier serum and urinary biomarkers for the diagnosis of kidney damage have now been identified that can be detected before serum creatinine levels rise. This article provides information on the most relevant and modern biomarkers of CI-AKI.

Key words: acute kidney injury, cardiovascular events, biomarkers, creatinine, percutaneous coronary interventions, X-ray contrast agents.

For citation: Lavrishcheva YuV, Konradi AO, Yakovenko AA. Potential biomarkers of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):173-191.

INTRODUCTION

Contrast-induced acute kidney injury (CI-AKI) is a severe complication of exposure to radiopaque substances (ROS) used in cardiology for diagnosis or when using interventional treatment methods, and may be associated with unfavorable short- and long-term outcomes [1, 2]. CI-AKI is the third most common cause of nosocomial development of acute kidney injury (AKI) after reduced renal perfusion (within prerenal AKI) and drug nephrotoxicity. The incidence of CI-AKI varies up to 20% among hospitalized patients [2, 3]. CI-AKI is usually defined as an absolute (more than or equal to 0.3 or more than or equal to 0.5 mg/dl) or relative (more than or equal to 25%) increase in serum creatinine (sCr) compared to baseline values, occurring 48-72 hours after intravascular administration of ROS, and, reaching a peak on day 3-5, returns to the baseline level within 10-14 days [1]. Such dynamics of creatinine level does not allow timely diagnosis of CI-AKI. In addition, an increase in serum creatinine depends not only on a decrease in glomerular filtration rate (GFR), but also on the systemic accumulation of sCr produced by skeletal muscles and non-renal factors (age, gender, muscle mass, state of hydration), which makes an increase in sCr level non-specific for the diagnosis of CI-AKI, in connection with which other biomarkers have been actively investigated recently. In particular, there is a growing interest in the most sensitive biomarkers that allow detecting kidney injury earlier than the sCr level. These biomarkers can be divided into 2 groups: 1) those that represent changes in renal function [for example, sCr or cystatin (Cys-C)], 2) those that reflect structural kidney injury [for example, kidney injury molecule 1, interleukin-18 (IL-18)]. Several studies report new biomarkers in urine/serum used for risk stratification, diagnosis and prediction of the possibility of CI-AKI. The combination of functional biomarkers and biomarkers of kidney injury provides a simple method for dividing patients with AKI into 4 groups: 1) markers do not change; 2) only injury; 3) only functional disorders; 4) injury and functional disorders [4]. In fact, the use of new biomarkers of kidney injury has been limited for several reasons: finding

the most accurate biomarkers for each individual case, uncertainty in thresholds (which may vary depending on the conditions), as well as limited clinical data and financial costs.

Characteristics of the optimal biomarker for detecting CI-AKI: 1) detection fluency and specificity for contrast-induced kidney injury; 2) cost-effectiveness; 3) the ability of detection at the subclinical phase; 4) the ability to monitor the biomarker; 5) the ability to stratify the risk and predict the outcome of kidney injury.

PATHOPHYSIOLOGY OF ACUTE KIDNEY INJURY INDUCED BY RADIOPAQUE SUBSTANCE

ROS can induce AKI by two main mechanisms: 1) cytotoxic effect; 2) impaired renal hemodynamics [5, 6]. Cytotoxic effects of ROS include: apoptosis, impaired cell viability and increased activity of the brush border and lysosomal enzymes; fragmentation of cellular DNA; suppression of signaling molecules involved in cell survival and amplification of signaling molecules during cell death, such as members of the N-terminal kinase p38 and c-Jun mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factor κ B, as well as activation of caspase. It is believed that the nuclear factor κ B and N-terminal kinases c-Jun are involved in enhancing the regulation of pro-inflammatory IL-8. The imbalance between vasoconstrictors and vasodilators is leading in the pathogenesis of CI-AKI.

In fact, haemodynamic compromise with an increase in renal blood flow, glomerular filtration rate and diuresis rate are directly related to the osmolality of ROS. Due to the increased osmotic load, more sodium is reabsorbed by tubular cells, which in itself increases oxygen consumption. After this temporary increase, the renal blood flow decreases (from 10 to 25%). The decrease in blood flow appears to occur under the influence of vasodilators, such as adenosine, nitric oxide, atrial natriuretic peptide and prostaglandin E₂. Also, the pathogenesis of CI-AKI involves an increase in the production of reactive oxygen species due to a decrease in blood flow and increased oxygen consumption in the brain substance (Fig. 1).

FUNCTIONAL BIOMARKERS

Creatinine

Creatinine is the most widely used endogenous marker of glomerular filtration rate, produced at a constant rate and freely filtered in the glomeruli, with only 10 to 40% secreted by distal tubules. This is a convenient and cheap marker to measure, but its concentration is influenced by several factors, including age, gender, exercise, medication, muscle mass, nutritional status and number of meals [1].

The increase in sCr occurs 24-72 hours after the introduction of ROS and peaks on days 3-5, returning to the baseline level within 10-14 days. In addition to this slow kinetics which limits its use for early diagnosis of kidney injury, sCr remains within the reference range until 50% of renal function is lost.

Microalbuminuria

Microalbuminuria is an important marker of changes in the structure and function of the glomeruli. The term “microalbuminuria” refers to urinary albumin at a concentration below the threshold for determining albumin using conventional urine test strips. Its value ranges from 30 to 300 mg/l [7]. Microalbuminuria was used as a biomarker in a study of the prevention

of CI-AKI with N-acetylcysteine [8]. The limitation of the use of microalbuminuria as a marker of AKI is its presence not only in acute, but also in chronic conditions, such as diabetes mellitus, blood diseases, chronic kidney disease, etc.

Cystatin C (Cys-C)

Cystatin C is a functional biomarker of glomerular filtration, more sensitive than sCr, for detecting acute (within 24 hours) changes in kidney function. It is a 13 kDa protein, a member of the cysteine protease inhibitor family, which is present in all nucleated cells. Cys-C is filtered by glomeruli and then metabolized in the cells of the proximal renal tubules after megalin-mediated endocytosis [9]. Cys-C is not secreted by the proximal renal tubules. All cells in the body that contain nuclei produce cystatin C at a stable rate. Thus, the concentration of cystatin C in the blood correlates with the glomerular filtration rate [10, 11]. The level of protein in the blood does not depend on body weight and height, muscle mass and gender.

For these reasons, Cys-C can be a useful marker for detecting both chronic and acute changes in GFR [12, 13]. In addition, Cys-C is distributed in the extracellular fluid, whereas sCr is distributed in the water of the whole body, the volume of which is 3 times larger

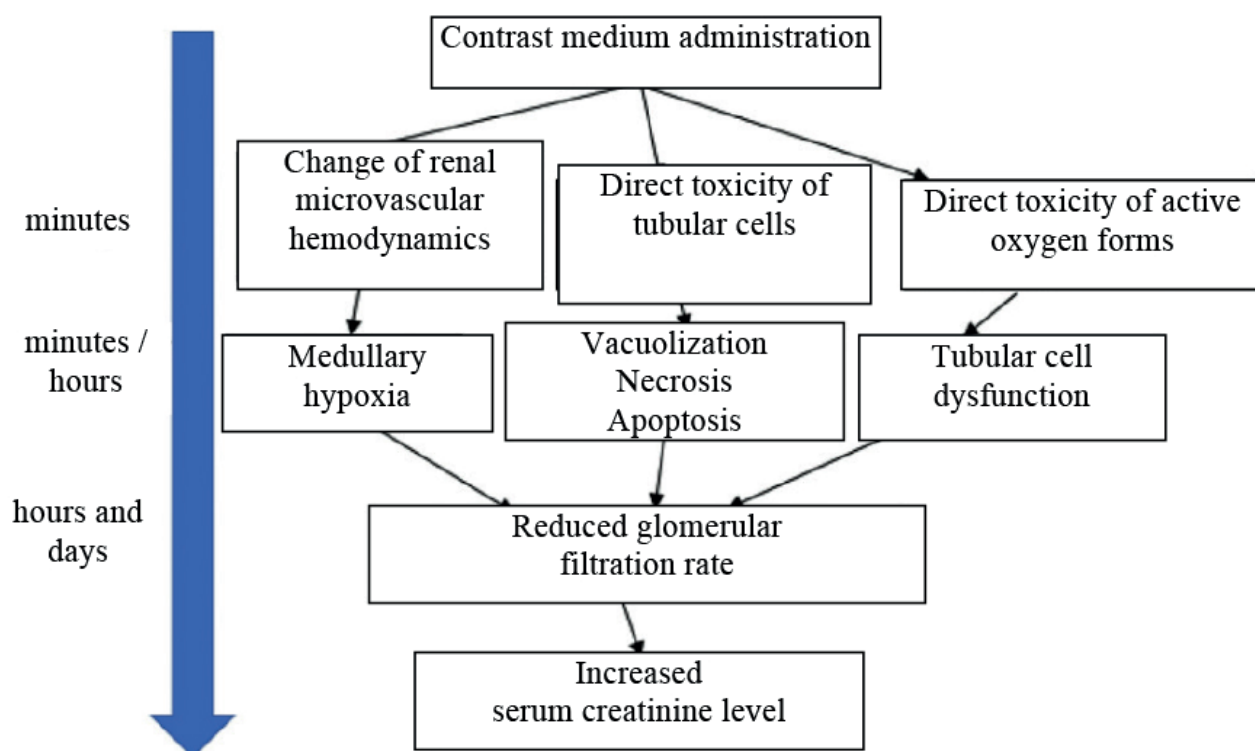


Fig. 1. Pathophysiology of acute kidney injury

[14, 15]. Thus, with a decrease in GFR, the content of Cys-C in serum increases faster than sCr [16, 17].

It has been shown that with CI-AKI, the peak level of Cys-C in blood serum is reached as early as 24 hours after the administration of ROS, which makes it possible to detect even minor changes in GFR [18-20].

Brigoori C. and colleagues demonstrated that in 410 patients with chronic kidney disease who underwent coronary and/or peripheral angiography and/or angioplasty, an increase in the concentration of Cys-C in serum by 10% or more 24 hours after exposure to ROS was associated with an increase in sCr greater than or equal to 0.3 mg/dl and was an independent predictor of serious consequences for 1 year, including death and renal replacement therapy (RRT). At the same time, an increase in the level of Cys-C in serum by less than 10% in 24 hours excluded CI-AKI [21].

Beta-2-microglobulin (B2M, B₂M, Thymotaxin, Beta₂-Microglobulin).

Beta-2-microglobulin is an 11.8 kD protein that is filtered by glomeruli and reabsorbed by the proximal tubules of the kidneys [22]. Although low levels of beta-2-microalbumin are found in the urine and serum of healthy people, after kidney injury its level increases due to a decrease in reabsorption by damaged tubules.

In particular, the baseline level of beta-2-microglobulin in serum is an important predictor of CI-AKI. Nozue and colleagues included 96 patients with stable angina who underwent routine percutaneous coronary intervention (PCI) [23].

They measured serum Cys-C and b2M, as well as fatty acid binding protein in the liver (FABP), b2M and N-acetyl-b-D-glucosamide (NAG) before and 1 day after PCI. In patients with CI-AKI (5%), baseline serum b2M and Cys-C levels were significantly higher than in patients without CI-AKI (4.2 ± 2.6 vs. 2.2 ± 1.0 mg/L, $P = 0.0007$ and (1.51 ± 0.52) vs. 1.11 ± 0.34 mg/L, $P = 0.013$, respectively).

The baseline level of b2M > 1.26 mg/dl showed 75% sensitivity and 80% specificity in predicting CI-AKI. Similar results were obtained by Li and his colleagues, who randomized 424 patients exposed to ROS [24].

CI-AKI was defined as an increase in SCr by 25% or higher or 0.5 mg/dL above baseline within 48 hours. Serum levels of b2M, Cys-C and creatinine were measured 0, 24 and 48 hours after coronary angiography.

Before using ROS, the risk of CI-AKI was predicted by both the baseline level of b2M and CysC. After the introduction of ROS, CI-AKI was determined by the level of B2m, Cys-C, creatinine and GFR. However, multivariate regression analysis confirmed that the baseline levels of B2m, Cys-C, creatinine and calculated GFR were independent predictors of CI-AKI.

Retinol-binding protein (RBP).

Retinol binding protein (RBP) is a 21 kDa protein that is filtered by the glomeruli and reabsorbed by the proximal tubules. It has been shown to be an adequate marker for the diagnosis of AKI; in particular, levels of RBP in urine before and after are used to assess the effectiveness of the prevention of AKI with N-acetylcysteine [25].

BIOMARKERS OF STRUCTURAL KIDNEY INJURY

N-acetyl-β-d-glucosamide (NAG)

N-acetyl-β-d-glucosamide (NAG) is a lysosomal enzyme (>130 kDa) that is produced by cells of the proximal tubules of the kidneys. In healthy people, NAG is present in the urine in small amounts. Damage to the renal tubule leads to an increase in its concentration in the urine due to the fact that it is not filtered by the glomeruli due to the large weight. However, elevated levels of NAG in the urine can also be the result of increased lysosomal activity without cell destruction [26].

Andreucci M. and colleagues included 590 patients who underwent coronary angiography for both stable and unstable coronary heart disease [27]. Urine samples of NAG, osmolality, and sCr were taken before and 1, 2, and 6 days after administration of low-osmolar nonionic ROS. CI-AKI occurred in 33 patients. In these patients, the levels of NAG and sCr in the urine on days 1 and 2 were significantly higher than at the baseline, and compared with patients without CI-AKI. NAG levels in the urine peaked earlier and grew much faster than sCr levels in patients with CI-AKI.

Lipocalin associated with neutrophil gelatinase (NGAL)

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a 25 kDa protein associated with human neutrophil gelatinase, which belongs to the lipocalin superfamily [28]. Monomeric (mainly) and heterodimeric forms are the predominant forms produced by tubules [29]. NGAL is filtered by the glomeruli and then reabsorbed by the proximal tubules, where it is partially cleaved by megalin and partially excreted in the urine. The concentration of NGAL in a healthy person is 20 ng/ml in both serum and urine. After damage to the cells of the renal tubules, NGAL is released into plasma and urine; this causes an increase in its concentration in plasma and urine much earlier than an increase in the concentration of sCr [30]. Thus, NGAL can be considered as a fairly informative and independent marker of AKI [31-33].

According to various sources, there is evidence of the potential role of NGAL as a reliable and prognostic marker of AKI, since its serum and urine levels rise

earlier than sCr. Some researchers say that the level of NGAL in plasma is less specific than its concentration in urine [34, 35].

Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1)

Kidney injury molecule 1 (KIM-1), a type 1 transmembrane glycoprotein, is recognized as a potential biomarker for detecting ischemic or toxic damage to the proximal tubules [36, 37]. The extracellular domain KIM-1 is separated from the cell surface by a metalloproteinase-dependent process. This excretion with increased synthesis of KIM-1 is most likely the cause of increased release of KIM-1 in urine on the background of AKI [38, 39]. The use of urinary KIM-1 as a biomarker of AKI is based on the fact that in healthy people there is no expression of KIM-1 and its activation in the apical cell membrane of the tubules, as during AKI.

Liao B. and colleagues conducted a study that included 3,200 patients without chronic kidney disease (CKD) who underwent coronary angiography. CI-AKI was defined as an increase in serum creatinine by 0.3 mg/dl from the baseline level [40]. KIM-1 levels were measured before, as well as 6 and 48 hours after exposure to ROS [40]. The authors noticed that the levels of KIM-1 after 6 and 48 hours, compared with the baseline level, significantly increased in patients with CI-AKI, but not in the control group.

The role of KIM-1 as an early biomarker of CI-AKI was also confirmed in 145 patients with diabetes mellitus exposed to ROS [41]. In these patients, sCr levels were measured before administration of ROS and 24-48 hours after that. The urinary KIM-1 values were evaluated at the baseline level and within 2, 6, 12, 24 and 48 hours after the use of ROS. A total of 19 patients developed CI-AKI, which was diagnosed by the level of sCr. There was a significant difference between the levels of KIM-1 in urine measured 2, 6, 12, 24 hours after the procedure and the levels before the procedure in the CI-AKI group. There was no difference in the sCr level measured before and after 24 hours after the procedure. Not so long ago, Wybraniec M. T. and colleagues showed that urinary KIM-1 levels exceeding 0.425 ng/mL 6 hours after administration of ROS predicts with high sensitivity and specificity CI-AKI in patients undergoing coronary angiography [42].

Urinary interleukin-18 (IL-18)

IL-18 is a cytokine that increases in the proximal renal tubules in patients with AKI, and is formed from the IL-18 precursor under the action of caspase-1 [43]. Levels of IL-18 in urine increase with acute tubular necrosis, but not with prerenal AKI. It is a sensitive and specific biomarker of AKI [36]. A meta-analysis of 23 studies has demonstrated that IL-18 in urine is a reli-

able biomarker of AKI in patients who have undergone cardiac surgery, hospitalized in intensive care units and cardiology departments [44-48].

Fatty Acid Binding Protein, Liver Form (L-FABP)

The liver fatty acid binding protein (L-FABP) is expressed in the proximal tubules of the human kidney and participates in the metabolism of fatty acids [49]. There are two types of FABP found in the kidneys: L-FABP, located in the proximal convoluted and straight tubules of the kidneys (it can also be reabsorbed from the glomerular filtrate through megalin, multigand proximal tubular endocytic receptor), and cardiac-type FABP which is not found in the urine. Thus, only L-FABP has been approved as a biomarker of tubule injury. In the promoter region of the L-FABP gene, there is an element that reacts to hypoxia, and some studies have reported that the concentration of L-FABP in the urine increased in parallel with a decrease in peritubular blood flow, thus, L-FABP can be determined by changes in renal hemodynamics after administration of ROS. Some studies have shown that baseline levels of L-FABP in urine correlated with the occurrence of CI-AKI [50].

Hishikari K. and colleagues compared the levels of L-FABP in urine before and after coronary angiography in 66 patients with sCr from 1.2 to 2.5 mg/dl and in 30 volunteers [51]. Prior to angiography, L-FABP levels were significantly higher in 13 patients in whom subsequently sCr level increased and CI-AKI developed. In particular, Menez S. and colleagues found that urinary Cr level greater than or equal to 24.5 mg/g prior to exposure to ROS was an independent predictor of CI-AKI [52]. In addition, measuring changes in the level of L-FABP in urine before and 24 hours after cardiac catheterization in patients with mild to moderate renal dysfunction may be an important indicator of stratification of the risk of the onset of cardiovascular events [53].

Midkin (MK)

Midkin (MK) is a 13 kDa heparin-binding growth factor with various biological functions, such as migration of inflammatory cells and anti-apoptotic effect [54]. In the kidneys, MK is expressed both in the cells of the proximal tubules and in the epithelial cells of the distal tubules and to a lesser extent in endothelial cells and is induced by oxidative stress through the activation of factor 1-alpha caused by hypoxia [54]. The pathophysiological roles of MK vary, from the onset of AKI to the progression of CKD [55].

Malyszko J. and colleagues conducted a study aimed at clarifying whether MK could be an early biomarker of CI-AKI [56]. A total of 89 patients with nor-

mal sCr levels who had undergone PCI were examined. Serum MK was assessed at the baseline level and 2, 4, 8, 24 and 48 hours after administration of ROS; sCr was evaluated before and 24 and 48 hours after administration of ROS. CI-AKI was defined as an increase in sCr by more than 25% from the baseline level 48 hours after PCI and occurred in 10% of patients. In these patients with CI-AKI, a significant increase in serum MK level was observed 2 hours ($P < 0.0019$) and 4 hours after exposure to ROS; MK returned to the baseline value after 24 hours. In the same study, NGAL levels were significantly higher 2 hours (sNGAL) or 4 hours (uNGAL) after PCI. Cys-C was higher 8 and 24 hours after PCI in patients with CI-AKI.

Dickkopf-3 (DKK3)

A new biomarker for the diagnosis of progressive tubulointerstitial fibrosis. DKK3 belongs to the glycoprotein family (DKK1-4), which primarily modulate the Wnt signaling pathway. This signaling pathway is involved in various cell functions, such as proliferation, migration and gene expression of fibrogenic cytokines. A number of experimental studies has shown that the Wnt signaling pathway is also involved in the progression of chronic kidney disease [57]. DKK3 is released from “stressed” tubular cells in the urine. Thus, significant kidney injury is detected at an early stage. The disadvantage of this method may be that this method is eminently suitable as additional information for GFR, but is more relevant for patients with chronic kidney disease (Figure 2).

OTHER BIOMARKERS

Protein 7 binding insulin-like growth factor and tissue metalloproteinase-2 inhibitor are 2 proteins involved in cell cycle arrest that can be predictors of AKI. Actually, cell cycle arrest may be the result of cell damage caused by ROS [54].

Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) is an enzyme on the brush border of the proximal tubules of the kidneys, which appears in the urine when the brush border is damaged. Elevated baseline GGT levels can predict CI-AKI [34, 57].

MiRNA is a molecule involved in cell proliferation, differentiation and death, as well as in inflammation, which suggests their involvement in the pathogenesis of CI-AKI [58]. MiRNA molecules have the advantage of their stability in serum, urine and saliva.

CONCLUSIONS

CI-AKI is one of the most common causes after percutaneous coronary interventions, associated with prolonged hospital stay and adverse outcomes, including various adverse cardiovascular outcomes and loss of renal function up to the terminal stage. Given the continuous increase in the number of performed PCIs using ROS, the frequency of CI-OPP will continuously increase. There is also an increase in the number of comorbid patients with endocrinological pathology, chronic kidney disease, which also increases the risk of CI-AKI. Currently, in clinical practice, sCr is still wide-

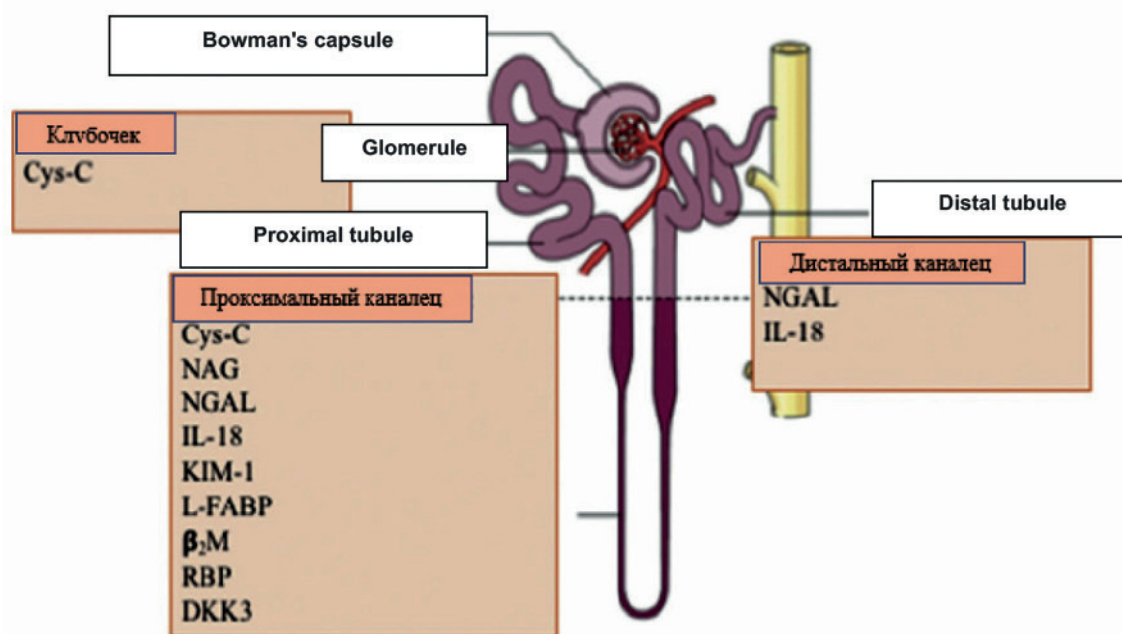


Fig. 2. Release of CI-AKI biomarkers in various parts of the nephron

ly used as a marker of kidney injury, despite the fact that its increase is delayed and its concentration may depend on age, increased muscle mass and concomitant therapy. In this regard, it became necessary to search for new early biomarkers of renal injury.

Recently, several promising biomarkers have been identified that presumably can be predictors of kidney injury in cardiac patients until sCr increases. The most promising markers of CI-AKI are Cys-C, NGAL, KI-1, IL-18 and L-FABP, as their use can help in the diagnosis of acute kidney injury in the subclinical phase of the disease. However, some questions remain unresolved regarding the accuracy and reliability of these new biomarkers in the context of contrast-induced nephropathy.

Preferably, an ideal biomarker should be non-invasive, detectable at an early stage of the disease, prognostically significant, and, most importantly, it should be specific for kidney injury when using ROS and have a pathophysiological correlation with the disease. Therefore, in order to find the ideal biomarker, it is necessary to conduct a multicenter clinical study to find out the potential of these biomarkers in different groups of patients.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tehrani S, Laing C, Yellon DM, et al. Contrast-induced acute kidney injury following PCI. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:483–90. DOI: 10.1111/eci.12061.
2. Santiago G, Byungsoo K, Selcuk A. Contrast-Induced Nephropathy and Risk of Acute Kidney Injury and Mortality After Cardiac Operations. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2012;94(3):772–6. DOI: 10.1016/S0002-9343(97)00150-2.
3. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicentre study. *JAMA.* 2005;294(7):813–8. DOI: 10.1001/jama.294.7.813.
4. McCullough PA, Shaw AD, Haase M, et al. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth acute dialysis quality initiative consensus conference. *Contrib Nephrol.* 2013;182:13–29. DOI: 10.1159/000349963.
5. D'Amore C, Nuzzo S, Briguori C. Biomarkers of Contrast-Induced Nephropathy: Which Ones are Clinically Important? *Intervent Cardiol Clin.* 2020;9:335–44. DOI: 10.1016/j.iccl.2020.02.004.
6. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):288–96. DOI: 10.2215/CJN.02600607.
7. Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology.* 2008;245:182–93. DOI: 10.1016/j.tox.2007.12.024.
8. Chousterman BG, Bouadma L, Moutereau S, et al. Prevention of contrast-induced nephropathy by N-acetylcysteine in critically ill patients: different definitions, different results. *J Crit Care.* 2013;28(5):701–9. DOI: 10.1016/j.jcrc.2013.03.007.
9. Weyer K, Nielsen R, Petersen SV, et al. Renal uptake of 99mTc-dimercaptosuccinic acid is dependent on normal proximal tubule receptor-mediated endocytosis. *J Nucl Med.* 2013;54(1):159–65. DOI: 10.2967/jnumed.112.110528.
10. Ghys LF, Meyer E, Paepe D, et al. Analytical validation of a human particle-enhanced nephelometric assay for cystatin C measurement in feline serum and urine. *Vet Clin Pathol.* 2014;43(2):226–34. DOI: 10.1111/vcp.12144.
11. Obiols J, Bargnoux AS, Kuster N, et al. Validation of a new standardized cystatin C turbidimetric assay: evaluation of the three novel CKD-EPI equations in hypertensive patients. *Clin Biochem.* 2013;46(15):1542–7. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.056.
12. Schaeffner E. Determining the Glomerular Filtration Rate—An Overview. *J Ren Nutr.* 2017;27(6):375–80. DOI: 10.1053/j.jrn.2017.07.005.
13. Gaygısız Ü, Aydoğdu M, Badoğlu M, et al. Can admission serum cystatin C level be an early marker subclinical acute kidney injury in critical care patients? *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(2):143–50. DOI: 10.3109/00365513.2015.1126854.
14. Shams E, Mayrovitz HN. Contrast-Induced Nephropathy: A Review of Mechanisms and Risks. *Cureus.* 2021;13(5):e14842. DOI: 10.7759/cureus.14842.
15. He Y, Deng Y, Zhuang K, et al. Predictive value of cystatin C and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in contrast-induced nephropathy: A meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0230934. DOI: 10.1371/journal.pone.0230934.
16. Wang ZY, Wang YL, Wei J, et al. Role of serum cystatin C in the prediction of contrast-induced nephropathy after intra-arterial interventions. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(4):408–414. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000641.
17. Briguori C, Quintavalle C, Donnarumma E, et al. Novel biomarkers for contrast-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2014;2014:568738. DOI: 10.1155/2014/568738.
18. Coppolino G, Comi N, Bolignano D, et al. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Predicts Renal Function Decline in Patients With Glomerular Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:336. DOI: 10.3389/fcell.2020.00336.
19. de Bhailis ÁM, Chrysochou C, Kalra PA. Inflammation and Oxidative Damage in Ischaemic Renal Disease. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6):845. DOI: 10.3390/antiox10060845.
20. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, et al. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim*

Biophys Acta. 2012;1823(9):1451-8. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.014

21. Briguori C, Visconti G, Rivera NV, et al. Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. *Circulation*. 2010;121(19):2117–22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919639.

22. Andreucci M, Faga T, Riccio E, et al. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:205-21. DOI: 10.2147/IJNRD.S105124.

23. Dalili N, Chashmian S, Khoormizi SMH, et al. Urine and serum NMR-based metabolomics in pre-procedural prediction of contrast-induced nephropathy. *Intern Emerg Med*. 2020;15(1):95-103. DOI: 10.1007/s11739-019-02128-x.

24. Li S, Zheng Z, Tang X. Preprocedure and postprocedure predictive values of serum b2-microglobulin for contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary computed tomography angiography: a comparison with creatinine-based parameters and cystatin C. *J Comput Assist Tomogr*. 2015;39(6):969–74. DOI: 10.1097/RCT.0000000000000294.

25. Ahmed K, McVeigh T, Cerneviciute R, et al. Effectiveness of contrast-associated acute kidney injury prevention methods; a systematic review and network meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2018;19(1):323. DOI: 10.1186/s12882-018-1113-0.

26. Yao YL, Gao Y. Present Situation and Research Progress of Kidney Function Recoverability Evaluation of Acute Kidney Injury Patient. *Int J Gen Med*. 2021;14:1919-1925. DOI: 10.2147/IJGM.S303348.

27. Andreucci M, Faga T, Riccio E, et al. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:205-21. DOI: 10.2147/IJNRD.S105124.

28. Miao S, Xue ZK, Zhang YR, et al. Comparison of Different Hydration Strategies in Patients with Very Low-Risk Profiles of Contrast-Induced Nephropathy. *Med Sci Monit*. 2021;27:e929115. DOI: 10.12659/MSM.929115.

29. Cai L, Rubin J, Han W, et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(12):2229–35. DOI: 10.2215/CJN.00980110.

30. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29(7):1301–11. DOI: 10.1093/ndt/gft510.

31. Zhou F, Luo Q, Wang L, et al. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;49(3):746-55. DOI: 10.1093/ejcts/ezv199.

32. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 3):335-51. DOI: 10.1177/0004563214521795.

33. Ronco C. Biomarkers for acute kidney injury: is NGAL ready for clinical use? *Crit Care*. 2014;18(6):680. DOI: 10.1186/s13054-014-0680-0.

34. Clerico A, Galli C, Fortunato A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(9):1505–17. DOI: 10.1515/cclm-2011-0814.

35. Lupu L, Rozenfeld KL, Zahler D, et al. Detection of Renal Injury Following Primary Coronary Intervention among ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients: Doubling the Incidence Using Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Renal Biomarker. *J Clin Med*. 2021;10(10):2120. DOI: 10.3390/jcm10102120.

36. da Veiga GL, da Costa Aguiar Alves B, Perez MM, et al. Kidney Diseases: The Age of Molecular Markers. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1306:13-27. DOI: 10.1007/978-3-030-63908-2_2.

37. Quintavalle C, Anselmi CV, De Micco F, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and contrast-induced acute kidney injury. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015;8(9):e002673. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002673.

38. Li Q, Huang Y, Shang W, et al. The Predictive Value of Urinary Kidney Injury Molecular 1 for the Diagnosis of Contrast-Induced Acute Kidney Injury after Cardiac Catheterization: A Meta-Analysis. *J Interv Cardiol*. 2020;2020:4982987. DOI: 10.1155/2020/4982987.

39. Sabbisetti VS, Ito K, Wang C, et al. Novel assays for detection of urinary KIM-1 in mouse models of kidney injury. *Toxicol Sci*. 2013;131(1):13-25. DOI: 10.1093/toxsci/kfs268.

40. Liao B, Nian W, Xi A, et al. Evaluation of a Diagnostic Test of Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Urine KIM-1 in Contrast-Induced Nephropathy (CIN). *Med Sci Monit*. 2019;25:565-70. DOI: 10.12659/MSM.912569.

41. Li W, Yu Y, He H, et al. Urinary Kidney injury molecule-1 as an early indicator to predict contrast induced acute Kidney injury in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention. *Biomed Rep*. 2015;3(4):509–12. DOI: 10.3892/br.2015.449.

42. Wybraniec MT, Chudek J, Bozentowicz-Wikarek M, et al. Prediction of contrast-induced acute kidney injury by early post-procedural analysis of urinary biomarkers and intra-renal Doppler flow indices in patients undergoing coronary angiography. *J Interv Cardiol*. 2017;30(5):465–72. DOI: 10.1111/joic.12404.

43. Altmann C, Andres-Hernando A, McMahan RH, et al. Macrophages mediate lung inflammation in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(4):F421-32. DOI: 10.1152/ajprenal.00559.2010.

44. Lin X, Yuan J, Zhao Y, et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J Nephrol*. 2015;28(1):7-16. DOI: 10.1007/s40620-014-0113-9.

45. Banda J, Duarte R, Dix-Peek T, et al. Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Outcomes in Contrast-Induced Nephropathy. *Int J Nephrol*. 2020;2020:8568139. DOI: 10.1155/2020/8568139.

46. He H, Li W, Qian W, et al. Urinary interleukin-18 as an early indicator to predict contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Exp Ther Med*. 2014;8(4):1263–6. DOI: 10.3892/etm.2014.1898.
47. Rear R, Bell RM, Hausenloy DJ. Contrast-induced nephropathy following angiography and cardiac interventions. *Heart*. 2016 Apr;102(8):638–48. DOI: 10.1136/heartjnl-2014-306962.
48. Lichosik M, Jung A, Jobs K. Interleukin 18 and neutrophil-gelatinase associated lipocalin in assessment of the risk of contrast-induced nephropathy in children. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(4):447–53. DOI: 10.5114/ceji.2015.56967.
49. Roberts LM, Buford TW. Lipopolysaccharide binding protein is associated with CVD risk in older adults. *Aging Clin Exp Res*. 2021;33(6):1651–8. DOI: 10.1007/s40520-020-01684-z.
50. Fujita D, Takahashi M, Doi K, et al. Response of urinary liver-type fatty acid-binding protein to contrast media administration has a potential to predict one-year renal outcome in patients with ischemic heart disease. *Heart Vessels* 2015;30(3):296–303. DOI: 10.1007/s00380-014-0484-9.
51. Hishikari K, Hikita H, Nakamura S, et al. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Level as a Predictive Biomarker of Acute Kidney Injury in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *Cardiorenal Med*. 2017;7(4):267–75. DOI: 10.1159/000476002.
52. Menez S, Parikh CR. Assessing the health of the nephron in acute kidney injury: biomarkers of kidney function and injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2019;28(6):560–6. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000538.
53. Kamijo-Ikemori A, Hashimoto N, Sugaya T. Elevation of urinary liver-type fatty acid binding protein after cardiac catheterization related to cardiovascular events. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2015; 8: 91–99. DOI: 10.2147/IJNRD.S88467.
54. Qin C, Li M, Bai T, et al. Tsp40 deficiency limits renal inflammation and promotes tubular cell proliferation in renal ischemia reperfusion injury. *Exp Cell Res* 2018;371(1):255–261. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.08.019.
55. Sato W, Sato Y. Midkine in nephrogenesis, hypertension and kidney diseases. *Br J Pharmacol* 2014;171(4):879–887. DOI: 10.1111/bph.12418.
56. Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, KocZorawska E. Midkine: a novel and early biomarker of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Biomed Res Int* 2015;2015:879509. DOI: 10.1155/2015/879509.
57. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, et al. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 2019;394(10197):488–496. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30769-X.
58. Zou YF, Zhang W. Role of microRNA in the detection, progression, and intervention of acute kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(2):129–136. DOI: 10.1177/1535370217749472.

Author information:

Lavrischeva Yulia V., PhD, Senior Researcher, Research Laboratory of Pathogenesis and Therapy of Arterial Hypertension, Almazov National Medical Research Centre;

Konradi Alexandra O., MD, Dr. Sc., Professor, Corresponding Member RAS, Deputy General Director for Research, Head of the Research Department of Arterial Hypertension, Head of the Department of Management Organization and Health Economics, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Yakovenko Alexander A., PhD, Associate Professor of the Department of Nephrology and Dialysis of the Faculty of Postgraduate Education, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.131:616.831-006

ФАКТОРЫ РИСКА ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Пищулов К. А.¹, Мельничникова О. С.¹, Золотова Е. А.¹,
Красношлык П. В.², Гуляев Д. А.², Симакова М. А.¹

¹Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Пищулов Константин Анатольевич,
НЦМУ «Центр персонализированной
медицины»,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: Pishchulov.k@gmail.com

Статья поступила в редакцию
30.09.2021 и принята к печати
01.11.2021.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Венозные тромбоэмболические события являются частым осложнением у пациентов со злокачественными образованиями ЦНС и занимают третье место в структуре причин смерти. **Цель.** Ретроспективно оценить факторы риска венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) и частоту их развития в послеоперационном периоде у пациентов с злокачественными новообразованиями головного мозга. **Материалы и методы.** В ретроспективное исследование было включено 337 пациентов, поступивших в нейрохирургические отделения НМИЦ им. В. А. Алмазова с предварительным диагнозом C71 — злокачественное новообразование головного мозга. Диагноз глиальной опухоли головного мозга верифицировался по данным морфологического исследования интраоперационного образца с использованием классификации ВОЗ. Анализ факторов риска ВТЭО выполнялся в двух группах в зависимости от наличия подтвержденного венозного тромбоза. **Результаты.** Частота развития венозных тромбоэмболических осложнений среди пациентов с новообразованиями головного мозга составила 6,2 %. У пациентов с наличием венозных тромбозов в послеоперационном периоде чаще встречалось рецидивирующее течение глиобластомы и размер опухоли превышал 5 см: 33 % (n = 7) против 13 % (n = 41); 85 % (n = 18) против 47 % (n = 148) (p = 0,05 и p = 0,013 соответственно). У пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями при поступлении уровень тромбоцитов было достоверно ниже, чем у пациентов из другой группы: 189 ± 72 против $240,8 \pm 93,3$ (p = 0,04). **Заключение.** Среди факторов риска венозных тромбоэмболических осложнений можно выделить тромбоцитопению, рецидивирующее течение глиобластомы, размер опухоли более 5 см.

Ключевые слова: глиобластома, кардиоонкология, тромбоз глубоких вен голени, тромбоэмболические осложнения, тромбоэмболия легочной артерии.

Для цитирования: Пищулов К.А., Мельничникова О.С., Золотова Е.А. и др. Факторы риска венозных тромбоэмболических осложнений у пациентов с глиальными опухолями головного мозга. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):192-206.

Список сокращений: ВТЭО — венозные тромбоэмболические осложнения, МКБ — международная классификация болезней, МРТ — магнитно-резонансная томография, ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии, ЦНС — центральная нервная система.

ВВЕДЕНИЕ

Классификация Всемирной организации здравоохранения от 2016 года опухолей центральной нервной системы (ЦНС) основана на гистологических и молекулярных критериях и включает злокачественные, доброкачественные и пограничные опухоли. Среди злокачественных образований ЦНС лидируют вторичные опухоли, представляющие собой метастазы основного онкологического процесса. Показано, что четверть онкологических больных развивает внутричерепные метастазы, при этом с учетом увеличения возраста дожития и совершенствование визуализирующих методов диагностики число таких пациентов увеличивается с каждым годом [1]. Опухоли глиального происхождения находятся на втором месте по распространенности среди первичных опухолей ЦНС, при этом наиболее злокачественным вариантом глиом является глиобластома, встречающаяся в 45,6 % случаев всех первичных злокачественных опухолей головного мозга и обладающая крайне неблагоприятным прогнозом. Так, медиана общей выживаемости в группе пациентов от 18 до 40 лет составляет 19,7 месяцев, а среди пациентов старше 70 лет — всего 4,5 месяца [2]. Венозные тромбоэмболические события являются частым осложнением у пациентов со злокачественными образованиями ЦНС и занимают третье место в структуре причин смерти после прогрессии опухоли и инфекционных осложнений. При метастатическом поражении головного мозга венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО) встречаются в 20 % случаев, у пациентов с глиобластомами частота их развития достигает до 30 % [3, 4]. Одной из причин такой высокой частоты ВТЭО является особенный патогенетический механизм возникновения веноз-

ного тромбоза, ключевая роль в котором отводится тканевому фактору. Показано, что опухолевые клетки высвобождают в кровоток микрочастицы, содержащие тканевый фактор. Высокий уровень этих прокоагулянтных микрочастиц ассоциирован с повышенным риском ВТЭО и сокращением общей выживаемости пациентов [5, 6]. Рядом авторов продемонстрирована высокая экспрессия тканевого фактора в глиомах, при этом уровень экспрессии коррелировал со степенью злокачественности опухоли [7, 8]. В настоящее время большое внимание также уделяется изучению механизмов активации тромбоцитов, результатом которой является тромбоцитопения, характерная для пациентов со злокачественными образованиями ЦНС [9]. Профилактика ВТЭО у пациентов с образованиями головного мозга сложна с учетом отсутствия валидированных шкал риска и высокими геморрагическими рисками. Имеющиеся в настоящее время подходы в стратификации риска ВТЭО у пациентов с образованиями головного мозга предлагают выделять, помимо традиционных факторов риска, связанных с пациентом (возраст, иммобилизация, анамнез ВТЭ, ожирение), факторы, ассоциированные с опухолью и лечением [10, 11]. К факторам, ассоциированным с опухолью, относят степень злокачественности и крупный размер образования, тромбоз сосудов, прорастающих опухоль, по данным визуализирующих методик, отсутствие мутации в гене IDH1. К факторам, ассоциированным с лечением, относят биопсию опухоли, субтотальную резекцию опухоли, использование кортикостероидов и химиотерапии. Среди лабораторных данных предлагается обращать внимание на уровень Д-димера, тромбоцитов и лейкоцитов, так как в ряде работ было показано, что уровень Д-димера более 1,66 мг/мл, лейкоцитоз более $11.5 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоциты менее $196 \times 10^9/\text{л}$ ассоциированы с высоким риском ВТЭО [12, 13].

Целью настоящего исследования была ретроспективная оценка факторов риска ВТЭО и частоты развития венозных тромбозов в послеоперационном периоде у пациентов со злокачественными

новообразованиями головного мозга, пролеченных в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России в 2020 году с использованием данных медико-информационной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование было включено 337 пациентов, поступивших в нейрохирургические отделения НМИЦ им. В. А. Алмазова с предварительным диагнозом С71 — злокачественное новообразование головного мозга по международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10). В рутинной практике этим диагнозом обычно кодируют злокачественные опухоли глиального происхождения, большую долю которых составляет глиобластома. Анализ данных был выполнен с использованием медицинской информационной системы qMS. Диагноз глиобластомы был предварительно поставлен по данным магнитно-резонансной томографии, уточнение типа проводилось в ходе морфологического исследования интраоперационного образца с использованием классификации ВОЗ. Эта классификация основана на выявлении в микроскопической картине морфологического препарата одного из следующих признаков: ядерный атипизм, митозы, пролиферация эндотелия сосудов, некрозы. Учитываются эти признаки следующим образом: Grade I — нет

ни одного из указанных признаков; Grade II — наличие одного из указанных признаков (как правило, атипии ядер, но могут допускаться единичные митозы); Grade III — в опухоли много митотических фигур; Grade IV — выраженная пролиферация эндотелия сосудов, наличие некрозов [14, 15].

Результаты обрабатывались с помощью статистической программы IBM SPSS Statistics 26. Все представлены как медиана и квартили Q25-Q75. Анализ нормальности распределения выборки осуществлялся с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение количественных параметров в исследуемых группах осуществлялось с использованием критерия Стьюдента и Критерия Манна–Уитни. Также для оценки правомерности использования критерия Стьюдента применялся критерий равенства дисперсий Ливиня. Критерием статистической достоверности получаемых результатов считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование было включено 337 пациентов. Средний возраст составлял $52 \pm 14,5$ лет, 44,7 % пациентов были мужского пола, тогда как 55,3 % — женского пола. Из значимой сопутствующей патологии гипертоническая болезнь встречалась у 23,1 % пациентов, ишемическая болезнь сердца

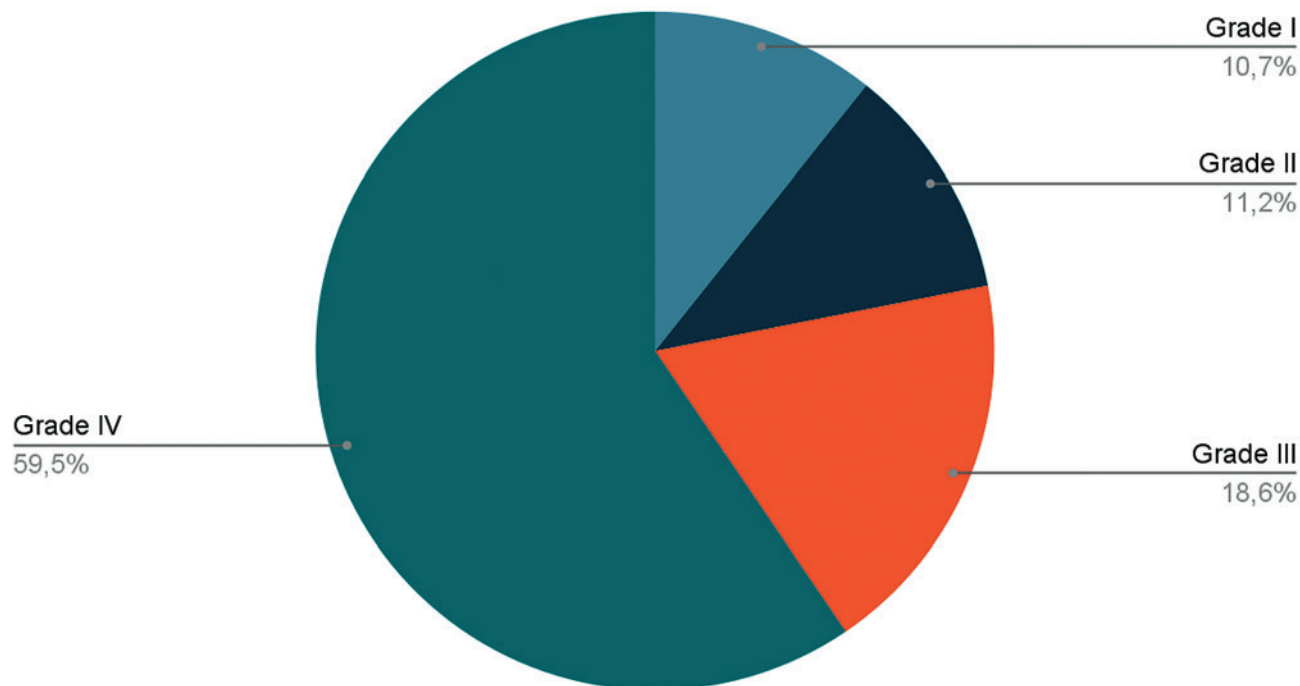


Рис. 1. Распределение опухоли по степени злокачественности

у 11,6 % больных, также обращает на себя внимание сахарный диабет 2 типа, который регистрировался у 10,6 % пациентов.

В данное исследование включались пациенты с предварительным диагнозом злокачественное новообразование центральной нервной системы, которым планировалось оперативное лечение. Среди исследуемой популяции у 2,4 % пациентов ($n = 8$) по данным морфологического исследования верифицировано вторичное (чаще метастатическое) поражение ЦНС. Данные морфологического исследования по определению степени злокачественности представлены на рисунке 1.

Среди классических факторов риска венозных тромбоэмболических событий можно выделить проведенную ранее химиотерапию (33,3 %), лучевую терапию (37,1 %) и ожирение, которое регистрировалось у 11,6 % пациентов. Индекс Карновского в обследованной группе составил 74,5 % [70; 80], косвенно отражая степень иммобилизации пациента — важнейший фактор риска ВТЭО. Частоту

парезов по данным ретроспективного исследования с использованием медицинской информационной системы объективно оценить не представлялось возможным, что связано с особенностью ведения электронной медицинской документации.

Кроме того, следует отметить, что отсутствие такого важного фактора риска, как ранее перенесенные венозные тромбозы в анамнезе большинства пациентов, вероятно, связано с отсутствием специального раздела в МИС и не может в полной мере отражать истинную частоту встречаемости в обследованной группе.

Среди факторов, ассоциированных с лечением, кортикостероидная терапия использовалась в 100 % случаев, тогда как биопсия опухоли выполнялась в 3,4 % случаев. Факт полной или субтотальной резекции не всегда находил отражение в протоколах операции и оказался сложным для ретроспективной оценки.

Среди факторов, ассоциированных с опухолью, стоит отметить то, что размер опухоли более

Таблица 1. Факторы риска развития венозных тромбоэмболических событий у пациентов в зависимости от наличия ВТЭО

Факторы риска	Группа 1 ($n = 21$), %	Группа 2 ($n = 316$), %	p
Химиотерапия в анамнезе	40	28	0,341
Лучевая терапия в анамнезе	40	32	0,536
Рецидив глиобластомы	33	13	0,05
Размер опухоли более 5 см	85	47	0,013
Биопсия опухоли	7	3	0,537

Таблица 2. Характеристика лабораторных данных у пациентов

Лабораторные данные	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Уровень гемоглобина	$141,7 \pm 16,3$	$140,6 \pm 18,5$	0,831
Уровень лейкоцитов	$9,7 \pm 3,9$	$10,7 \pm 4,4$	0,492
Уровень тромбоцитов	189 ± 72	$240,8 \pm 93,3$	0,04
Фибриноген	$2,5 \pm 0,6$	$2,72 \pm 0,6$	0,492
Протромбин (по Квику)	$102,4 \pm 11,5$	$97,4 \pm 14$	0,123

5 см в одном из диаметров отмечался у 48,4 % пациентов, рецидивирующее течение глиобластомы встречалось в 13,6 % случаев.

Венозные тромбозомболические события в послеоперационном периоде были диагностированы у 21 пациента (6,2 %). При этом в случае тромбоза глубоких вен, который составил 61,9 % случаев ВТЭО, верификация осложнения происходила с помощью ультразвукового исследования вен нижних конечностей у симптомных пациентов. В 14,3 % случаев осложнением тромбоза глубоких вен стала тромбозомболия легочной артерии (ТЭЛА). Частота регистрации ТЭЛА во всей группе пациентов с ВТЭО составила 23,8 %.

В зависимости от наличия венозных тромбозомболических событий пациенты были разделены на две группы с целью анализа наличия факторов риска развития ВТЭО, предлагаемых в различных шкалах. У пациентов с наличием венозных тромбозов в послеоперационном периоде чаще встречалось рецидивирующее течение глиобластомы и размер опухоли превышал 5 см: 33 % ($n = 7$) против 13 % ($n = 41$); 85 % ($n = 18$) против 47 % ($n = 148$) ($p = 0,05$ и $p = 0,013$ соответственно) (табл. 1).

У пациентов с венозными тромбозомболическими осложнениями при поступлении уровень тромбоцитов было достоверно ниже, чем у пациентов из другой группы: 189 ± 72 против $240,8 \pm 93,3$ ($p = 0,04$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Глиобластома является наиболее распространенным вариантом среди первичных злокачественных новообразований головного мозга и ассоциирована с крайне высоким риском как ВТЭО, так и геморрагических рисков, связанных с антикоагулянтной терапией. Основными направлениями научно-практических исследований последних лет в этой области являются уточнение особенностей патогенеза развития тромбоза у пациентов с опухолями ЦНС и разработка специфических шкал стратификации риска ВТЭО с целью персонализированного подхода в выборе лечебной тактики. Настоящее ретроспективное исследование было посвящено оценке рутинного ведения данных пациентов в условиях одного центра с целью планирования дальнейшего проспективного исследования и оптимизации существующих подходов к профилактике ВТЭО.

Пациенты включались в исследование в соответствии с кодом основного диагноза — C71, выставляемого нейрохирургом при поступлении на основании клинической картины и данных МРТ

головного мозга. Пациенты с глиобластомой, верифицированной гистологически, составили большую часть этих больных — 59,5 % ($n = 201$). При этом частота ВТЭО составила 6,2 %, что значительно ниже приводимых в литературе данных. По данным разных авторов, частота тромбозов в послеоперационном периоде варьирует от 3 до 20 % и зависит в первую очередь от первичной профилактики и от способа детекции ВТЭО [16, 17]. Низкая встречаемость венозных тромбозов в нашем исследовании может объясняться в первую очередь ограниченным сроком наблюдения в рамках госпитализации пациента, тогда как максимальный риск отмечается в первые 6 недель после оперативного лечения, а в течение первого года наблюдения составляет 7–28 % [18, 19]. Кроме этого, следует отметить, что в рутинной клинической практике не регламентирован прицельный поиск венозных тромбозомболических осложнений, при этом большая часть тромбозов глубоких вен протекает бессимптомно [20].

Среди классических факторов риска развития венозных тромбозов следует отметить значимость в группе нейрохирургических пациентов факта иммобилизации пациента, отражением которого является степень пареза нижних конечностей и индекс Карновского, который в нашем исследовании составил 74,5 %. Примечательно, что такие факторы умеренного риска ВТЭО, как химиотерапия и лучевая терапия, в случае пациентов с глиобластомой свидетельствуют прежде всего о прогрессии опухолевого процесса, ассоциированной с высоким протромботическим риском. Это утверждение в полной мере подтверждают данные нашего исследования, согласно которым в группе с наличием ВТЭО чаще встречались пациенты с рецидивом глиобластомы при сравнении с группой без тромботических осложнений.

При анализе факторов риска, ассоциированных непосредственно с опухолью, помимо факта прогрессирования, крайне важным показателем оказался размер новообразования: в группе с ВТЭО чаще встречались глиобластомы более 5 см, что полностью соответствует данным других авторов и рекомендациям ESMO по нейроонкологии [21]. Типирование опухоли по статусу IDH1 мутации и метилирования гена MGMT (метил-гуанин-метил-трансферазы) представляется важным, так как обладает важным прогностическим свойством в отношении общей выживаемости больных и риска ВТЭО [22, 23].

Среди лабораторных маркеров, ассоциированных с риском венозных тромбозов у пациентов с глиобластомами, принято выделять тромбоцито-

пению, повышенный уровень растворимого Р-селектина как отражение активации тромбоцитов, лейкоцитоз и высокие значения Д-димера [24]. Согласно нашим данным, у пациентов в группе с ВТЭО значимо ниже был уровень тромбоцитов, что согласуется с данными других авторов. Показано, что активация тромбоцитов играет ключевую роль в патогенезе венозного тромбоза у пациентов с глиомами. При этом активно изучается роль подопланина, нейтрофилов и внеклеточных везикул в активации тромбоцитов [25, 26].

Важно отметить, что в настоящее время при де-текции ВТЭО у пациентов с опухолями головного мозга в периоперационном периоде нерешенным остается вопрос о сроках возможного назначения антикоагулянтов и длительности этой терапии. Особенно актуальным этот вопрос становится в рамках предоперационной подготовки и в раннем послеоперационном периоде. С одной стороны, любое нейрохирургическое вмешательство сопровождается крайне высоким риском внутричерепных кровотечений, с другой стороны, венозное тромбозомболическое событие само по себе может привести к фатальному исходу. Говоря о риске кровотечений, стоит отметить, что в нашей популяции у 54,5 % пациентов фоновая патология была представлена гипертонической болезнью, а у 18,2 % пациентов — болезнями ЖКТ, сочктающимися с сахарным диабетом 2 типа, что дополнительно увеличивало риск развития кровотечений и, безусловно, должно учитываться при назначениях антикоагулянтной терапии.

Для оценки геморрагического риска у пациентов с фибрилляцией предсердий разработаны разные шкалы, которые в основном нацелены на предсказание кровотечений из желудочно-кишечного тракта. Hankey и соавторы опубликовали шкалу, заточенную на оценку риска развития внутричерепного кровоизлияния у пациентов с фибрилляцией предсердий [27]. В шкале PANWARDS используются такие фактор риска, как тромбоцитопения, гипоальбуминемия, анамнез застойной сердечной недостаточности, использование варфарина, пожилой возраст, раса, гипертензия, инсульт или транзиторная ишемическая атака в анамнезе. Mantia C. и соавторы исследовали данную шкалу на популяции пациентов с глиомой и пришли к выводу, что данная шкала может быть использована для выделения той подгруппы пациентов, у которых внутричерепное кровотечение при применении антикоагулянтов маловероятно [28].

При назначении антикоагулянтов у нейрохирургических пациентов вопрос выбора конкретного препарата стоит особенно остро. Существуют

публикации, сравнивающие прямые оральные антикоагулянты с низкомолекулярными гепаринами [29, 30]. Данные публикации показали больший риск как кровотечений, так и рецидивирующих ВТЭО у пациентов с опухолями головного мозга, однако субанализ этой группы не был представлен и вряд ли был бы достоверным в связи с малой выборкой пациентов с данным типом онкологии. Существуют публикации, освещающие применение антикоагулянтной терапии у пациентов с опухолями головного мозга, согласно которым риск развития внутричерепных кровоизлияний увеличивался в 3 раза при использовании антикоагулянтов для лечения ВТЭО [31, 32]. Однако риск фатальных внутричерепных кровоизлияний был менее 1 %. Представляется интересным тот факт, что не было выявлено увеличения частоты встречаемости внутримозговых кровотечений у пациентов с метастатическим поражением головного мозга при использовании антикоагулянтной терапии в сравнении с контрольной группой, в которой данная терапия не применялась.

Согласно современным представлениям и рекомендациям, профилактическое назначение антикоагулянтов рекомендовано для госпитализированных пациентов с целью хирургического лечения онкологического заболевания в периоперационном периоде [33]. Отдельно стоит вопрос о пролонгации приема профилактических доз антикоагулянтов с учетом сохранения риска отдаленных ВТЭО. Однако существующие исследования у пациентов с глиобластомой не показали достоверной разницы в общей выживаемости больных при назначении терапии антикоагулянтами и в группе сравнения [34].

Таким образом, для уточнения показаний, сроков и длительности антикоагулянтной терапии как для лечения пациентов с ВТЭО, так и для профилактики данных состояний необходимы дальнейшие исследования с целью формирования группы высокого риска развития ВТЭО. Перспективными представляются как клинические рандомизированные исследования для оценки соотношения риск-польза от использования антикоагулянтов, так и фундаментальные исследования, уточняющие механизмы развития тромбозов в группе пациентов с злокачественными новообразованиями головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам нашего ретроспективного исследования частота развития венозных тромбозомболических осложнений среди пациентов с новообразованиями головного мозга составила 6,2 %, однако

нам представляется, что истинная распространенность этих событий выше. Среди факторов ВТЭО, ассоциированных с опухолью, следует отметить размер опухоли более 5 см, рецидивирующее течение глиобластомы и тромбоцитопению. Дальнейшие исследования, направленные на уточнение механизмов венозных тромбозов и создание шкал риска, специфичных для этой группы пациентов, помогут оптимизировать лечебные стратегии.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mantia C, Zwicker JI. Anticoagulation in the setting of primary and metastatic brain tumors. *Cancer Treat Res*. 2019;179:179–189.
- CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016 — PubMed [Internet]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675094/> (29 Oct 2021).
- Gerber DE, Grossman SA, Streiff MB; Management of venous thromboembolism in patients with primary and metastatic brain tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24(8):1310–1318.
- Weinstock MJ, Uhlmann EJ, Zwicker JI Intracranial hemorrhage in cancer patients treated with anticoagulation. *Thromb Res*. 2016;140(Suppl 1):S60–S65. DOI: 10.1016/S0049-3848(16)30100-1.
- Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, et al. Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. *Thromb Res*. 2013 Aug;132(2):180-4. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.06.026.
- Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, et al. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb Haemost*. 2013;110(2):378–385.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer*. 1996;77(9):1877–1883.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor in glioma. *Noshuyo Byori*. 1996;13(2):115–118.
- Matthias Preusser, Michael Weller. *Essentials for Clinicians: Neuro-Oncology*. ESMO Press, European Society for Medical Oncology, 2017. P. 100.
- Riedl J, Preusser M, Nazari PM, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2017;129(13):1831–1839.
- Lavallée V-P, Chagraoui J, MacRae T, et al. Transcriptomic landscape of acute promyelocytic leukemia reveals aberrant surface expression of the platelet aggregation agonist Podoplanin. *Leukemia*. 2018;32(06):1349–1357.
- Riedl J, Preusser M, Nazari PM, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2017;129(13):1831–1839.
- Lavallée V-P, Chagraoui J, MacRae T, et al. Transcriptomic landscape of acute promyelocytic leukemia reveals aberrant surface expression of the platelet aggregation agonist Podoplanin. *Leukemia*. 2018;32(06):1349–1357.
- Kobiakov GL, Absaliyeva OV, Poddubskiy AA, et al. The 2016 WHO classification of primary central nervous system tumors: a clinician's view. *Zhurnal Voprosy Neirokhirurgii Imeni N.N. Burdenko*. 2018;82(3):88-96. In Russian [Кобяков Г. Л., Абсалимова О. В., Поддубский А. А. и др. Классификация ВОЗ первичных опухолей центральной нервной системы 2016 г.: взгляд клинициста. Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2018;82(3):88-96].
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO classification of tumours of the central nervous system, revised. 4th Ed. IARC (Lyon). 2016;408.
- Perry J. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2012;14:iv73–80. DOI: 10.1093/neuonc/nos197.
- Horsted F, West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2012;9(07):e1001275.
- Marras LC, Geerts WH, Perry JR. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. *Cancer*. 2000;89(03):640–646.
- Walker AJ, West J, Card T, et al. Rate of venous thromboembolism by cancer type compared to the general population using multiple linked databases. *Thrombosis Res*. 2012;129(Suppl 1):S155–S156.
- Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications. 2015; 51. In Russian [Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболии. 2015;51].
- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25:iii93–iii101. DOI: 10.1093/annonc/mdl050.
- Combs SE, Rieken S, Wick W, et al. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back?

Radiat Oncol. 2011;6:115. DOI: 10.1186/1748-717X-6-115.

23. Hodges TR, Choi BD, Bigner DD, et al. Isocitrate dehydrogenase 1: what it means to the neurosurgeon: a review. *J Neurosurg.* 2013;118(6):1176-80. DOI: 10.3171/2013.3.JNS122282.

24. Riedl J, Ay C. Venous thromboembolism in brain tumors: Risk factors, molecular mechanisms, and clinical challenges. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45:334-341. DOI: 10.1055/s-0039-1688493.

25. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(32):13076-13081.

26. Leal AC, Mizurini DM, Gomes T, et al. Tumor-derived exosomes induce the formation of neutrophil extracellular traps: implications for the establishment of cancer-associated thrombosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):6438. DOI: 10.1038/s41598-017-06893-7.

27. Hankey GJ, Stevens SR, Piccini JP, et al. Intracranial hemorrhage among patients with atrial fibrillation anticoagulated with warfarin or rivaroxaban. The rivaroxaban once daily, oral, direct factor Xa inhibition compared with Vitamin K antagonism for prevention of stroke and embolism trial in atrial fibrillation. *Stroke.* 2014;45(5):1304-1312.

28. Mantia C, Uhlmann EJ, Puligandla M, et al. Predicting the higher rate of intracranial hemorrhage in glioma patients receiving therapeutic enoxaparin. *Blood.* 2017;129(25):3379-3385.

29. Raskob GE, van Es N, Verhamme P, et al. Hokusai VTE Cancer Investigators. Edoxaban for the treatment of cancer-associated venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2018;378(07):615-624.

30. Young AM, Marshall A, Thirlwall J, et al. Comparison of an oral factor Xa inhibitor with low molecular weight heparin in patients with cancer with venous thromboembolism: results of a randomized trial (SELECT-D). *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2017-2023.

31. Al Megren M, De Wit C, Al Qahtani M, et al. Management of venous thromboembolism in patients with glioma. *Thromb Res.* 2017;156:105-108.

32. Zwicker JI, Karp Leaf R, Carrier M. A meta-analysis of intracranial hemorrhage in patients with brain tumors receiving therapeutic anticoagulation. *J Thromb Haemost.* 2016;14(09):1736-1740.

33. Lyman GH, Bohlke K, Khorana AA, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline update 2014. *J Clin Oncol.* 2015;33(06):654-656.

34. Le Rhun E, Genbrugge E, Stupp R, et al. Associations of anticoagulant use with outcome in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer.* 2018;101(101):95-104.

Информация об авторах:

Пищулов Константин Анатольевич, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»;

Мельниченко Ольга Сергеевна, старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины».

Золотова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»;

Красношлык Павел Владимирович, К.М.Н., ведущий научный сотрудник НИЛ интегративных нейрохирургических технологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гуляев Дмитрий Александрович, Д.М.Н., руководитель лаборатории НИЛ интегративных нейрохирургических технологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симакова Мария Александровна, к.м.н., руководитель, старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины».

RISK FACTORS FOR VENOUS THROMBOEMBOLIC IN GLIOMA PATIENTS

Pishchulov K. A.¹, Melnichnikova O. S.¹, Zolotova E. A.¹,
Krasnoshlyk P. V.², Gulyaev D. A.², Simakova M. A.¹

¹World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

²Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Pishchulov Konstantin A.,
World-Class Research Centre for
Personalized Medicine,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: Pishchulov.k@gmail.com

Received 30 September 2021; accepted
01 November 2021.

ABSTRACT

Background. Venous thromboembolic events are a frequent complication in patients with malignant tumors of the central nervous system and occupy the third place in the structure of causes of the death. **Objective.** To evaluate risk factors for VTE in patients with malignant glioma. **Design and methods.** The retrospective study included 337 patients with malignant glioma. The diagnosis of glial brain tumor was verified according to the morphological study of an intraoperative sample using the WHO classification. The analysis of risk factors for VTE was performed in two groups, depending on the presence of confirmed venous thrombosis. **Results.** The incidence of venous thromboembolic complications among patients with brain neoplasms was 6.2%. In patients with venous thrombosis in the postoperative period, recurrent glioblastoma and the tumor size exceeded 5 cm was more common: 33% (n = 7) versus 13% (n = 41); 85% (n = 18) versus 47% (n = 148) (p = 0.05 and p = 0.013, respectively). In patients with venous thromboembolic complications on admission, the platelet level was significantly lower than in patients from the other group: 189 ± 72 versus 240.8 ± 93.3 (p = 0.04). **Conclusion.** Thrombocytopenia, recurrent glioblastoma, tumor size more than 5 cm are the risk factors for venous thromboembolic.

Key words: cardio-oncology, deep vein thrombosis of the legs, glioblastoma, pulmonary embolism, thromboembolic complications.

For citation: Pishchulov KA, Melnichnikova OS, Zolotova EA et al. Risk factors for venous thromboembolic in glioma patients. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):192-206.

List of abbreviations: VTEC — venous thromboembolic complications, ICD — international classification of diseases, MRI — magnetic resonance imaging, PE — pulmonary embolism, CNS — central nervous system.

INTRODUCTION

The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system (CNS) is based on histological and molecular criteria and includes malignant, benign and borderline tumors. Among malignant formations of the central nervous system, secondary tumors are leading, representing metastases of the main oncological process. It has been shown that a quarter of cancer patients develop intracranial metastases, while taking into account the increase in the attained age and the improvement of imaging diagnostic methods, the number of such patients increases every year [1]. Tumors of glial origin are the second most common among primary tumors of the central nervous system, while the most malignant variant of gliomas is glioblastoma, which occurs in 45.6 % of cases of all primary malignant brain tumors and with an extremely unfavorable prognosis. Thus, the median overall survival in the group of patients aged 18 to 40 years is 19.7 months, and among patients older than 70 years — only 4.5 months [2]. Venous thromboembolic events are a complication that frequently occur in patients with malignant CNS tumors and occupy the third place in the structure of causes of death after tumor progression and infectious complications. With metastatic brain lesion, venous thromboembolic complications (VTEC) occur in 20% of cases; in patients with glioblastoma, their incidence reaches 30% [3, 4]. One of the reasons for this high frequency of VTEC is the special pathogenetic mechanism of venous thrombosis, in which the tissue factor plays a key role. It has been shown that tumor cells release microparticles containing tissue factor into the bloodstream. High levels of these procoagulant microparticles are associated with increased risk of VTEC and reduced overall survival of patients [5, 6]. A number of authors demonstrated a high expression of tissue factor in gliomas, while the expression level correlated with the degree of tumor malignancy [7, 8]. Currently, much attention is also paid to the study of the mechanisms of platelet activation, which results in thrombocytopenia, which is characteristic of patients with malignant tumors of the CNS [9]. Prevention of VTEC in patients with brain formations is difficult given the lack of validated risk scales and high hemorrhagic risks. Current approaches to stratifying the risk of VTEC in patients with brain formations suggest individualizing factors associated with tumor and treatment, in addition

to traditional risk factors associated with the patient (age, immobilization, history of VTEC, obesity), [10, 11]. The factors associated with the tumor include the degree of malignancy and the large size of the formation, thrombosis of the vessels sprouting the tumor according to imaging techniques, the absence of mutation in the IDH1 gene. Factors associated with treatment include tumor biopsy, subtotal tumor resection, the use of corticosteroids and chemotherapy. Among the laboratory data, it is proposed to pay attention to the level of D-dimer, platelets and leukocytes, since a number of studies have shown that the level of D-dimer is more than 1.66 mg/ml, leukocytosis is more than $11.5 \times 10^9/l$ and platelets less than $196 \times 10^9/l$ are associated with a high risk of VTEC [12, 13].

The purpose of this study was to retrospectively assess risk factors for VTEC and the incidence of venous thrombosis in the postoperative period in patients with malignant neoplasms of the brain treated at the Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of Russia in 2020, using the data of the medical information system.

MATERIALS AND METHODS

The retrospective study included 337 patients admitted to the neurosurgical departments of the Almazov National Medical Research Centre with a preliminary diagnosis of C71 — a malignant neoplasm of the brain according to the International Classification of Diseases, revision 10 (ICD-10). In routine practice, this diagnosis usually encodes malignant tumors of glial origin, a large proportion of which is glioblastoma. The data analysis was performed using the qMS medical information system. The diagnosis of glioblastoma was previously made according to magnetic resonance imaging, the type was clarified during a morphological examination of the intraoperative sample using WHO classifications. This classification is based on the detection of one of the following signs in the microscopic picture of a morphological preparation: nuclear atypism, mitosis, proliferation of vascular endothelium, necrosis. These signs are taken into account as follows: Grade I — none of these signs; Grade II — the presence of one of these signs (as a rule, nucleus atypia, but single mitoses are possible); Grade III — there are many mitotic figures in the tumor; Grade IV — pronounced proliferation of vascular endothelium, the presence of necrosis [14, 15].

The results were processed using the IBM SPSS Statistics 26 statistical program. All are presented as median and quartiles Q25-Q75. The analysis of the normality of the sample distribution was carried out using the Kolmogorov–Smirnov criterion. Comparison of quan-

titative parameters in the studied groups was carried out using the Student's criterion and the Mann-Whitney criterion. The Levene criterion of equality of variances was also used to assess the validity of the Student's criterion. The criterion of statistical reliability of the results obtained was considered to be the value of $p < 0,05$, generally accepted in medicine.

RESULTS

The study included 337 patients. The average age was 52 ± 14.5 years, 44.7% of patients were male, while 55.3% were female. Of the significant comorbidities, hypertension occurred in 23.1% of patients, coronary heart disease in 11.6% of patients, and type 2 diabetes mellitus also attracts attention, which was recorded in 10.6% of patients.

This study included patients with a preliminary diagnosis of malignant neoplasm of the central nervous system who were scheduled for surgical treatment. According to the morphological study, in 2.4% of patients ($n = 8$) from the studied population, secondary (more often metastatic) lesion of the central nervous system was verified. The data of a morphological study to determine the degree of malignancy are presented in Figure 1.

Several classic risk factors can be associated with the risk of venous thromboembolic events, such as previously performed chemotherapy (33.3%), radiation therapy (37.1%) and obesity, which was registered in 11.6% of patients. The Karnovsky index in the examined group was 74.5% [70; 80], indirectly reflecting the

degree of immobilization of the patient, which is the most important risk factor for VTEC.

According to a retrospective study using a medical information system, it was not possible to objectively assess the frequency of paresis, which is due to the peculiarity of maintaining electronic medical records. In addition, it should be noted that the absence of such an important risk factor as previous venous thrombosis in the history of most patients is probably due to the lack of a special section in MIS and cannot fully reflect the true frequency of occurrence in the examined group.

Among the factors associated with treatment, corticosteroid therapy was used in 100% of cases, while tumor biopsy was performed in 3.4% of cases. The fact of complete or subtotal resection was not always reflected in the operation protocols and was difficult for retrospective evaluation.

Among the factors associated with the tumor, it is worth noting that the tumor size of more than 5 cm in one of the diameters was observed in 48.4% of patients, recurrent glioblastoma occurred in 13.6% of cases.

Postoperative venous thromboembolic events were diagnosed in 21 patients (6.2%). At the same time, in the case of deep vein thrombosis, which accounted for 61.9% of VTEC cases, the complication was verified by ultrasound examination of the veins of the lower extremities in symptomatic patients. Pulmonary embolism (PE) was a complication of deep vein thrombosis in 14.3% of cases. The frequency of registration of PE in the entire group of patients with VTEO was 23.8%.

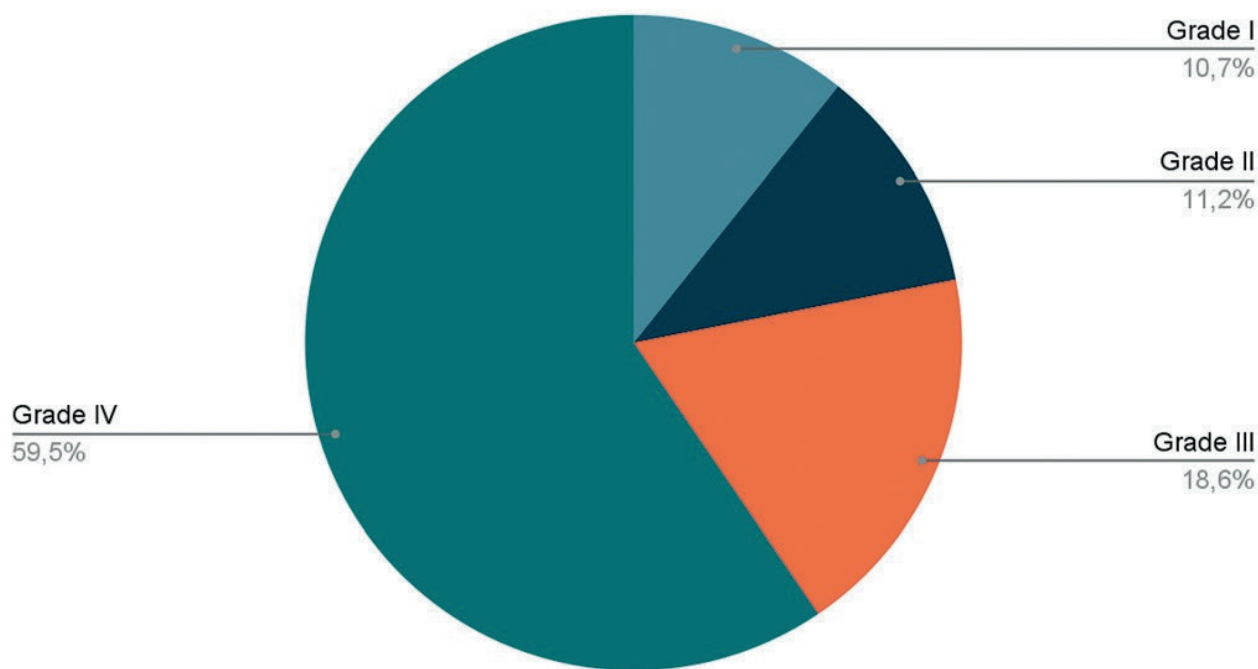


Fig. 1. Tumor distribution by degree of malignancy

Depending on the presence of venous thromboembolic events, patients were divided into two groups in order to analyze the presence of risk factors for VTEC, proposed in different scales. Patients with postoperative venous thrombosis were more likely to have recurrent glioblastoma and the tumor size exceeded 5 cm: 33% (n = 7) versus 13% (n = 41); 85% (n = 18) versus 47% (n = 148) (p = 0.05 and p = 0.013, respectively) (Table 1).

In patients with venous thromboembolic complications at admission, the platelet level was significantly lower than in patients from the other group: 189 ± 72 vs. 240.8 ± 93.3 (p = 0.04) (Table 2).

DISCUSSION

Glioblastoma is the most common variant among primary malignant neoplasms of the brain and is associated with an extremely high risk of both VTEC and hemorrhagic risks associated with anticoagulant therapy. The main directions of scientific and practical research in recent years in this area are to clarify the features of the pathogenesis of thrombosis in patients with CNS tumors and the development of specific VTEC risk stratification scales with the aim of a personalized approach to the choice of treatment tactics. This retrospective study was dedicated to the evaluation of rou-

tine management of patient data in a single center in order to plan further prospective research and optimize existing approaches to the prevention of VTEC.

Patients were included in the study in accordance with the code of the main diagnosis — C71, set by the neurosurgeon upon admission on the basis of the clinical picture and MRI data of the brain. Patients with histologically verified glioblastoma accounted for the majority of these patients — 59.5% (n = 201). At the same time, the frequency of VTEO was 6.2%, which is significantly lower than the data given in the literature. According to various authors, the incidence of thrombosis in the postoperative period varies from 3% to 20% and depends primarily on primary prevention and on the method of detection of VTEC [16, 17]. The low incidence of venous thrombosis in our study can be explained primarily by the limited observation period during the patient's hospitalization, while the maximum risk is noted in first 6 weeks after surgery, and during the first year of observation it is 7-28% [18, 19]. In addition, it should be noted that routine clinical practice does not regulate the targeted search for venous thromboembolic complications, while most of the deep vein thrombosis are asymptomatic [20].

Among the classic risk factors for venous thrombosis in the group of neurosurgical patients, noticeable is the

Table 1. Risk factors for venous thromboembolic events in patients depending on the presence of VTEC

Risk factors	Group 1 (n = 21), %	Group 2 (n = 316), %	p
History of chemotherapy	40	28	0.341
History of radiotherapy	40	32	0.536
Glioblastoma recurrence	33	13	0.05
The tumor size is more than 5 cm	85	47	0.013
Tumor biopsy	7	3	0.537

Table 2 Characteristics of laboratory data in patients

Laboratory data	Group 1	Group 2	Group 3
Hemoglobin level	$141,7 \pm 16,3$	$140,6 \pm 18,5$	0.831
White blood cell level	$9,7 \pm 3,9$	$10,7 \pm 4,4$	0.492
Platelet level	189 ± 72	$240,8 \pm 93,3$	0.04
Fibrinogen	$2,5 \pm 0,6$	$2,72 \pm 0,6$	0.492
Prothrombin time (Quick)	$102,4 \pm 11,5$	$97,4 \pm 14$	0.123

importance of the fact of immobilization of the patient, which is reflected in the degree of paresis of the lower extremities and the Karnovsky index, which in our study was 74.5%. It is noteworthy that moderate risk factors for VTEC, such as chemotherapy and radiation therapy, in the case of patients with glioblastoma, primarily indicate the progression of the tumor process, associated with a high prothrombotic risk. This statement is fully supported by the data of our study, according to which patients with relapse of glioblastoma were more common in the group with the presence of VTEC compared with the group without thrombotic complications.

In the analysis of risk factors directly associated with the tumor, in addition to the fact of progression, the size of the neoplasm was an extremely important indicator: in the group with VTEC glioblastomas exceeding 5 cm were more common, which fully complies with the data of other authors and ESMO recommendations for neurooncology [21]. Tumor typing by IDH1 mutation status and methylation of the MGMT (methyl-guanine-methyl-transferase) gene is important, as it has an important prognostic property in relation to the overall survival of patients and the risk of VTEC [22, 23].

Among laboratory markers associated with the risk of venous thrombosis in patients with glioblastoma, it is common to isolate thrombocytopenia, an increased level of soluble P-selectin as a reflection of activation platelets, leukocytosis and high D-dimer values [24]. According to our data, patients in the VTEC group had significantly lower platelet levels, which is consistent with the data of other authors. It has been shown that platelet activation plays a key role in the pathogenesis of venous thrombosis in patients with gliomas. At the same time, the role of podoplanin, neutrophils and extracellular vesicles in platelet activation is being actively studied [25, 26].

It is important to note that currently, when detecting VTEC in patients with brain tumors in the perioperative period, the question of the timing of the possible appointment of anticoagulants and the duration of this therapy still remains unsolved. This issue becomes especially relevant in the framework of preoperative preparation and in the early postoperative period. On the one hand, any neurosurgical intervention is accompanied by an extremely high risk of intracranial bleeding; on the other hand, a venous thromboembolic event itself can lead to fatal outcome. Speaking about the risk of bleeding, it is worth noting that in our population, in 54.5% of patients, background pathology was represented by hypertension and in 18.2% of patients — by gastrointestinal diseases associated with type 2 diabetes mellitus, which additionally increased the risk of bleeding and, of course, should be taken into account when prescribing anticoagulant therapy.

Different scales have been developed to assess hemorrhagic risk in patients with atrial fibrillation, which are mainly aimed at predicting bleeding from the gastrointestinal tract. Hankey et al. published a scale aimed at assessing the risk of intracranial hemorrhage in patients with atrial fibrillation [27]. The PANWARDS scale uses risk factors such as thrombocytopenia, hypoalbuminemia, history of congestive heart failure, warfarin use, advanced age, race, hypertension, stroke or a history of transient ischemic attack. Mantia C. et al. studied this scale on a population of patients with glioma and concluded that the use of this scale to identify the subgroup of patients with intracranial bleeding with anticoagulants is highly doubtful [28].

When prescribing anticoagulants in neurosurgical patients, the question of choosing a specific drug is particularly acute. There are publications comparing direct oral anticoagulants with low molecular weight heparins [29, 30]. These publications showed a greater risk of both bleeding and recurrent VTEC in patients with brain tumors, however subanalysis of this group was not presented and probably it wouldn't be reliable due to a small sample of patients with this type of oncology. There are publications highlighting the use of anticoagulant therapy in patients with brain tumors, according to which the risk of developing intracranial hemorrhages increased by 3 times with use of anticoagulants for the treatment of VTEC [31, 32]. However, the risk of fatal intracranial hemorrhages was less than 1%. It appears to be interesting that no increase was found in the incidence of intracerebral bleeding in patients with metastatic brain lesion when using anticoagulant therapy compared to the control group in which this therapy was not used.

According to modern concepts and recommendations, the prophylactic administration of anticoagulants is recommended for hospitalized patients with the purpose of surgical treatment of cancer in the perioperative period [33]. A separate issue is the prolongation of the intake of preventive doses of anticoagulants, taking into account the continued risk of remote VTECs. However, existing studies in patients with glioblastoma have not shown a reliable difference in the overall survival of patients with anticoagulant therapy and in the comparison group [34]. Thus, in order to clarify the indications, timing and duration of anticoagulant therapy both for the treatment of patients with VTEC and for the prevention of these conditions, further studies are needed to form a high-risk group for the development of VTEC. Randomized clinical trials to assess the risk-benefit ratio of the use of anticoagulants look promising, and so do fundamental studies clarifying thrombogenesis mechanisms in a group of patients with malignant brain neoplasms.

CONCLUSION

According to the results of our retrospective study, the incidence of venous thromboembolic complications among patients with brain neoplasms was 6.2%, however, it seems to us that the true prevalence of these events is higher. Among the tumor-associated VTEC factors, the tumor size exceeding 5 cm, the recurrent course of glioblastoma and thrombocytopenia are worth noting. Further studies aimed at clarifying the mechanisms of venous thrombosis and creating risk scales specific to this group of patients will help optimize treatment strategies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Mantia C, Zwicker JI. Anticoagulation in the setting of primary and metastatic brain tumors. *Cancer Treat Res*. 2019;179:179–189.
- CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016 — PubMed [Internet]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675094/> (29 Oct 2021).
- Gerber DE, Grossman SA, Streiff MB; Management of venous thromboembolism in patients with primary and metastatic brain tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24(8):1310–1318.
- Weinstock MJ, Uhlmann EJ, Zwicker JI Intracranial hemorrhage in cancer patients treated with anticoagulation. *Thromb Res*. 2016;140(Suppl 1):S60–S65. DOI: 10.1016/S0049-3848(16)30100-1.
- Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, et al. Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. *Thromb Res*. 2013 Aug;132(2):180–4. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.06.026.
- Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, et al. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb Haemost*. 2013;110(2):378–385.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer*. 1996;77(9):1877–1883.
- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor in glioma. *Noshuyo Byori*. 1996;13(2):115–118.
- Matthias Preusser, Michael Weller. *Essentials for Clinicians: Neuro-Oncology*. ESMO Press, European Society for Medical Oncology, 2017. P. 100.
- Riedl J, Preusser M, Nazari PM, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2017;129(13):1831–1839.
- Lavallée V-P, Chagraoui J, MacRae T, et al. Transcriptomic landscape of acute promyelocytic leukemia reveals aberrant surface expression of the platelet aggregation agonist Podoplanin. *Leukemia*. 2018;32(06):1349–1357.
- Riedl J, Preusser M, Nazari PM, et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2017;129(13):1831–1839.
- Lavallée V-P, Chagraoui J, MacRae T, et al. Transcriptomic landscape of acute promyelocytic leukemia reveals aberrant surface expression of the platelet aggregation agonist Podoplanin. *Leukemia*. 2018;32(06):1349–1357.
- Kobiakov GL, Absaliyeva OV, Poddubskiy AA, et al. The 2016 WHO classification of primary central nervous system tumors: a clinician's view. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko*. 2018;82(3):88–96. In Russian [Кобяков Г. Л., Абсалимова О. В., Поддубский А. А. и др. Классификация ВОЗ первичных опухолей центральной нервной системы 2016 г.: взгляд клинициста. Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2018;82(3):88–96].
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO classification of tumours of the central nervous system, revised. 4th Ed. IARC (Lyon). 2016;408.
- Perry J. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2012;14:iv73–80. DOI: 10.1093/neuonc/nos197.
- Horsted F, West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2012;9(07):e1001275.
- Marras LC, Geerts WH, Perry JR. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. *Cancer*. 2000;89(03):640–646.
- Walker AJ, West J, Card T, et al. Rate of venous thromboembolism by cancer type compared to the general population using multiple linked databases. *Thrombosis Res*. 2012;129(Suppl 1):S155–S156.
- Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications. 2015; 51. In Russian [Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоемболических осложнений. 2015;51].
- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25:iii93–iii101. DOI: 10.1093/annonc/mdl050.
- Combs SE, Rieken S, Wick W, et al. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back?

Radiat Oncol. 2011;6:115. DOI: 10.1186/1748-717X-6-115.

23. Hodges TR, Choi BD, Bigner DD, et al. Isocitrate dehydrogenase 1: what it means to the neurosurgeon: a review. *J Neurosurg.* 2013;118(6):1176-80. DOI: 10.3171/2013.3.JNS122282.

24. Riedl J, Ay C. Venous thromboembolism in brain tumors: Risk factors, molecular mechanisms, and clinical challenges. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45:334–341. DOI: 10.1055/s-0039-1688493.

25. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(32):13076–13081.

26. Leal AC, Mizurini DM, Gomes T, et al. Tumor-derived exosomes induce the formation of neutrophil extracellular traps: implications for the establishment of cancer-associated thrombosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):6438. DOI: 10.1038/s41598-017-06893-7.

27. Hankey GJ, Stevens SR, Piccini JP, et al. Intracranial hemorrhage among patients with atrial fibrillation anticoagulated with warfarin or rivaroxaban. The rivaroxaban once daily, oral, direct factor Xa inhibition compared with Vitamin K antagonism for prevention of stroke and embolism trial in atrial fibrillation. *Stroke.* 2014;45(5):1304–1312.

28. Mantia C, Uhlmann EJ, Puligandla M, et al. Predicting the higher rate of intracranial hemorrhage in glioma patients receiving therapeutic enoxaparin. *Blood.* 2017;129(25):3379–3385.

29. Raskob GE, van Es N, Verhamme P, et al. Hokusai VTE Cancer Investigators. Edoxaban for the treatment of cancer-associated venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2018;378(07):615–624.

30. Young AM, Marshall A, Thirlwall J, et al. Comparison of an oral factor Xa inhibitor with low molecular weight heparin in patients with cancer with venous thromboembolism: results of a randomized trial (SELECT-D). *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2017–2023.

31. Al Megren M, De Wit C, Al Qahtani M, et al. Management of venous thromboembolism in patients with glioma. *Thromb Res.* 2017;156:105–108.

32. Zwicker JI, Karp Leaf R, Carrier M. A meta-analysis of intracranial hemorrhage in patients with brain tumors receiving therapeutic anticoagulation. *J Thromb Haemost.* 2016;14(09):1736–1740.

33. Lyman GH, Bohlke K, Khorana AA, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline update 2014. *J Clin Oncol.* 2015;33(06):654–656.

34. Le Rhun E, Genbrugge E, Stupp R, et al. Associations of anticoagulant use with outcome in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer.* 2018;101(101):95–104.

Author information:

Pishchulov Konstantin A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Melnichenkova Olga S., Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Zolotova Ekaterina A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Krasnoshlyk Pavel V., PhD., Leading Researcher, Research Laboratory of Integrative Neurosurgical Technologies of the Almazov National Medical Research Centre;

Gulyaev Dmitry A., MD, Head of Laboratory, Research Laboratory of Integrative Neurosurgical Technologies of the Almazov National Medical Research Centre;

Simakova Maria A., PhD., Head, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 620.3:61

СИНТЕЗ МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ В МИКРОФЛЮИДНЫХ РЕАКТОРАХ ДЛЯ БИМЕДИЦИСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Лазарева Е. О.^{1, 2}, Евстапов А. А.³, Гареев К. Г.², Чебуркин Ю. В.¹,
Крижанович А.², Королев Д. В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Лазарева Елизавета Олеговна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: lizzifox@yandex.ru

Статья поступила в редакцию
11.10.2021 и принята к печати
09.11.2021.

РЕЗЮМЕ

В настоящее время наблюдается тенденция к внедрению микрофлюидных устройств во многих областях биомедицины: синтез лекарств, тераностика, биосенсоры. Такие устройства обеспечивают быстрое и достаточное перемешивание в микрофлюидных каналах, позволяют получать монодисперсные частицы, в том числе наноразмерные, проводить контроль за условиями синтеза и точно регулировать физико-химические свойства получаемых субстанций. Сенсоры на основе микрофлюидики позволяют детектировать различные патологические процессы. Настоящий обзор литературы дает представление о принципах построения микрофлюидных устройств и систем дозирования реактивов, а также о материалах для микрофлюидных чипов. Приведены примеры использования микрофлюидики в различных областях биомедицины.

Ключевые слова: биосенсоры, микрофлюидика, тераностика.

Для цитирования: Лазарева Е.О., Евстапов А.А., Гареев К.Г. и др. Синтез микро- и наночастиц в микрофлюидных реакторах для биомедицинского применения. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):207-236.

Список сокращений: КТ — квантовая точка, ЛНЧ — «лаборатория-на-чипе», МНЧ — магнитные наночастицы, МФЧ — материал микрофлюидного чипа, ОНЧ — «орган-на-чипе», ПДМС — полидиметилсилоксан, ФА — флуоресцентный агент, ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлюидные реакторы — устройства, созданные для синтеза веществ и частиц с использованием малых потоков жидкости в каналах микро- и нанометрового размера. Хотя микрофлюидные реакторы были впервые разработаны в начале 90-х годов прошлого века, новые конструкторские решения в топологиях реакторов нашли применения в медицине, фармацевтике и химической промышленности для диагностики, кристаллизации, химического и комбинаторного синтеза, а также быстрых методов анализов.

Разработка миниатюрных реакторов обладает множеством потенциальных достоинств по сравнению с более традиционными способами синтеза химикатов и твердых частиц. Благодаря хорошему контролю реакции, малому расходу реагентов, высокой чувствительности и более безопасной рабочей среде, микрофлюидные устройства хорошо показали себя для более масштабного производства химических соединений с четко определенными и заранее определенными свойствами. Это повышает качество химических субстанций и для фармацевтических производств.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОФЛЮИДНОГО СИНТЕЗА

Микрофлюидные технологии играют чрезвычайно важную роль не только в химическом синтезе, но и в синтезе наночастиц. Наночастицы, полученные с применением микрофлюидного синтеза, нашли применение в таких областях, как медицина [1], электроника [2], косметология [3], солнечная энергетика [4] и другие. В общем виде области применения микрофлюидного синтеза можно проиллюстрировать рисунком 1.

По причине того, что физические и химические свойства нанообъектов зависят от размера, формы и кристаллической структуры, для получения материалов с необходимыми характеристиками и свойствами их синтез требует прецизионного контроля кинетических и термодинамических параметров. Таким образом, роль микрореакторов в синтезе наноматериалов сводится к двум основным задачам — это синтез с контролируемым раз-

мером, формой и структурой и регулирование за счет непрерывных потоковых процессов.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ

Выбор материала микрофлюидного чипа (МФЧ) зависит от целей его использования и реагентов, используемых в ходе исследований.

Традиционными материалами для масштабного производства микрофлюидных устройств являются кремний, кварц, стекло. МФЧ из данных материалов изготавливаются методом фотолитографии [5]. Стекло и кремний используются из-за их термостабильности и совместимости с химическими растворителями в реакциях на кристалле [6], образовании капель [7] и экстракции [8].

Для быстрого прототипирования и исследований в лаборатории обычно используются полимерные материалы, которые были выбраны из-за более низкой цены и более простой технологии изготовления МФЧ. Одним из наиболее часто используемых материалов является полидиметилсилоксан (ПДМС) марки Sylgard 184. Это связано с рядом причин. Жидкий форполимер ПДМС термически отверждается при умеренных температурах (40–70 °С), его можно отливать с нанометровым разрешением с помощью метода мягкой литографии из мастер-форм, изготовленных из кремния, стекла или фоторезиста SU-8 [9], его низкое поверхностное натяжение значительно облегчает отслаивание от шаблонов после отверждения. Чип ПДМС может быть обратимо и конформно загерметизирован с другой частью, сделанной из ПДМС, стекла или другого материала, подложки простым соединением. Однако в случае применения ПДМС требует больше внимания химическая совместимость полимеров с используемыми реагентами. Кроме того, многие полимеры не рассчитаны на использование при высоких температурах.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ НА ОСНОВЕ ПДМС

МФЧ на основе ПДМС изготавливаются при помощи методов мягкой литографии. Последовательность действий при изготовлении таких чипов показана на рисунке 2. Для этого сначала смешивается база ПДМС с отвердителем в массовом соотношении 10:1 и заливается в мастер-форму, обычно изготовленную из кремния методом фотолитографии, с макромасштабным рисунком. Для удаления пузырьков воздуха используется вакуумный эксикатор с насосом. Дегазированный ПДМС помеща-



Рис. 1. Общая схема применения микрофлюидного синтеза

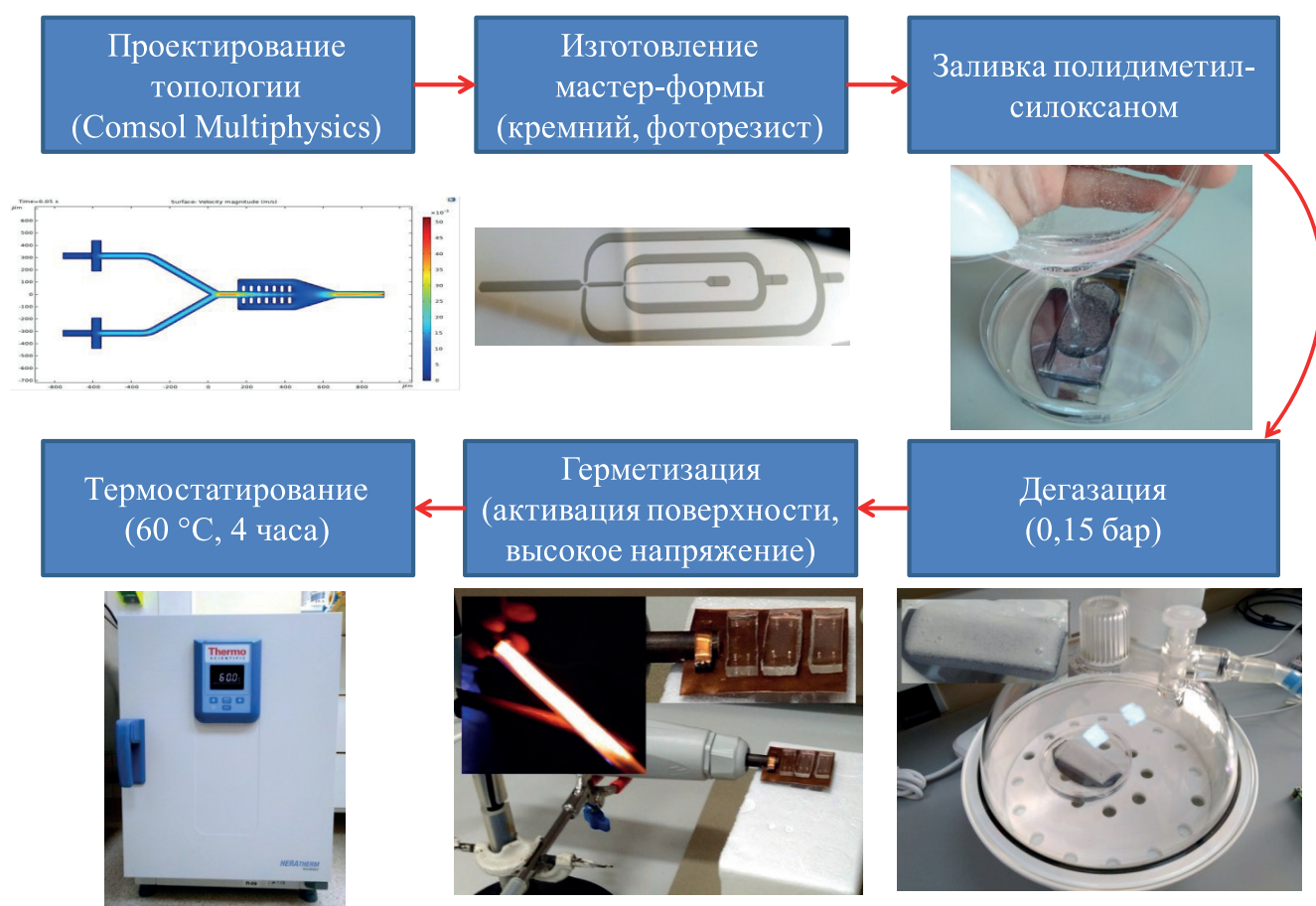


Рис. 2. Схема изготовления МФЧ на основе ПДМС

ют в печь для затвердевания на 4 часа при 60 °С. Отвержденная реплика из ПДМС удаляется с подложки при помощи острого лезвия. Герметизация реплики из ПДМС со стеклянной пластиной может происходить разными способами, например, обработкой в плазме и воздействием токами высокой частоты [10]. После этого готовый МФЧ готов к работе. Приведенный протокол изготовления постоянно пересматривается и улучшается [11]. В данном виде он используется в микрофлюидных исследованиях последних десятилетий [12–14].

КОНСТРУКЦИЯ И ТОПОЛОГИЯ МИКРОФЛЮИДНОГО УСТРОЙСТВА

К выбору типа микрофлюидного устройства, используемого для синтеза наноматериалов, нужно подходить, учитывая все возможные факторы. Простота конструкции приводит к легкой масштабируемости процесса, но снижает качество производимых наноматериалов.

Микрореакторы с более сложной конструкцией позволяют лучше контролировать свойства наночастиц, однако масштабирование процесса может стать проблемой. В этом случае предпочтительнее использовать МФЧ с топологиями, предполагающими работу в непрерывном режиме, особенно для наноматериалов, которые менее чувствительны к изменениям условий реакции.

Микрофлюидные реакторы для химического синтеза можно разделить на три основные категории: реакторы с ламинарным потоком непрерывного действия, реакторы с сегментированным потоком и реакторы на основе капель [15].

Микрореакторы с непрерывным ламинарным потоком включают только однофазные потоки жидкости. Несколько жидких реагентов различного состава и концентрации подаются в МФЧ через входные отверстия. В этих микрореакторах с преобладанием ламинарного потока смешение является ключевым процессом для оптимизации производства.

Методы смешения можно разделить на две большие группы. К первой группе можно отнести МФЧ с топологиями с фокусировкой потоков. Гидродинамическая фокусировка — один из самых важных методов в микрофлюидном синтезе материалов [16, 17]. Гидродинамическая фокусировка всегда происходит в МФЧ с топологиями, предусматривающими трехвходный канал, в котором есть средний и два боковых впускных канала вертикально или под углом (менее 90°) к среднему. Кроме того, расход центрального канала меньше боковых, так что средний поток может быть сфокусированным и смешиваться с боковыми потоками быстро и в достаточной степени. Время перемешивания в основном зависит от соотношения расхода боковых и среднего впускных каналов.

Вторая группа методов смешения касается МФЧ с топологиями для условно более эффективного смешивания. Самые простые топологии чаще всего представляют собой два впускных канала Y-образного микрофлюидного реактора, создавая пересыщенную область на границе диффузионного смешения между двумя взаимно диффундирующими потоками реагентов.

Использование микроструктур, таких как прямые микроканалы [18], изогнутые микроканалы [19], микроканалы со спиралью [20] и хребтовид-

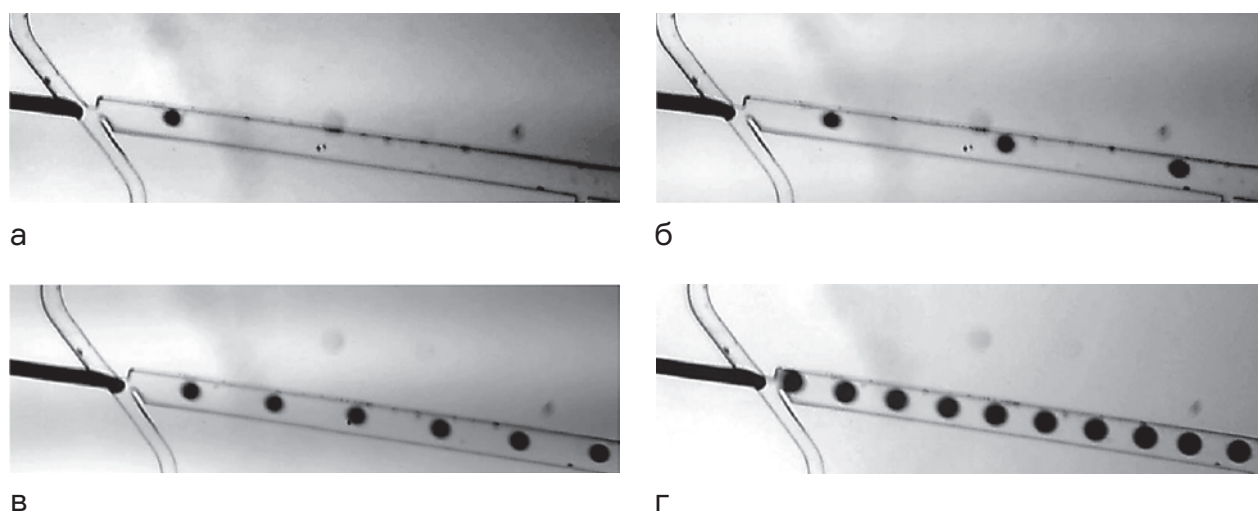


Рис. 3. Примеры получения суспензии магнитной жидкости при различном давлении подачи минерального масла (P1 = 6,0 кПа) и магнитной жидкости (P2): а — P2 = 6,2 кПа; б — P2 = 6,8 кПа; в — P2 = 7,5 кПа; г — P2 = 8,5 кПа

ные смесители [21], может еще больше повысить эффективность смешения за счет внесения возмущений и продления времени смешения потоков в процессе синтеза наночастиц.

Микрореакторы с сегментированным потоком обычно включают несколько потоков жидкой фазы для реагентов и один поток газовой фазы для создания газовых пузырьков с целью изоляции различных сегментов реагентов. Газовые пузырьки образуются из-за различий в поверхностном натяжении между газовой и жидкой фазами. В типовой конструкции два или более реагента в жидких фазах вводятся в микрореактор через входные отверстия. В конструкцию могут быть добавлены дополнительные входы и секции в зависимости от требований для проведения реакции. Микрофлюидные реакторы с сегментированным потоком могут загрязняться из-за физического контакта реагентов и стенок канала. Иногда эту проблему можно решить, проведя анализ гидрофобности стенок канала.

Одним из самых больших преимуществ капельных микрореакторов является разделение на части, с помощью которого могут быть достигнуты быстрое перемешивание, хороший контроль времени и реагентов, а также микросреда, свободная от загрязнений. Такие микрореакторы обычно включают несколько потоков дисперсионной жидкой фазы реагентов и поток несмешивающейся дисперсионной среды для образования капель. Самыми простыми геометрическими конструкциями для образования капель являются Т-образный и Y-образный инжекторы [22]. В них размер капель зависит от ширины канала и скорости потока.

Одной из разновидностей капельных реакторов является МФЧ с топологией с фокусировкой потока, предназначенная для изготовления суспензий. Принцип действия таких реакторов основан

на «сдувании» капель в непрерывном потоке. Применение данной топологии показано на рисунке 3. При различной скорости потока получаются разные размеры капель от 30 мкм (рис. 3, а) до 60 мкм (рис. 3, г), что позволяет регулировать не только скорость образования суспензии, но и дисперсность.

СИСТЕМЫ ПОДАЧИ РЕАГЕНТОВ

В микрофлюидное устройство жидкости могут подаваться шприцевым насосом (рис. 4, а) или под действием приложенного давления (рис. 4, б) [23]. Преимуществом шприцевых насосов является фиксированная объемная скорость потока, однако они также имеют большое время отклика и периодические пульсации. Низкое время отклика делает шприцевые насосы непригодными для усовершенствованного формирования рисунка капель, поскольку скорость потока и результирующую скорость образования капель нельзя быстро изменить.

Системы контроля давления способны индивидуально управлять потоком множества жидкостей одновременно. Они имеют время отклика до 40 мс. Поток в таких системах безимпульсный, однако есть вероятность обратного движения жидкости.

Кроме указанных традиционных систем подачи жидкостей иногда также используются ручные шприцы [24] и лабораторные аналоги [25].

Для проведения синтеза в лабораторных условиях может быть использована небольшая установка (рис. 5), состоящая из светового микроскопа, микрофлюидного контроллера давления с компрессором, капилляров и персонального компьютера с программой для управления системой подачи реагентов. Такая установка была разработана в НМИЦ им. В. А. Алмазова совместно с Институтом аналитического приборостроения.



а

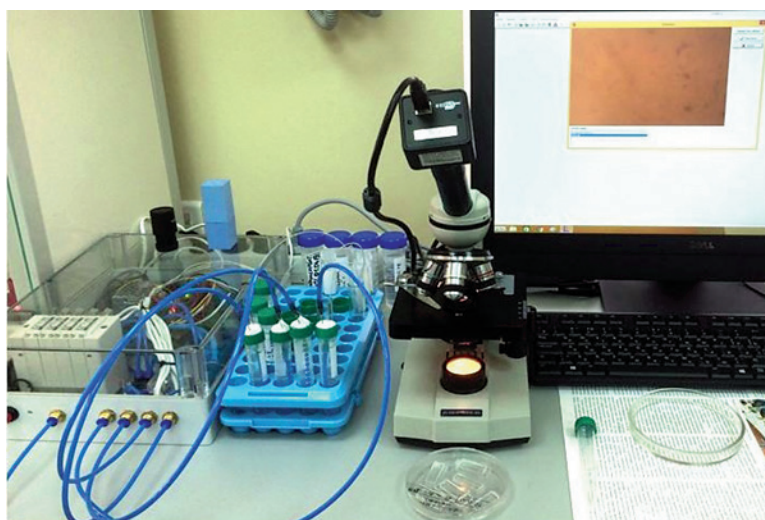


б

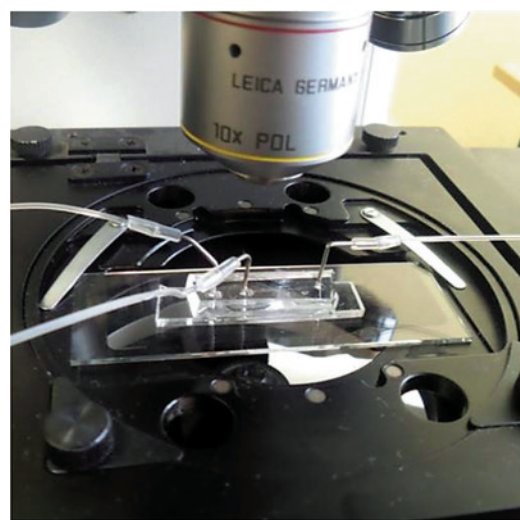
Рис. 4. Примеры систем подачи реагентов:

а — шприцевой насос Harvard Apparatus Pump 11 Elite;

б — контроллер микрожидкостного потока Elveflow OB1 MK3 +



а



б

Рис. 5. Пример установки микрофлюидного синтеза:
а — общий вид; б — микрофотография чипа

МИКРОФЛЮИДНЫЙ СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

За последнее десятилетие эксперименты с использованием микрофлюидных реакторов продемонстрировали, что можно с высокой точностью управлять физическими свойствами различных наноматериалов, таких как квантовые точки, наночастицы, нанотрубки, нанопроволоки и нанокомпозиты, путем управления параметрами роста нанокристаллов и кинетикой процессов. Помимо микрофлюидных подходов, основанных на ламинарном потоке, эксперименты, использующие методы микрофлюидных капель для синтеза наночастиц, также оказались успешными. При этом разработка микрофлюидных устройств для синтеза магнитных наноматериалов все еще находится на начальном этапе развития. Тем не менее доступная информация из литературы указывает на то, что существует потенциал для получения лучшего контроля над размером, распределением по размерам, кристаллической структурой и формой магнитных наночастиц (МНЧ) как в мелкомасштабных, так и в крупномасштабных процессах [26, 27].

Компактная система управления технологическим процессом — это эффективный инструмент, который ускоряет оптимизацию параметров синтеза и определение характеристик МНЧ для наномедицинских, тераностических и биосенсорных приложений на основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Создана и испытана [28] такая автоматизированная система, которая объединяет миниатюр-

ный ЯМР-релаксметр и проточный микрореактор для синтеза и определения характеристик МНЧ на основе оксида железа. Свойства ЯМР-релаксации количественно оценивались в поле постоянного магнита индукцией 0,5 Тл для измерения времени поперечной (T_2) и продольной (T_1) релаксации. Наночастицы с размером кристаллитов около 25 нм получали соосаждением в микрофлюидном реакторе с трехмерной гидродинамической фокусировкой потока, чтобы избежать засорения каналов.

Предложен микрофлюидный метод синтеза магнитных флуоресцентных липосом [29]. МНЧ были функционализированы аминogруппой в микрофлюидном реакторе и затем ковалентно связаны с карбоксильными группами, иммобилизованными внутри липосом. Такие липосомы обладали хорошей биологической связываемостью и накоплением под действием магнитного поля.

В работе [30] продемонстрировано, что микрофлюидная электропорация может эффективно способствовать синтезу МНЧ, покрытых биомиметической клеточной мембраной. Магнитные наночастицы Fe_3O_4 и везикулы, полученные из мембран эритроцитов (RBC-везикулы), вводились в микрофлюидное устройство. Когда смесь магнитных наночастиц и RBC-везикул протекала через зону электропорации, электрические импульсы способствовали проникновению МНЧ в RBC-везикулы. После этого полученные RBC-покрытые мембраной МНЧ собирались с чипа и вводились экспериментальным животным для тестирования *in vivo*. Благодаря хорошим магнитным и фото-

термическим свойствам ядер МНЧ и длительной циркуляции в крови, характерной для мембранных оболочек эритроцитов, полученные нанообъекты использовались для контрастно-усиленной магнитно-резонансной томографии опухолей и фототермической терапии.

Функционализированные гиалуроновой кислотой наночастицы KGdF_4 , легированные лантаноидами, были синтезированы в два этапа на микрофлюидной платформе [31]. Микрофлюидный синтез наночастиц KGdF_4 , легированных Ln^{3+} , был осуществлен при комнатной температуре в непрерывном режиме с использованием чипа с четырьмя входами. На втором этапе в отдельном МФЧ с Т-топологией на поверхности наночастиц KGdF_4 , легированных Ln^{3+} , при помощи электростатической адсорбции непрерывно иммобилизовалась гиалуроновая кислота. Дисперсный состав полученных нанообъектов был однородным, они показали высокую биосовместимость, целенаправленное клеточное поглощение, фотолуминесцентные и магнитно-резонансные свойства.

В НИИЦ им. В. А. Алмазова совместно с Институтом аналитического приборостроения была разработана топология МФЧ для синтеза МНЧ. Изначально было выявлено, что о частицы магнетита в ходе проведения химической реакции оседают на стенках канала, создавая агрегаты, что в узком проходе апертуры приводит к образованию закупорки канала и сильно затрудняет протекание потоков (рис. 6, а). Увеличивая давление, пробить закупорку еще представляется возможным, но в конечном итоге вся поверхность канала загрязняется, и проведение синтеза невозможно (рис. 6, б). Не решает проблему и добавление различных поверхностно-активных веществ.

По указанным причинам было принято решение отказаться от синтеза МНЧ в МФЧ с Т-образной топологией и разработать более сложную схему синтеза. Она представляет собой систему из 4 входных интерфейсов и 1 выходного, соединенного системой каналов (рис. 7). Интерфейсы 1 и 2 предназначены для подачи непрерывной среды из минерального масла. Два различных входа для одной среды необходимы для подачи масла с различной скоростью, что реализует подачу микроэмульсий водных растворов с различной скоростью и тем самым позволяет проводить эффективное смешивание с помощью внутренней рециркуляции внутри капли. Интерфейсы 3 и 4 предназначены для поступления в каналы водных растворов сульфата железа и гидроксида аммиака, которые являются дисперсными фазами. В перекрестиях 5 реализуется каплеобразование водных растворов методом фокусировки потока. Далее капли поступают в реакционную камеру 6 с массивом стенок для торможения капель. Здесь происходит их слияние и продвижения далее по каналам. Змеевидный участок каналов 7 необходим для лучшего перемешивания объема капель посредством реакции дисперсной фазы на стенках канала. Интерфейс 8 служит для вывода продуктов реакции из МФЧ.

Микрофлюидный синтез и системы тераностики

Тераностика определяется в том числе как подход к разработке фармацевтических композиций, заключающийся в комплексном решении терапевтических и диагностических проблем путем создания препаратов, которые являются одновременно и средством ранней диагностики, и тера-



а



б

Рис. 6. Загрязнение МФЧ с Т-образной топологией при синтезе МНЧ: а — первоначальное загрязнение; б — полное заполнение

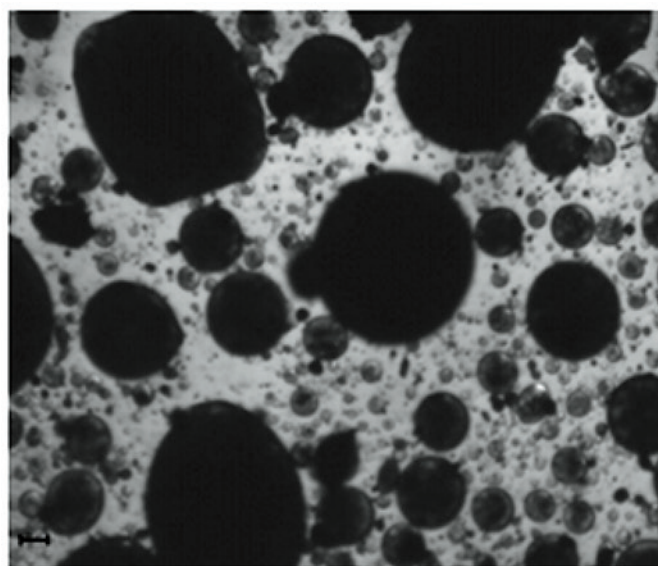
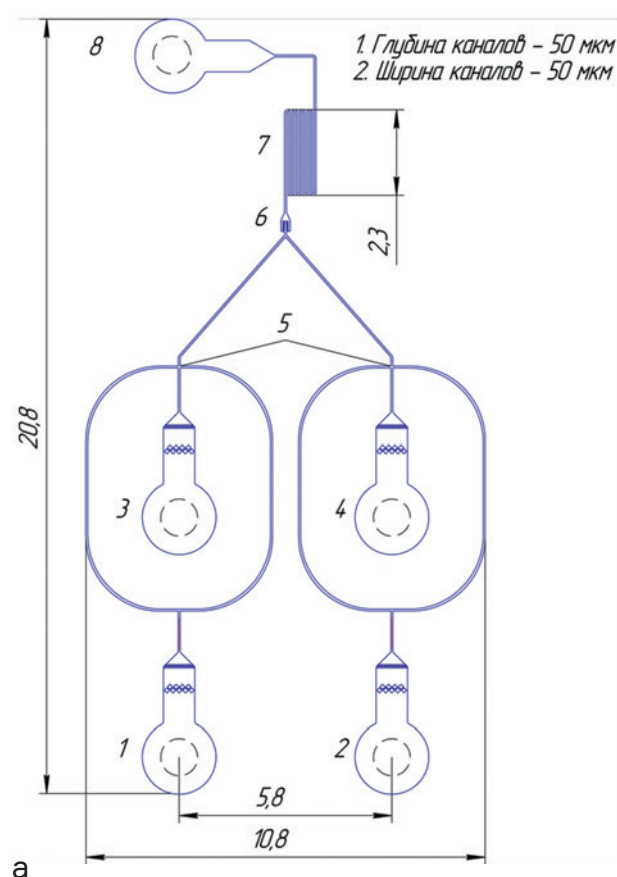


Рис. 7. Топология МФЧ для синтеза магнитных наночастиц (а) и суспензия капель, содержащих наночастицы (б)

певтическим агентом [32]. Американское научное сообщество выделяет тераностику как часть персонализированной, прецизионной медицины, в которой лекарства подбираются индивидуально для каждого пациента на основе его прогнозируемого ответа или индивидуального риска заболевания [33]. И в том и в другом случае для синтеза подобных объектов довольно интересным является применение микрофлюидных систем с несколькими каскадами. Публикации по тераностике согласно базе данных PubMed исходят из 90-х годов, где для разработки лекарств стал применяться системный подход, основанный на точности и селективности [34]. При этом сам термин был введен Функхаузером в 2002 году и определен как интеграция двух модальностей, то есть терапии и медицинской визуализации в единый «пакет» материала для преодоления нежелательных вариаций в биораспределении и терапевтической эффективности [35]. При этом количество публикаций по этой тематике неизменно растет (рис. 8. а). Микрофлюидика стала активно развиваться в начале нулевых годов (рис. 8. б), и количество статей также неуклонно возрастает. Однако существует лишь ограниченное

количество публикаций по тематике применения микрофлюидики в тераностике, не превышающее на сегодняшний день ста публикаций в год (рис. 8. в). По-видимому, это связано со сложностями синтеза и модификации нанообъектов в узких каналах.

В настоящее время задача синтеза объектов тераностики на основе микрофлюидных технологий сводится к двум аспектам: синтез самих наночастиц и их модификация. Для этого применяются МФЧ различных топологий [36]. Общая схема такого синтеза может быть проиллюстрирована рисунком 9. Она включает синтез наночастиц, спейсера, иммобилизацию действующего вещества, нанесение оболочки, иммобилизацию контраста, а также очистку от промежуточных продуктов реакции [37]. На каждой стадии возможен контроль операции. При синтезе наночастиц это контроль распределения по размерам методом динамического светорассеяния (DLS) [38], на стадиях иммобилизации действующих веществ — ИК-Фурье анализ [39], при иммобилизации флуорофоров — это флуоресцентный анализ [40, 41]. Все эти виды анализа, а также ПЦР и другие можно реализовать в отдельных микрочипах [42–46].

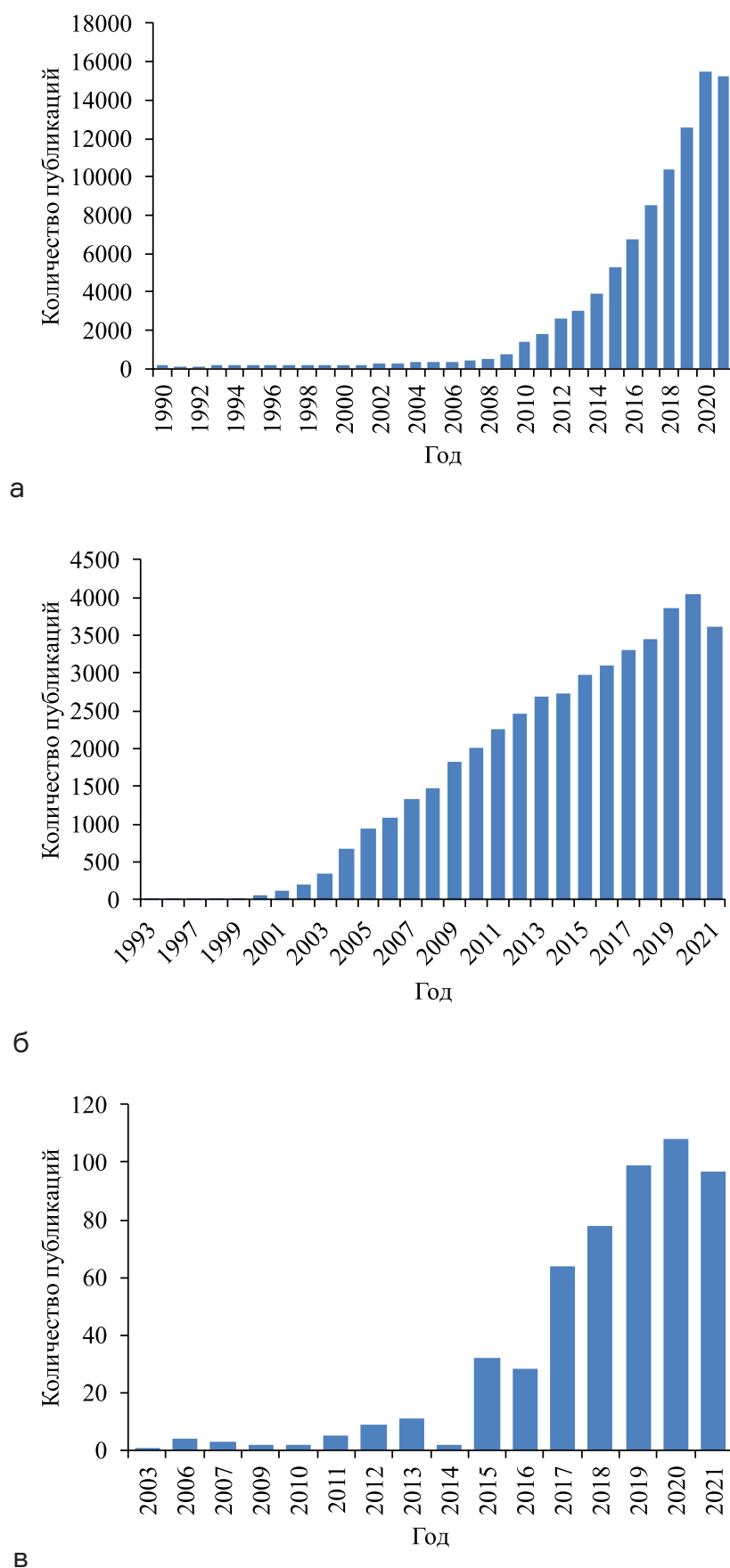


Рис. 8. Количество публикаций:
а — theranostics; б — microfluidic; в — microfluidic & theranostics

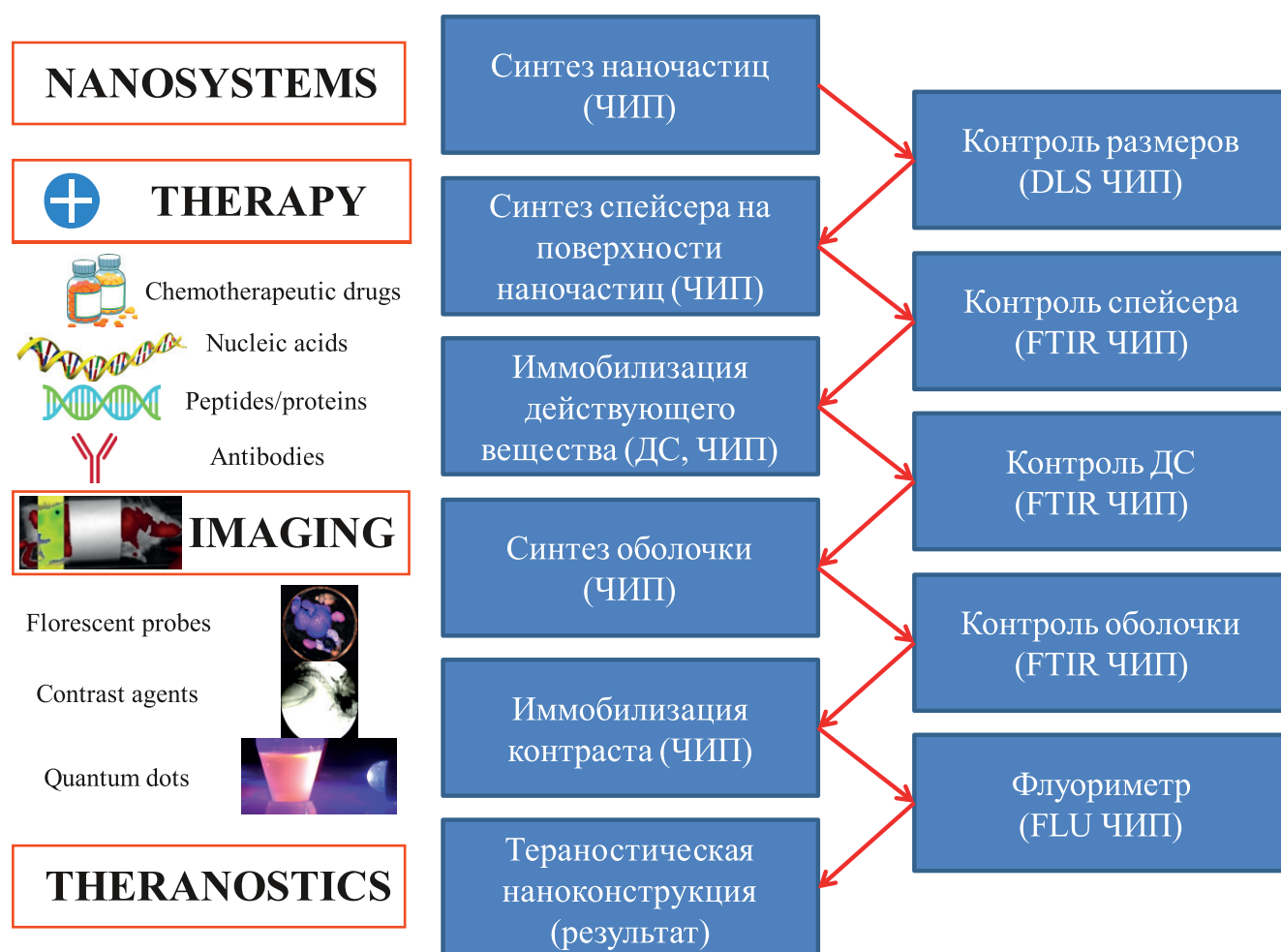


Рис. 9. Общая схема синтеза объектов для тераностики

СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМ

Интеграция микроустройств с различными конструкциями микросхем привела к увеличению функциональности анализа с использованием таких систем. Так, с помощью быстрых и чувствительных микрофлюидных систем можно обнаруживать различные биологические объекты, такие как белки, нуклеиновые кислоты, клетки, патогены и т. д. [47–49]. Однако интересные для исследователей объекты могут иметь не только биологическую природу, но также содержать специфические ионы, растворенные газы, лекарства и токсины [50]. Поэтому микрофлюидные биосенсоры находят применение в различных областях, например, для диагностики заболеваний [51], контроля безопасности пищевых продуктов [52] и мониторинга окружающей среды [53].

В настоящее время наиболее часто используется микрофлюидная платформа, известная как «лабо-

ратория-на-чипе» (ЛНЧ) или система полного микроанализа (micro-TAS) [54, 55].

Устройства на основе технологии ЛНЧ объединяют несколько лабораторных функций на одном кристалле размером от нескольких квадратных миллиметров до нескольких квадратных сантиметров. По сравнению с обычными системами эти платформы обладают множеством преимуществ, например высоким отношением поверхности к объему, точным контролем жидкости, низким расходом образцов и высокой степенью интеграции с функциональными компонентами [56]. Существуют микрофлюидные биосенсоры на кристалле, предназначенные для так называемой диагностики по месту лечения — «point-of-care» (POC) [57]. Микрофлюидика обеспечивает простое и быстрое проведение анализа небольших образцов. Более того, в микрофлюидные микросхемы могут быть встроены несколько датчиков и зон восприятия для повышения их полезности. Предполагается, что идеальный биосенсор

на кристалле будет недорогим, компактным, быстрым и чувствительным.

Недавно был изготовлен гибкий и легко тянущийся электрохимический датчик [58], интегрированный в МФЧ. Это позволяет моделировать физиологические и биомеханические параметры кровеносных сосудов *in vivo* и одновременно отслеживать механически индуцированные биохимические сигналы в режиме реального времени. Разработан микрофлюидный биосенсор для онлайн-чувствительного обнаружения сальмонелл на основе иммуно-магнитного разделения, флуоресцентной маркировки и обработки видео на смартфоне [59]. Магнитные наночастицы использовались для разделения и эффективного концентрирования целевых бактерий, в результате чего были сформированы магнитные бактерии, которые затем были помечены флуоресцентными микросферами. После этого флуоресцентные бактерии непрерывно вводились в МФЧ и подсвечивались флуоресцентной микроскопической системой, а флуоресцентные пятна подсчитывались в режиме онлайн с помощью приложения для смартфона на основе алгоритма межкадрового различия для определения количества бактерий.

Одной из разновидностей ЛНЧ является технология «орган-на-чипе» (ОНЧ), которая возникла из-за стремления заменить экспериментальные модели на животных [60].

Платформы ОНЧ — это новое поколение трехмерных моделей культур клеток, которые лучше имитируют динамические, физико-химические, биохимические и микроархитектурные свойства микросреды живых органов. Микрофизиологические системы на основе «орган-на-чипе» являются гибкими и могут быть сконструированы таким образом, чтобы имитировать требуемые типы органов и тканей для процесса открытия и разработки лекарств [61, 62]. Например, для исследований физических и физиологических аспектов альвеолярной ткани используется модель «легкое-на-чипе» [63].

Важным направлением в развитии тестовых микрофлюидных систем является диагностика вирусных заболеваний. Такие системы могут быть основаны как на технологии ОНЧ, так и на биосенсорах для РОС. Одним из таких сенсоров является платформа на базе смартфона для высокочувствительного и селективного обнаружения вируса птичьего гриппа на основе колориметрической детекции с использованием наноматериалов [64]. Трехмерные наноструктуры, которые служат каркасом для конъюгации антител для захвата вируса птичьего гриппа, изготовлены на структурах их ПДМС в форме елочки с использованием ша-

блона наностержней ZnO. После захвата вируса колориметрическая реакция на основе наночастиц золота на кристалле позволяет обнаруживать вирус невооруженным глазом. В качестве примера тестовой системы на основе ОНЧ может служить работа по изучению взаимодействий вирус-хозяин и реакций человека на моделях «легкие-на-чипе» и «кишечник-на-чипе» [65].

На сегодняшний день остро стоит проблема детектирования вируса SARS-CoV-2. Основными методами диагностики сейчас являются геномные (включающие в себя методы ПЦР, ОТ-ПЦР в реальном времени, секвенирование) и серологические/иммунологические тесты (сфокусированные на обнаружении антител или антигенов в биологических образцах, взятых у пациентов). При высокой степени достоверности данных методов у них есть ряд значительных недостатков, выражающихся в высокой себестоимости, продолжительности анализа и зависимости точности результатов от способов забора материала, соблюдения условий хранения, транспортировки и подготовки образцов. Все это осложняет проведение массового скрининга, особенно в отдаленных регионах с недостаточно развитой инфраструктурой [66–69]. Часть этих проблем можно решить с помощью технологии иммобилизации вирусных антигенов или белков его мишеней на поверхности наночастиц с последующим их использованием для определения маркеров вирусной инфекции (как нуклеиновых кислот и вирусных белков, так и антител против них). В последние годы новые методы нанодиагностики для раннего чувствительного обнаружения вирусных инфекций рассматриваются в качестве наиболее доступных и эффективных в условиях эпидемии. Они не требуют большого объема исследуемого образца, специальной пробоподготовки и могут использоваться даже в домашних условиях, что снижает риск перекрестного инфицирования окружающих [70]. С целью усиления сигнала при детекции патогенов поверхности наночастиц легко модифицируются поливалентными лигандами или другими биомолекулами [71]. Функционализация поверхности придает наночастицам способность взаимодействовать со специфическими биомаркерами инфекции, такими как вирусная РНК, вирусные белки и вирусспецифические антитела [72, 73]. Уникальные физико-химические характеристики наночастиц (оптические, реакционные и/или флуоресцентные свойства) позволяют им преобразовывать факт взаимодействия с биомаркерами в измеряемые сигналы детекции [74, 75]. Все это позволяет сформулировать новую схему детектирования вирусов и, в частности, COVID-19 (рис. 10).

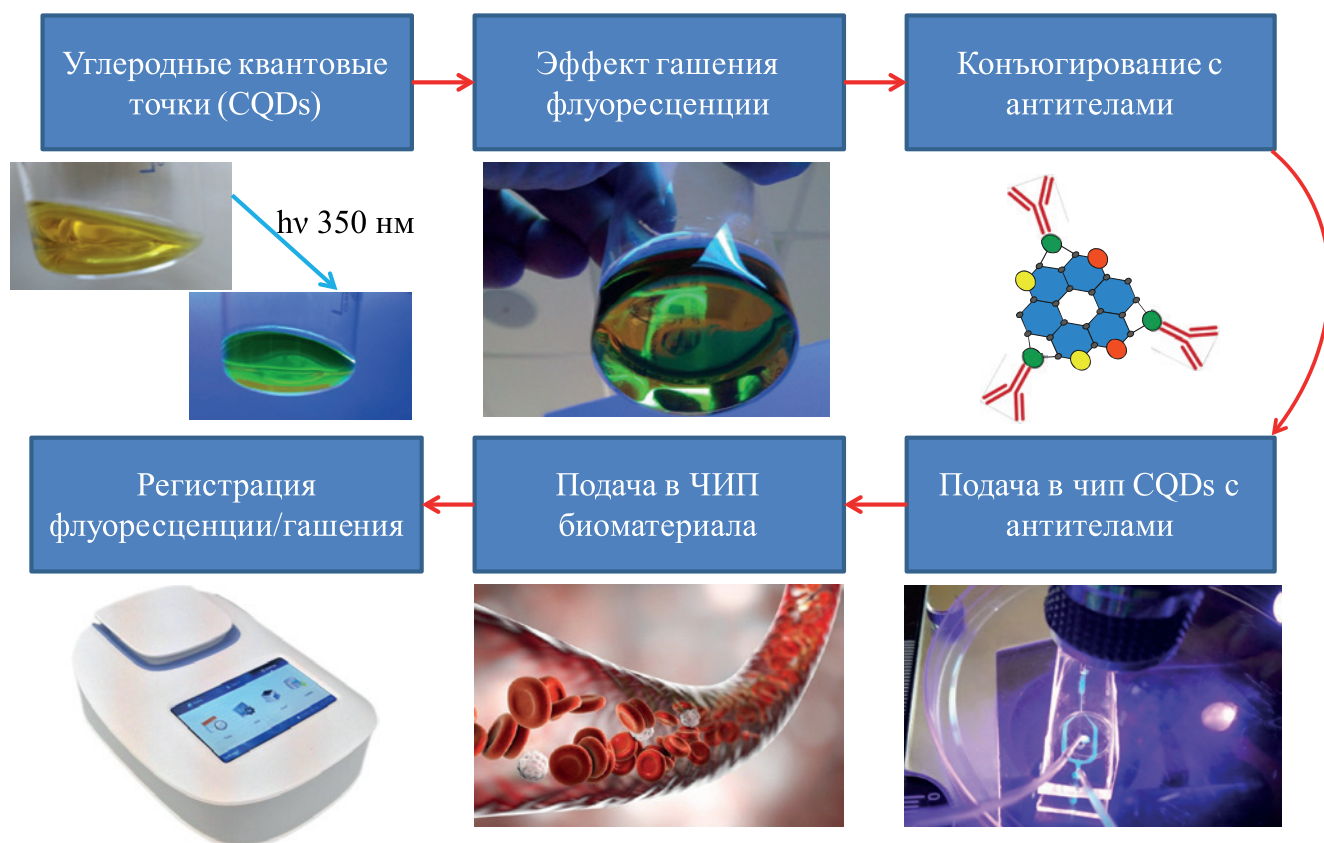


Рис. 10. Общая схема сенсора на основе гашения флуоресценции углеродных квантовых точек

Основным компонентом системы является флуоресцентный агент (ФА), которому свойственно гашение флуоресценции при снижении интенсивности индуцирующего излучения либо смещении его длины волны. В качестве ФА могут выступать коллоидные квантовые точки (КТ), которые по своей физической природе являются наночастицами. КТ конъюгируются с антителами к вирусу либо с белком, который является тропным к какой-либо части вируса. Такой конъюгат может быть запущен в канал микрофлюидного чипа, где смешивается с кровью и поступает на детектирование в другой чип. Схема может быть портативной и адаптированной для различных вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на относительно недавнее начало применения микрофлюидного синтеза, он показал хорошую способность к воспроизведению микро- и наночастиц в контролируемой среде.

Успешный синтез и применение микро- и наночастиц на основе микрофлюидики обладают следующими особенностями:

1. Быстрое и достаточное перемешивание в микрофлюидных каналах приводит к монодисперсным частицам с относительно высоким выходом.
2. Контроль за условиями синтеза позволяет точно регулировать физико-химические свойства и минимизировать их отклонение от партии к партии.
3. Систематическая интеграция нескольких процедур в единое микрофлюидное устройство позволяет производить микро- и наночастицы с желаемой сложной структурой за один этап.
4. Технология микрореакторов обеспечивает улучшенное управление процессом на основе четко определенных микроструктур активной элементарной ячейки, которые могут быть воспроизведены для получения более высоких объемов химического производства.

Все эти преимущества позволяют сделать вывод о перспективе масштабного использования микрофлюидики для биомедицинских целей. В настоящее время уже близко к практической реализации применение микрофлюидных устройств в таких областях, как синтез лекарств [76], проведение ПЦР-анализа [77], для исследования клеток [78], синтеза радиофармацевтических препаратов [79] и многих других.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. El-Housiny S, Eldeen M A S, El-Attar YA, et al. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles topical gel for treatment of pityriasis versicolor: formulation and clinical study. *Drug Deliv.* 2018;25(1):78-90.
2. Millstone JE, Kavulak DFJ, Woo CH, et al. Synthesis, properties, and electronic applications of size-controlled poly(3-hexylthiophene) nanoparticles. *Langmuir.* 2010;26:13056–13061.
3. Arroyo GV, Madrid AT, Gavilanes AF, et al. Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics. *Journal of environmental science and health, part A.* 2020;55(11):1304-1320.
4. Gao Y, Wu Y, Lu H, et al. CsPbBr₃ perovskite nanoparticles as additive for environmentally stable perovskite solar cells with 20.46% efficiency. *Nano Energy.* 2019;63:103838.
5. Lin CH, Lee GB, Lin YH, et al. A Fast Prototyping Process for Fabrication of Microfluidic Systems on Soda-Lime Glass. *J. Micromech. Microeng.* 2001;11:726–732.
6. Torabinia M, Asgari P, Dakarapu U, et al. On-chip organic synthesis enabled by engine-and-cargo in an electrowetting-on-dielectric digital microfluidic device. *Lab Chip.* 2019;19:3054-3064.
7. Herranz-Blanco B, Ginestar E, Zhang H, et al. Microfluidics platform for glass capillaries and its application in droplet and nanoparticle fabrication. *Int J Pharm.* 2017;516(1–2):100-105.
8. Talebi S, Abedini A, Lele P, et al. Microfluidics-based measurement of solubility and diffusion coefficient of propane in bitumen. *Fuel.* 2017;210:23–31.
9. Mukherjee P, Nebuloni F, Gao H, et al. Rapid prototyping of soft lithography masters for microfluidic devices using dry film photoresist in a non-cleanroom setting. *Micromachines.* 2019;10(3):192.
10. Ivanov SV, Trachevskii VV, Stolyarova NV, et al. Plasmachemical modification of polymer surfaces. *Rus J Appl Chem.* 2006;79:445–447.
11. Kim DNH, Kim KT, Kim C, et al. Soft lithography fabrication of index-matched microfluidic devices for reducing artifacts in fluorescence and quantitative phase imaging. *Microfluid Nanofluid.* 2018;22:2.
12. Costa PF, Albers HJ, Linssen JEA, et al. Mimicking arterial thrombosis in a 3D-printed microfluidic in vitro vascular model based on computed tomography angiography data. *Lab on a Chip.* 2017;17(16):2785–2792.
13. Prabhakar A, Agrawal M, Mishra N, et al. Cost-effective smart microfluidic device with immobilized silver nanoparticles and embedded UV-light sources for synergistic water disinfection effects. *RSC Advances.* 2020;10(30):17479–17485.
14. Lopez C, Oza G, Casanova JR, et al. Proposal to Develop a Microfluidic Platform with GMR Sensors and the Use of Magnetic Nanoparticles in Order to Detect Cancerous Cells: Preliminary experimentation. *Global Medical Engineering Physics Exchanges/ Pan American Health Care Exchanges (GMEPE/PAHCE).* 26-31 March 2019: 18691807.
15. Hao N, Nie Y, Zhang JXJ. Microfluidic synthesis of functional inorganic micro-/nanoparticles and applications in biomedical engineering. *International Materials Reviews.* 2018;63(8):461-487.
16. Lin WZS, Malmstadt N. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. *Eur Biophys J.* 2019;48(6):549-558.
17. Wang Y, Seidel M. Strategy for fast manufacturing of 3D hydrodynamic focusing multilayer microfluidic chips and its application for flow-based synthesis of gold nanoparticles. *Microfluid Nanofluid.* 2021;25:64.
18. Sounart TL, Safier PA, Voigt JA, et al. Spatially-resolved analysis of nanoparticle nucleation and growth in a microfluidic reactor. *Lab Chip.* 2007;7:908–915.
19. Tofighi G, Lichtenberg H, Pesek J, et al. Continuous microfluidic synthesis of colloidal ultrasmall gold nanoparticles: in situ study of the early reaction stages and application for catalysis. *React. Chem. Eng.* 2017;2:876–884.
20. Hao N, Xua Z, Nie Y, et al. Microfluidics-enabled rational design of ZnO micro-/nanoparticles with enhanced photocatalysis, cytotoxicity, and piezoelectric properties. *Chem Eng J.* 2019;378:122222.
21. Zhang Y, Tong X, Yang L, et al. A herringbone mixer based microfluidic device HBEXO-chip for purifying tumor-derived exosomes and establishing miRNA signature in pancreatic cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2021;332:129511.
22. Christopher GF, Anna SL. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *J Phys D: Appl Phys.* 2007;40:R319.
23. Schimel TM, Nguyen MA, Sarles SA, et al. Pressure-driven generation of complex microfluidic droplet networks. *Microfluidics and Nanofluidics.* 2021;25:78.
24. Xie T, Wang P, Wu L, et al. A hand-powered microfluidic system for portable and low-waste sample discretization. *Lab on a Chip.* 2021;21:3429-3437.
25. Davis JJ, Padalino M, Kaplitz AS, et al. Utility of low-cost, miniaturized peristaltic and Venturi pumps in droplet microfluidics. *Analytica Chimica Acta.* 2021;1151:338230.

26. Khizar S, Halima HB, Ahmad NM, et al. Magnetic nanoparticles in microfluidic and sensing: From transport to detection. *Electrophoresis*. 2020;41(13-14):1206-1224.
27. Abedini-Nassab R, Miandoab MP, Şaşmaz M. Microfluidic Synthesis, Control, and Sensing of Magnetic Nanoparticles: A Review. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(7):768.
28. Bemetz J, Wegemann A, Saatchi K, et al. Microfluidic-Based Synthesis of Magnetic Nanoparticles Coupled with Miniaturized NMR for Online Relaxation Studies. *Anal Chem*. 2018;90(16):9975-9982.
29. Hermann CA, Mayer M, Griesche C, et al. Microfluidic-enabled magnetic labelling of nanovesicles for bioanalytical applications. *Analyst*. 2021;146(3):997-1003.
30. Rao L, Cai B, Bu LL, et al. Microfluidic Electroporation-Facilitated Synthesis of Erythrocyte Membrane-Coated Magnetic Nanoparticles for Enhanced Imaging-Guided Cancer Therapy. *ACS Nano*. 2017;11(4): 3496-3505.
31. Ma J, Yi C, Li CW. Facile synthesis and functionalization of color-tunable Ln^{3+} -doped KGdF_4 nanoparticles on a microfluidic platform. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;108:110381.
32. Melerzanov A, Moskalev A, Zharov V. Precision medicine and molecular theranostics. Doctor. 2016;2:11-14. In Russian [Мелерзанов А, Москалев А, Жаров В. Прецизионная медицина и молекулярная терагностика. Врач. 2016;2:11-14].
33. Stratified, personalised or P4 medicine: a new direction for placing the patient at the centre of healthcare and health education (Technical report). Academy of Medical Sciences, 2015. p. 37.
34. Papavassiliou AG. Transcription-factor-modulating agents: precision and selectivity in drug design. *Mol Med Today*. 1998;4(8):358-66.
35. Kalash RS, Lakshmanan VK, Cho CS, et al. Theranostics. In: Mitsuhiro Ebara. *Biomaterials Nanoarchitectonics*. Elsevier Inc., 2016:197-215.
36. Mosayebi J, Kiyasatfar M, Laurent S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Adv. Healthcare Mater*. 2017;6:1700306.
37. Khositanon C, Adpakpang K, Bureekaew S, et al. Continuous-flow purification of silver nanoparticles and its integration with flow synthesis. *J Flow Chem*. 2020;10:353-362.
38. Chastek TQ, Iida K, Amis EJ, et al. A microfluidic platform for integrated synthesis and dynamic light scattering measurement of block copolymer micelles. *Lab on a Chip*. 2008;8(6):950-957.
39. Perro A, Lebourdon G, Henry S, et al. Combining microfluidics and FT-IR spectroscopy: towards spatially resolved information on chemical processes. *React. Chem. Eng*. 2016;1:577-594.
40. Măriuța D, Colin S, Barrot-Lattes C, et al. Miniaturization of fluorescence sensing in optofluidic devices. *Microfluid Nanofluid*. 2020;24:65.
41. Ryu G, Huang J, Hofmann O, et al. Highly sensitive fluorescence detection system for microfluidic lab-on-a-chip. *Lab on a Chip*. 2011;11(9):1664.
42. Bates KE, Lu H. Optics-Integrated Microfluidic Platforms for Biomolecular Analyses. *Biophysical Journal*. 2016;110(8):1684-1697.
43. Li Z, Ju R, Sekine S, et al. All-in-one microfluidic device for on-site diagnosis of pathogens based on integrated continuous flow PCR and electrophoresis biochip. *Lab Chip*. 2019;19:2663-2668.
44. Bomers M, Charlot B, Barho F, et al. Microfluidic surface-enhanced infrared spectroscopy with semiconductor plasmonics for the fingerprint region. *React Chem Eng*. 2020;5:124.
45. Vaccari L, Birarda G, Businaro L, et al. Infrared Microspectroscopy of Live Cells in Microfluidic Devices (MD-IRMS): Toward a Powerful Label-Free Cell-Based Assay. *Analytical Chemistry*. 2012;84(11):4768-4775.
46. Xiao L, Zhang P, Li W, et al. Multi-angle Fiber DLS system Based on Microfluidics Technology. International Applied Computational Electromagnetics Society Symposium. China (ACES). 2019:19565492.
47. McArdle H, Jimenez-Mateos EM, Raoof R, et al. "TORNADO" – Theranostic One-Step RNA Detector; microfluidic disc for the direct detection of microRNA-134 in plasma and cerebrospinal fluid. *Sci Rep*. 2017;7:1750.
48. Kaur G, Tomar M, Gupta V. Development of a microfluidic electrochemical biosensor: Prospect for point-of-care cholesterol monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;261:460-466.
49. Shin SR, Kilic T, Zhang YS, et al. Label-Free and Regenerative Electrochemical Microfluidic Biosensors for Continual Monitoring of Cell Secretomes. *Advanced Science*. 2017;4(5):1600522.
50. Kirsch J, Siltanen C, Zhou Q, et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine *Chem Soc Rev*. 2013;42:8733-8768.
51. Ghrera AS, Pandey CM, Malhotra BD. Multiwalled carbon nanotube modified microfluidic-based biosensor chip for nucleic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;266:329-336.
52. Jiang H, Jiang D, Zhu P, et al. A novel mast cell co-culture microfluidic chip for the electrochemical evaluation of food allergen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 83: 126-133.
53. Campaña A, Florez S, Noguera M, et al. Enzyme-Based Electrochemical Biosensors for Microfluidic Platforms to Detect Pharmaceutical Residues in Wastewater. *Biosensors*. 2019;9(1):41.

54. Arora A, Simone G, Salieb-Beugelaar GB, et al. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Analytical Chemistry*. 2010;82(12):4830–4847.
55. Fernández-la-Villa A, Pozo-Ayuso DF, Castaño-Álvarez M. Microfluidics and electrochemistry: An emerging tandem for next-generation analytical microsystems. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2019;15:175–185.
56. Haeberle S, Zengerle R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*. 2007;7:1094–1110.
57. Rackus DG, Shamsi MH, Wheeler AR. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(15):5320–5340.
58. Jin Z, Liu Y, Fan W, et al. Integrating Flexible Electrochemical Sensor into Microfluidic Chip for Simulating and Monitoring Vascular Mechanotransduction. *Small*. 2019;19:03204.
59. Wang S, Zheng L, Cai G, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using fluorescence labeling and smartphone video processing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;111:333.
60. Ahadian S, Civitarese R, Bannerman D, et al. Organ-On-A-Chip Platforms: A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies. *Adv Healthc Mater*. 2018;7:1700506.
61. Asif A, Kim KH, Jabbar F, et al. Real-time sensors for live monitoring of disease and drug analysis in microfluidic model of proximal tubule. *Microfluid Nanofluid*. 2020;24:43.
62. Khetani S, Yong KW, Kollath, VO, et al. Engineering Shelf-Stable Coating for Microfluidic Organ-on-a-Chip using Bioinspired Catecholamine Polymers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(6):6910–6923.
63. Arefi SMA, Tony Yang CWT, Sin DD, et al. Simulation of nanoparticle transport and adsorption in a microfluidic lung-on-a-chip device. *Biomechanics*. 2020;14(4):044117.
64. Xia Y, Chen Y, Tang Y et al. A Smartphone-based Point-of-care Microfluidic Platform Fabricated with ZnO Nanorod Template for Colorimetric Virus Detection. *ACS Sensors*. 2019 ;4(12):3298–3307.
65. Wang Y, Wang P, Qin J. Microfluidic Organs-on-a-Chip for Modeling Human Infectious Diseases. *Acc. Chem. Res*. 2021;54(18):3550–3562.
66. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, et al. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(8):615–626.
67. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opin Med Diagn*. 2008;2(10):1155–1171.
68. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance. *Nat Biotechnol*. 2020;38(10):1174–1183.
69. Peeling RW, Wedderburn CJ, Garcia PJ, et al. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *Lancet*. 2020;20(9):E245–E249.
70. Derakhshan MA, Amani A, Faridi-Majidi R. State-of-the-Art of Nanodiagnostics and Nanotherapeutics against SARS-CoV-2. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(13):14816–14843.
71. Bellan LM, Wu D, Langer RS. Current trends in nanobiosensor technology. *Wiley Interdiscip. Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(3):229–246.
72. Talebian S, Wallace GG, Schroeder A, et al. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. *Nat Nanotechnol*. 2020;15(8):618–621.
73. Saxena A, Khare D, Agrawal S et al. Recent advances in materials science: a reinforced approach toward challenges against COVID-19. *Emergent Mater*. 2021;4(1):57–73.
74. Chintagunta AD, M SK, Nalluru S, et al. Nanotechnology: An emerging approach to combat COVID-19. *Emergent Mater*. 2021;4:119–130.
75. Hassanzadeh P. Nanotheranostics against COVID-19: From multivalent to immune-targeted materials. *J Control Release*. 2020;328:112–126.
76. Akhmedova DA, Shatalov DO, Ivanov IS, et al. The use of microfluidic hardware in the synthesis of oligohexamethylene guanidine derivatives. *Fine Chemical Technologies*. 2021;16(4):307–317.
77. Woolley AT, Hadley B, Landre P, et al. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem*. 1996;68(23):4081–4086.
78. Kukhtevich IV, Evstrapov AA, Bukatin AS. Microfluidic devices for cell research (review). *Scientific instrumentation*. 2013;4:66–75. In Russian [Кухтевич И.В., Евстратов А.А., Букатин А.С. Микрофлюидные устройства для исследований клеток (обзор). *Научное приборостроение*. 2013;4:66–75].
79. Zhanavskina ML, Mironova AA, Popov AM, et al. Application of microfluidic technology for the synthesis of ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals. *Medical physics*. 2013;4:44–51. In Russian [Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М. и др. Применение микрофлюидной технологии для синтеза радиофармпрепаратов, меченных ¹⁸F. *Медицинская физика*. 2013;4:44–51].

Информация об авторах:

Лазарева Елизавета Олеговна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Евстрапов Анатолий Александрович, д.т.н., исполняющий обязанности директора ИАП РАН;

Гареев Камиль Газинурович, к.т.н., доцент кафедры микро- и наноэлектроники СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Чебуркин Юрий Владимирович, к.м.н., заведующий НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур Центра доклинических и трансляционных исследований ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Крижанович Александр, магистрант СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Королев Дмитрий Владимирович, д.х.н., доцент, заведующий НИЛ нанотехнологий Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

SYNTHESIS OF MICRO- AND NANOPARTICLES IN MICROFLUID REACTORS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Lazareva E. O.^{1, 2}, Evstrapov A. A.³, Gareev K. G.², Cheburkin Yu. V.¹, Krizhanovich A.², Korolev D. V.¹

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³Institute for Analytical Instrumentation Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Lazareva Elizaveta O.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: lizzifox@yandex.ru

Received 10 October 2021; accepted 09
November 2021.

ABSTRACT

Currently, microfluidic devices are striving for implementation in many areas of biomedicine: drug synthesis, theranostics, biosensors. Such devices provide fast and sufficient mixing in microfluidic channels, make it possible to obtain monodisperse particles, including nanoscale ones, to control the synthesis conditions and to precisely regulate the physicochemical properties of the resulting substances. Sensors based on microfluidics allow detecting various pathological processes. The presented review gives an idea of the principles of constructing micro-flow devices, chip materials, and reagent dosing systems. Examples of the use of microfluidics in various fields are given.

Key words: biosensors, microfluidics, theranostics.

For citation: Lazareva EO, Evstrapov AA, Gareev KG, et al. Synthesis of micro- and nanoparticles in microfluid reactors for biomedical applications. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):207-236.

INTRODUCTION

Microfluidic reactors are devices designed for the synthesis of substances and particles using small fluid flows in channels of micro- and nanometer size. Although microfluidic reactors were first developed in the early 90s of the last century, new design solutions in reactor topologies have found applications in medicine, pharmaceuticals and chemical industries for diagnostics, crystallization, chemical and combinatorial synthesis, as well as rapid analysis methods.

The development of miniature reactors has many potential advantages over more traditional methods of synthesizing chemicals and particulates. Due to good reaction control, low reagent consumption, high sensitivity and safer working environment, microfluidic devices have proven themselves well for larger production of chemical compounds with clearly defined and predetermined properties. This improves the quality of chemical substances for pharmaceutical industries as well.

APPLICATIONS OF MICROFLUIDIC SYNTHESIS

Microfluidic technologies play an extremely important role not only in chemical synthesis, but also in the synthesis of nanoparticles. Nanoparticles obtained using microfluidic synthesis have found application in such areas as medicine [1], electronics [2], cosmetology [3], solar energy [4] and others. In general terms, the application areas of microfluidic synthesis can be illustrated by Figure 1.

Due to the fact that the physical and chemical properties of nanoobjects depend on the size, shape and crystal structure, in order to obtain materials with the necessary characteristics and properties, their synthesis requires precision control of kinetic and thermodynamic parameters. Thus, the role of microreactors in the synthesis of nanomaterials is reduced to two main tasks: synthesis with controlled size, shape and structure and regulation due to continuous flow processes.

MATERIALS FOR MAKING MICROFLUIDIC CHIPS

The choice of microfluidic chip material (MFC) depends on the purpose of its use and the reagents used in the research.

Silicon, quartz, and glass are traditional materials for large-scale production of microfluidic devices. MFCs from these materials are made by photolithography [5]. Glass and silicon are used because of their thermal stability and compatibility with chemical solvents in crystal reactions [6], droplet formation [7] and extraction [8].

For rapid prototyping and research in the laboratory, polymeric materials are usually used, which were chosen because of the lower price and simpler MFC manufacturing technology. One of the most commonly used materials is Sylgard 184 polydimethylsiloxane (PDMS). This is due to a number of reasons. The liquid PDMS Prepolymer is thermally cured at moderate temperatures (40-70 °C) and can be cast with nanometer resolution using soft lithography from master molds made from silicon, glass or photoresist SU-8 [9], its low surface tension makes it much easier to peel off the templates after curing. The PDMS chip can be reversibly and conformally sealed with another part made of PDMS, glass or other substrate material by a simple connection. However, when using PDMS, more attention should be paid to the chemical compatibility of polymers with the reagents used. In addition, many polymers are not designed for use at high temperatures.

PRODUCTION OF PDMS-BASED MICROFLUIDIC CHIPS

PDMS-based MFCs are made using soft lithography methods. The sequence in the manufacture of such chips is shown in Figure 2. To do this, the PDMS base is first mixed with a hardener in a mass ratio of 10:1 and poured into a master mold, usually made of silicon by photolithography, with a macroscale pattern. A vacuum desiccator with a pump is used to remove air bubbles. Degassed PDMS is placed in a hardening oven for 4 hours at 60° C. The cured PDMS replica is removed from the mold using a sharp blade. The sealing of a PDMS replica with a glass plate can occur in various ways, for example, by plasma treatment and exposure to high-frequency currents [10]. After that, the ready-made MFC is ready for operation. The above manufacturing protocol is constantly being reviewed and improved [11]. In this form, it has been used in microfluidic studies in recent decades [12—14].

MICROFLUIDIC DEVICE DESIGN AND TOPOLOGY

The choice of the type of microfluidic device used for the synthesis of nanomaterials should be approached taking into account all possible factors. The simplicity of the design leads to easy scalability of the process, but reduces the quality of the nanomaterials produced.

Microreactors with more complex designs allow better control over the properties of nanoparticles, but scaling up the process can be a challenge. In this case, it is preferable to use MFCs with topologies that assume continuous operation, especially for nanomaterials that are less sensitive to changes in reaction conditions.

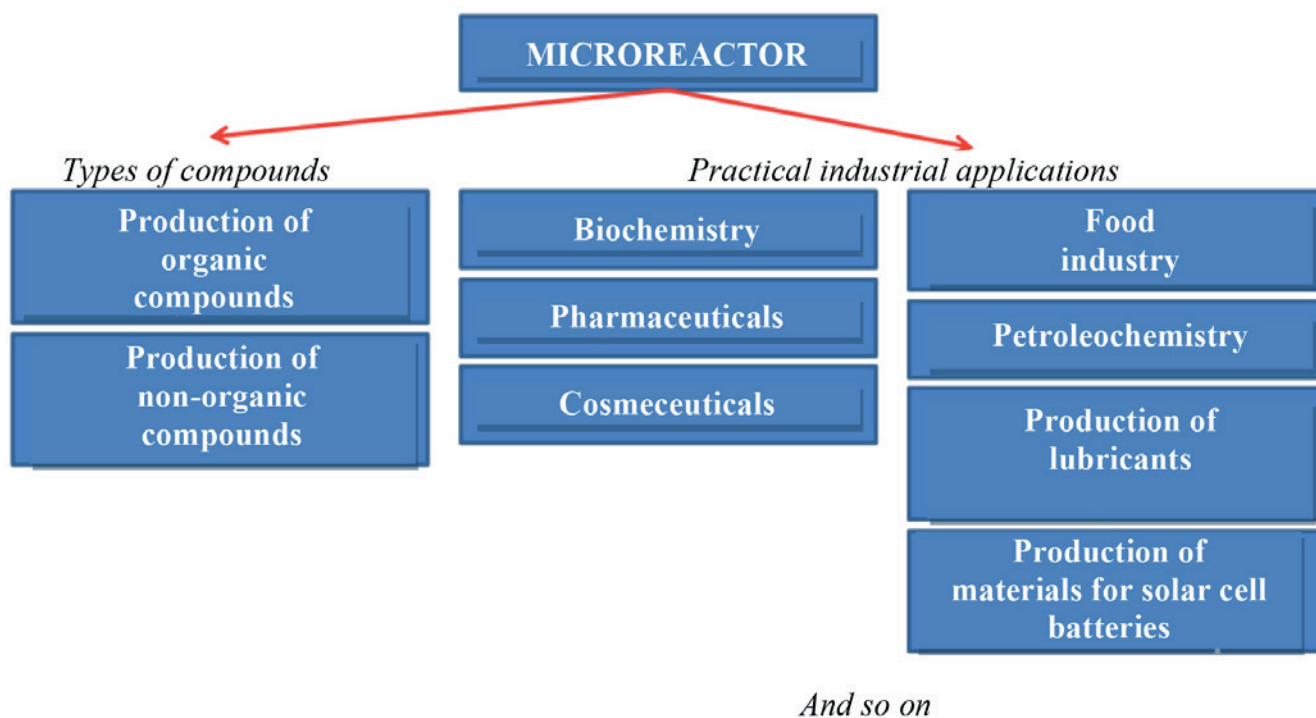


Figure 1. General application schematic for microfluidic synthesis

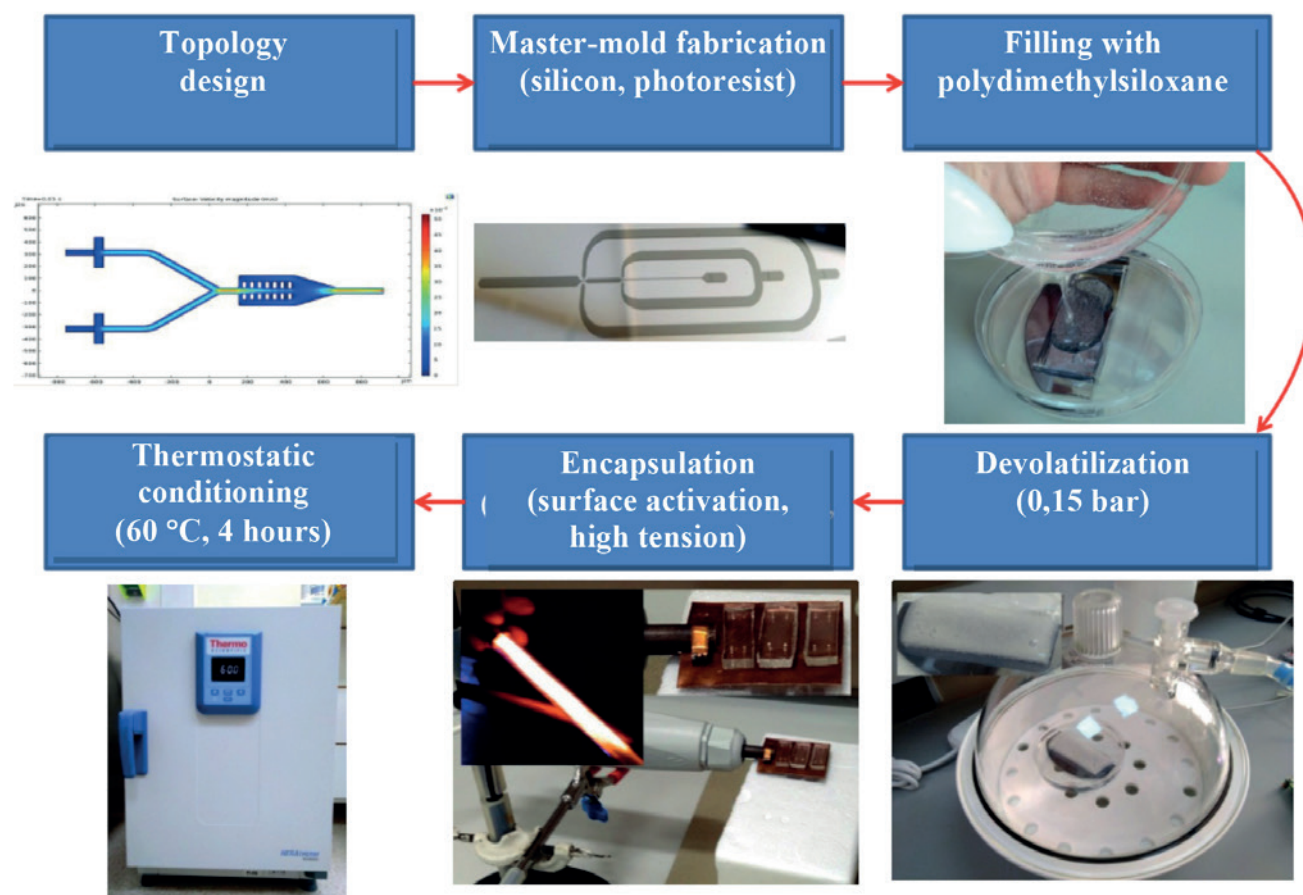


Figure 2. PDMS-based MFC manufacturing schematic

Microfluidic reactors for chemical synthesis can be divided into three main categories: continuous laminar flow reactors, segmented flow reactors and droplet-based reactors [15].

Continuous laminar flow microreactors include only single-phase fluid flows. Several liquid reagents of different composition and concentration are fed to the MFC through the inlets. In these laminar flow-dominated microreactors, mixing is a key process for optimizing production.

The mixing methods can be divided into two large groups. MFCs with flow focusing topologies can be attributed to the first group. Hydrodynamic focusing is one of the most important methods in microfluidic synthesis of materials [16, 17]. Hydrodynamic focusing always occurs in MFCs with topologies involving a triple-input channel consisting of one central inlet channel and two lateral inlet channels positioned vertically or at an angle (less than 90 °) to the central one. In addition, the flow rate of the central channel is smaller than the lateral ones, so that the average flow can be focused and mixed with the lateral flows quickly and sufficiently. The mixing time mainly depends on the flow ratio of the lateral and central inlet channels.

The second group of mixing methods concerns MFCs with topologies for conventionally more efficient mixing. The simplest topologies most often represent two inlet channels of a Y-shaped microfluidic reactor, creating a supersaturated region at the boundary of diffusion mixing between two mutually diffusing flows of reagents.

The use of microstructures, such as straight microchannels [18], curved microchannels [19], spiral microchannels [20] and spinal mixers [21], can further in-

crease the mixing efficiency by introducing disturbances and prolonging the mixing time of flows during the synthesis of nanoparticles.

Segmented flow microreactors typically include several liquid phase flows for reagents and one gas phase flow for creating gas bubbles in order to isolate different segments of reagents. Gas bubbles are formed due to differences in surface tension between the gas and liquid phases. In a typical design, two or more reagents in liquid phases are introduced into the microreactor through the inlets. Additional inlets and sections can be added to the design depending on the requirements for the reaction. Segmented flow microfluidic reactors may become contaminated due to physical contact between the reagents and the walls of the channel. Sometimes this problem can be solved by analyzing the hydrophobicity of the channel walls.

One of the biggest advantages of droplet-based microreactors is the separation into parts, which helps achieving rapid mixing, good time and reagents control, as well as contamination-free microenvironment. Such microreactors usually include several flows of dispersion liquid phase of reagents and a flow of immiscible dispersion medium to form droplets. The simplest geometric designs for droplet formation are T-shaped and Y-shaped injectors [22]. The droplet size depends on the channel width and flow rate.

One of the types of droplet-based reactors is an MFC with a flow-focusing topology, designed for the manufacture of suspensions. The principle of operation of such reactors is based on the “blowing off” of droplets in a continuous stream. The application of this topology is shown in Figure 3. At different flow rates, different droplet sizes are obtained from 30 microns (Figure 3, a)

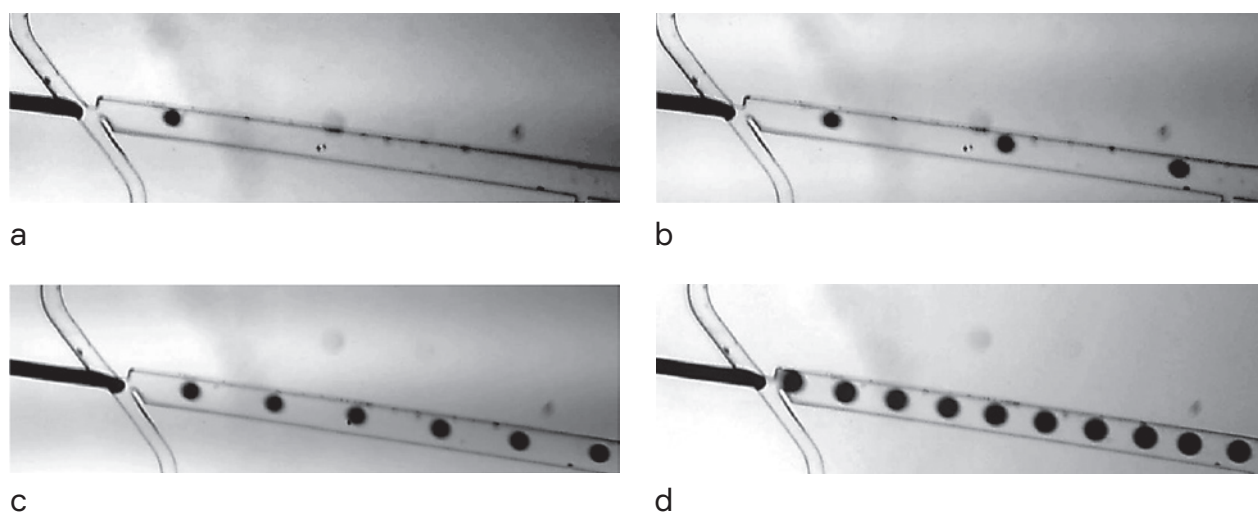


Figure 3. Examples of obtaining magnetic fluid suspension at different feed pressure of mineral oil ($P_1 = 6.0$ kPa) and magnetic fluid (P_2):
 a — $P_2 = 6.2$ kPa; b — $P_2 = 6.8$ kPa; c — $P_2 = 7.5$ kPa; d — $P_2 = 8.5$ kPa

to 60 microns (Figure 3, d), which makes it possible to regulate not only the suspension formation rate, but also the dispersion.

REAGENT SUPPLY SYSTEMS

Fluids can be supplied to the microfluidic device by a syringe pump (Figure 4, a) or under the action of the applied pressure (Figure 4, b) [23]. The advantage of syringe pumps is a fixed volumetric flow rate, but they also have a long response time and periodic pulsations. The low response time makes syringe pumps unsuitable for advanced droplet pattern formation, since the flow rate and the resulting droplet formation rate cannot be changed quickly. Pressure monitoring systems are able to individually control the flow of multiple fluids simultaneously. They have a response time of up to 40 ms.

The flow in such systems is pulse-free, however, there is a possibility of reverse fluid movement.

In addition to these traditional fluid supply systems, manual syringes [24] and laboratory analogues [25] are sometimes used.

For synthesis under laboratory conditions, a small system can be used (Figure 5), consisting of a light microscope, a microfluidic pressure controller with a compressor, capillaries and a personal computer with a program for controlling the reagent supply system. Such a system was developed at the Almazov National Medical Research Centre in collaboration with the Institute for Analytical Instrumentation.

MICROFLUIDIC SYNTHESIS OF MAGNETIC NANOPARTICLES

Over the past decade, experiments using microfluidic reactors have demonstrated that it is possible to control with high accuracy the physical properties of

various nanomaterials, such as quantum dots, nanoparticles, nanotubes, nanowires and nanocomposites by controlling the growth parameters of nanocrystals and the kinetics of processes. In addition to microfluidic approaches based on laminar flow, experiments using microfluidic droplet methods for the synthesis of nanoparticles have also been successful. At the same time, the development of microfluidic devices for the synthesis of magnetic nanomaterials is still at the initial stage of development. Nevertheless, information available from the literature indicates that there is potential for obtaining better control over size, size distribution, crystal structure and shape of magnetic nanoparticles (MNP) both in small-scale and large-scale processes [26, 27].

The compact process control system is an effective tool that accelerates the optimization of synthesis parameters and the determination of the characteristics of the MNP for nanomedical, theranostic and biosensor applications based on nuclear magnetic resonance (NMR). An automated system has been developed and tested [28] combining a miniature NMR relaxometer and a flow-through microreactor for the synthesis and determination of the characteristics of iron oxide-based MNPs. The properties of NMR relaxation were quantified in a permanent magnet field with an induction of 0.5 T to measure the transverse (T2) and longitudinal (T1) relaxation time. Nanoparticles with a crystallite size of about 25 nm were obtained by codeposition in a microfluidic reactor with three-dimensional hydrodynamic flow focusing to avoid clogging of the channels.

A microfluidic method for the synthesis of magnetic fluorescent liposomes has been proposed [29]. The MNP were functionalized by an amino group in a microfluidic reactor and then covalently bound to carboxyl groups immobilized inside the liposomes. Such liposomes had good biological binding and accumulation under the influence of a magnetic field.

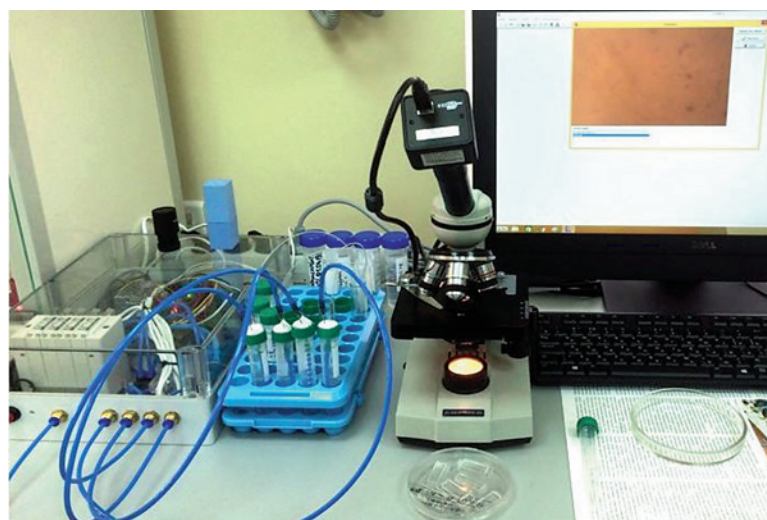


a

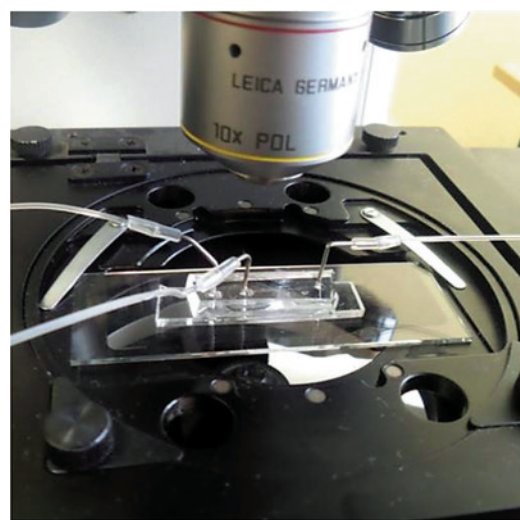


b

Figure 4. Examples of reagent supply systems:
a — Harvard Apparatus Pump 11 Elite syringe pump;
b — Elveflow OB1 MK3+ microfluid flow controller



a



b

Figure 5. Example of a microfluidic synthesis system: a — general view; b — chip microscopy

It was demonstrated in [30] that microfluidic electroporation can effectively promote the synthesis of MNPs coated with a biomimetic cell membrane. Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and vesicles obtained from erythrocyte membranes (RBC vesicles) were introduced into a microfluidic device. When a mixture of magnetic nanoparticles and RBC vesicles flowed through the electroporation zone, electrical impulses contributed to the penetration of the MNPs into the RBC vesicles. After that, the resulting RBC-coated MNPs were collected from the chip and injected into experimental animals for testing *in vivo*. Due to the good magnetic and photothermal properties of the MNPs nuclei and the prolonged circulation in the blood, characteristic of the membrane membranes of red blood cells, the obtained nano-objects were used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of tumors and photothermal therapy.

K_2GdF_4 nanoparticles functionalized with hyaluronic acid and doped with lanthanides were synthesized in two stages on a microfluidic platform [31]. Microfluidic synthesis of K_2GdF_4 nanoparticles doped with Ln^{3+} was carried out at room temperature in a continuous mode using a chip with four inputs. At the second stage, in a separate MFC with T-topology on the surface of K_2GdF_4 nanoparticles doped with Ln^{3+} , hyaluronic acid was continuously immobilized by electrostatic adsorption. The dispersed composition of the obtained nanoobjects was homogeneous; they showed high biocompatibility, targeted cellular absorption, photoluminescent and magnetic resonance properties.

The Almazov National Medical Research Centre in collaboration with the Institute for Analytical Instru-

mentation developed an MFC topology for the synthesis of MNPs. Initially, it was revealed that magnetite particles during a chemical reaction settle on the walls of the channel, creating aggregates, which in a narrow aperture passage leads to the formation of a blockage of the channel and greatly impedes the flows (Figure 6, a). By increasing the pressure, it is still possible to break through the blockage, but in the end the entire surface of the channel becomes dirty, and synthesis is impossible (Figure 6, b). The addition of various surfactants does not solve the problem either.

For these reasons, it was decided to abandon the synthesis of MNP in MFCs with T-shaped topology and develop a more complex synthesis scheme. It is a system of 4 input and 1 output interfaces connected by a system of channels (Figure 7). Interfaces 1 and 2 are designed to supply a continuous medium from mineral oil. Two different inputs for the same medium are necessary for the supply of oil at different speeds, which implements the supply of microemulsions of aqueous solutions at different speeds and thus allows efficient mixing using internal recirculation inside the droplet. Interfaces 3 and 4 are designed to feed the channels with aqueous solutions of iron sulfate and ammonia hydrate, which are dispersed phases. In cross-lines 5, droplets of aqueous solutions are formed by focusing the flow. Then the droplets enter the reaction chamber 6 with an array of walls for inhibiting droplets. Here they merge and move further along the channels. The serpentine section of the channels 7 is necessary for better mixing of the droplet volume through the reaction of the dispersed phase on the channel walls. Interface 8 is used to output reaction products from the MFC.

MICROFLUIDIC SYNTHESIS AND THERANOSTIC SYSTEMS

Theranostics is defined, among other things, as an approach to the development of pharmaceutical compositions, which consists in a comprehensive solution of therapeutic and diagnostic problems by creating drugs that are both a means of early diagnosis and a therapeutic agent [32].

The American scientific community identifies theranostics as part of personalized, precision medicine, in which drugs are selected individually for each patient based on their predicted response or individual risk of disease [33]. In both cases, the use of multi-cascade microfluidic systems is quite interesting for the synthesis of such objects. According to the PubMed database, publications on theranostics originate from the 90s, where a systematic approach based on accuracy and selectivity began to be used for drug development [34]. At the same time, the term itself was introduced by Funchauser in 2002 and defined as the integration of two modalities, that is, therapy and medical imaging into a single “package” of material to overcome undesirable variations in bio-distribution and therapeutic efficacy [35]. At the same time, the number of publications on this topic is constantly growing (Figure 8 a). Microfluidics began to develop actively in the early 2000s (Fig. 8. b), and the number of articles is also steadily increasing. However, there is only a limited number of publications on the use of microfluidics in theranostics, currently not exceeding one hundred publications per year (Figure 8. c). Apparently, this is due to the difficulties of synthesis and modification of nano-objects in narrow channels. Currently, the task of synthesizing theranostics objects based on microfluidic technologies is reduced to two

aspects: the synthesis of nanoparticles themselves and their modification. For this purpose, MFCs of various topologies are used [36]. The general schematic of such synthesis can be illustrated in Figure 9. It includes the synthesis of nanoparticles, spacer, immobilization of the active substance, coating, contrast immobilization, as well as purification from intermediate reaction products [37]. Operation control is possible at each stage. In the synthesis of nanoparticles, this is the size distribution control by dynamic light scattering (DLS) [38], FT-IR analysis [39] at the stages of immobilization of active substances and the fluorescence analysis [40, 41] during immobilization of fluorophores. All these types of analysis, as well as PCR and others, can be implemented in separate microchips [42–46].

SENSORS BASED ON MICROFLUIDIC SYSTEMS

The integration of micro-devices with different chip designs has led to an increase in the analysis functionality using such systems. For example, fast and sensitive microfluidic systems can detect various biological objects, such as proteins, nucleic acids, cells, pathogens, etc. [47–49]. However, the objects of interest to researchers may not only have a biological nature, but also contain specific ions, dissolved gases, drugs and toxins [50]. Therefore, microfluidic biosensors are used in various fields, for example, for the diagnosis of diseases [51], food safety control [52] and environmental monitoring [53].

Currently, the most commonly used microfluidic platform is known as a “laboratory-on-chip” (LOC) or a total microanalysis system (micro-TAS) [54, 55].

Devices based on LOC technology combine several laboratory functions on a single crystal ranging in

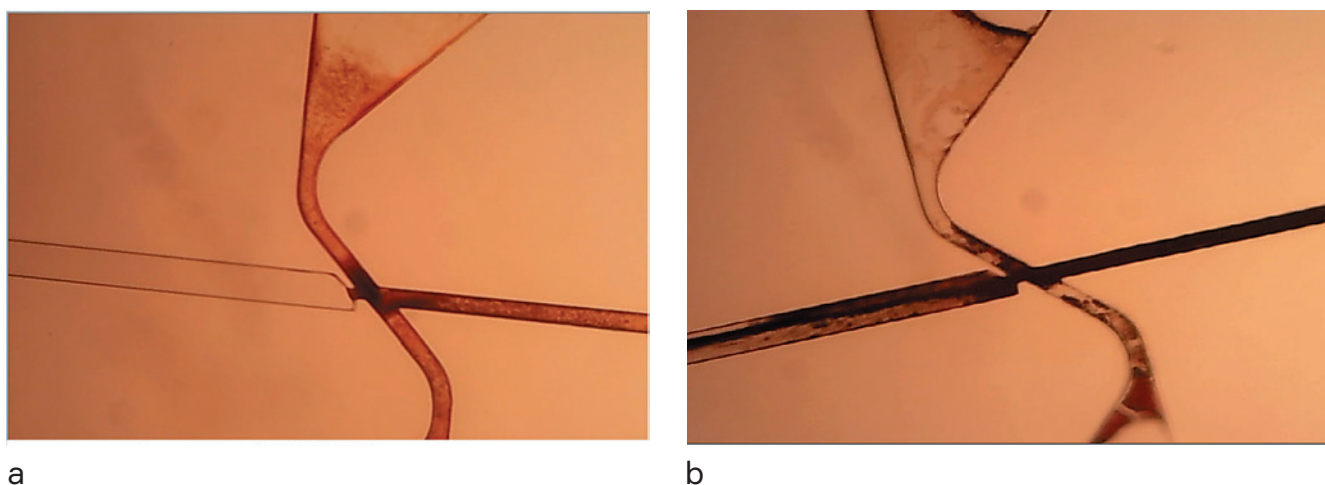


Figure 6. Contamination of T-shaped topology MFC in the process of MNP synthesis: a — initial contamination; b — complete filling

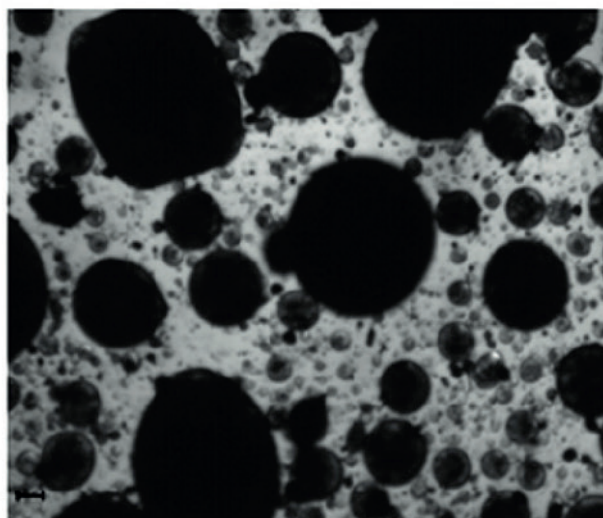
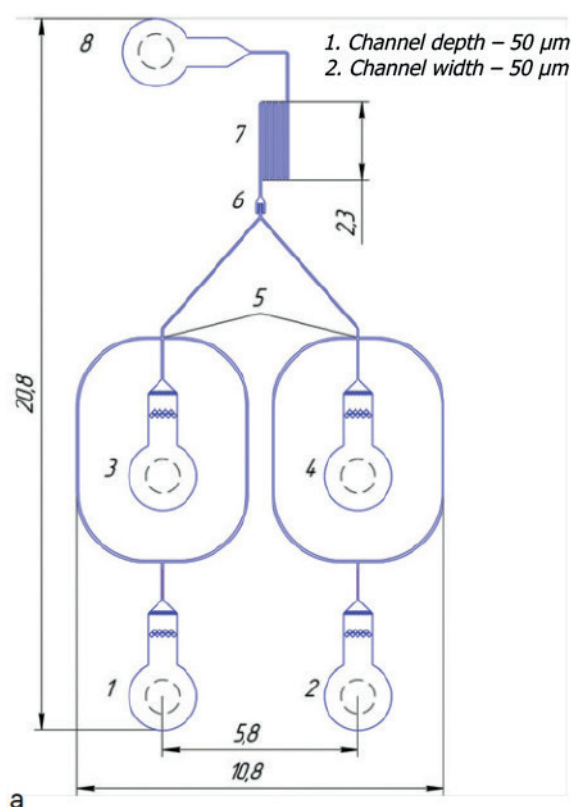


Figure 7. MFC topology for the synthesis of magnetic nanoparticles (a) and suspension of droplets containing nanoparticles (b)

size from a few square millimeters to several square centimeters. Compared to conventional systems, these platforms have many advantages, for example, a high surface-to-volume ratio, precise fluid control, low sample consumption and a high degree of integration with functional components [56]. There are chip-integrated microfluidic biosensors designed for so-called point-of-care diagnosis (POC) [57]. Microfluidics provides simple and fast analysis of small samples. Moreover, several sensors and sensing zones can be built into microfluidic chips to increase their usefulness. It is assumed that the ideal chip-integrated biosensor will be inexpensive, compact, fast and sensitive.

Recently, a flexible and easily stretchable MFC-integrated electrochemical sensor [58] has been manufactured. This makes it possible to simulate physiological and biomechanical parameters of blood vessels *in vivo* and simultaneously monitor mechanically induced biochemical signals in real time. A microfluidic biosensor has been developed for online sensitive detection of salmonella based on immuno-magnetic separation, fluorescent marking and video processing on a smart phone [59]. Magnetic nanoparticles were used to separate and efficiently concentrate the target bacteria, resulting in the formation of magnetic bacteria, which were then marked with fluorescent microspheres. After that, flu-

orescent bacteria were continuously injected into the MFC and illuminated by a fluorescent microscopic system, and fluorescent spots were counted online using an application for smart phone based on the interframe difference algorithm to determine the number of bacteria.

One of the varieties of LOC is the “organ on chip” (OOC) technology which arose from the desire to replace experimental models with animals [60].

OOC platforms are a new generation of three-dimensional models of cell cultures that better simulate the dynamic, physico-chemical, biochemical and microarchitectural properties of the microenvironment of living organs. Organ-on-chip microphysiological systems are flexible and can be designed to simulate the required types of organs and tissues for the opening process and drug development [61, 62]. For example, the lung-on-chip model is used to study the physical and physiological aspects of alveolar tissue [63].

An important direction in the development of test microfluidic systems is the diagnosis of viral diseases. Such systems can be based on both OOC technology and biosensors for POC. One of these sensors is a smart phone-based platform for highly sensitive and selective detection of avian influenza virus based on colorimetric detection using nanomaterials [64]. Three-dimensional nanostructures that serve as a framework for the conju-

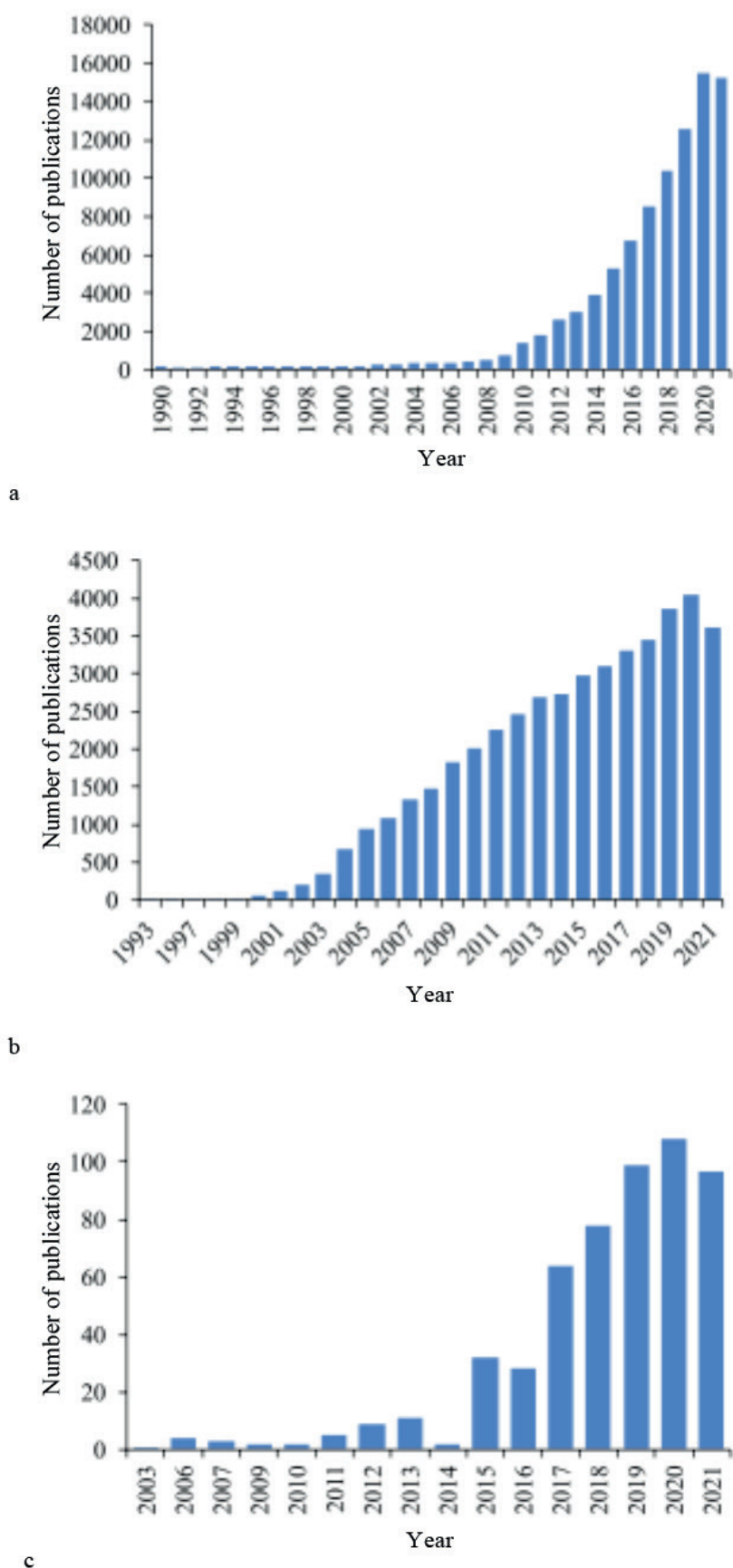


Figure 8. Number of publications:
a — theranostics; b — microfluidic; c — microfluidic & theranostics

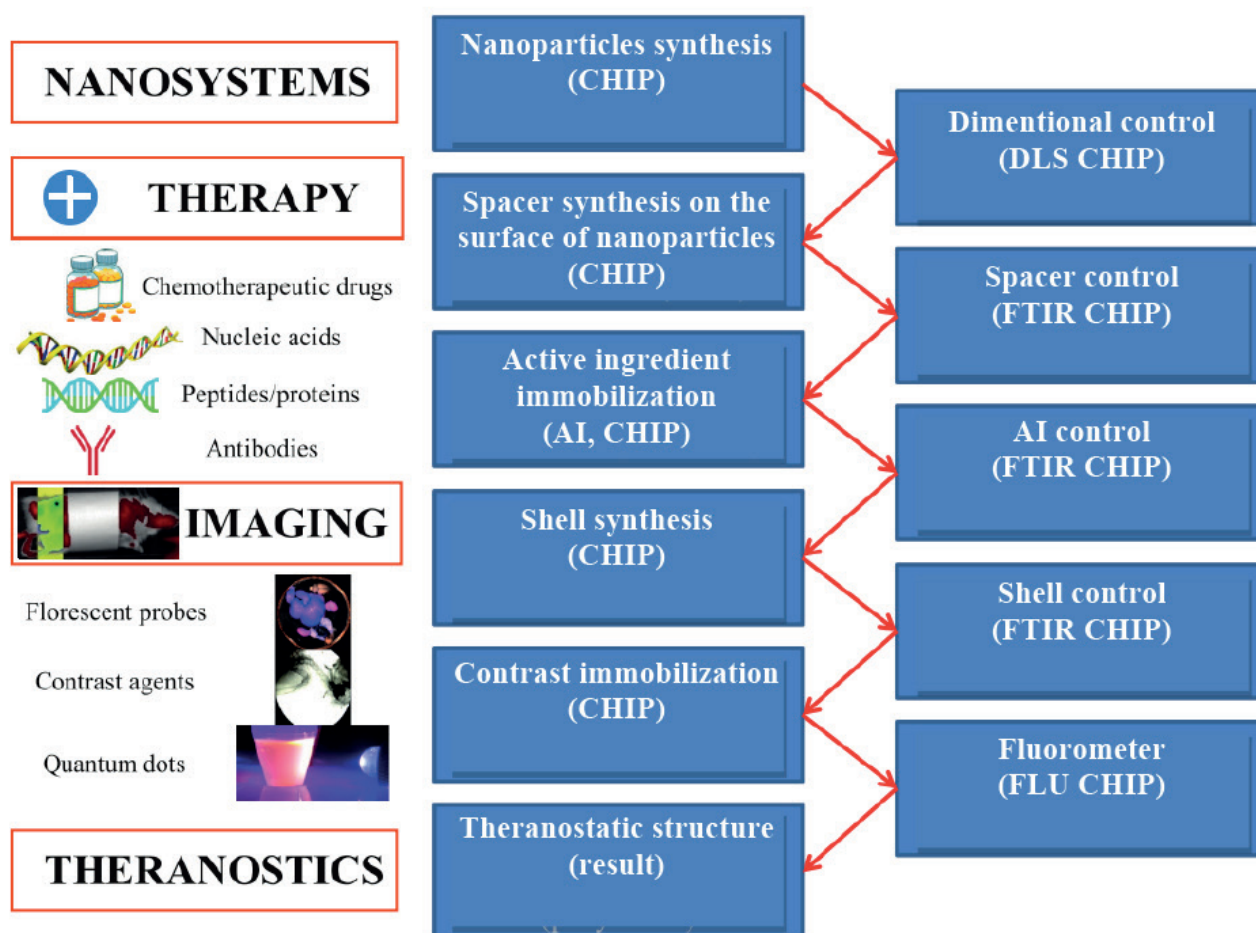


Figure 9. General flowchart diagram for synthesizing objects for theranostics

gation of antibodies to capture the avian influenza virus are made on their PDMS structures in the form of a heringbone using a template of ZnO nanorods. After the virus is captured, a colorimetric reaction based on gold nanoparticles on a crystal makes it possible to detect the virus with the naked eye. An example of a test system based on OOC is the study on virus-host interactions and human reactions on the “lungs-on-chip” and “intestine-on-chip” models [65].

Today, the problem of detecting the SARS-CoV-2 virus is an acute problem. The main diagnostic methods are now genomic (including PCR, real-time RT-PCR, sequencing) and serological/immunological tests (focused on detection antibodies or antigens in biological samples taken from patients). With a high degree of reliability of these methods, they have a number of significant disadvantages expressed in high cost, duration of analysis and dependence of the accuracy of the results on the methods of material collection, compliance with storage conditions, transportation and sample preparation. All this complicates mass screening, especially in remote regions with insufficient infrastructure [66–69]. Some of these problems can be solved by immobi-

lizing viral antigens or proteins of its targets on the surface of nanoparticles, followed by their use to determine the markers of viral infection (both nucleic acids and viral proteins, and antibodies against them). In recent years, new methods of nanodiagnostics for early sensitive detection of viral infections have been considered as the most accessible and effective in the context of an epidemic. They do not require a large volume of the test sample or a special sample preparation and can be used even at home, which reduces the risk of cross-infection of others [70]. In order to enhance the signal when detecting pathogens, the surfaces of nanoparticles are easily modified with polyvalent ligands or other biomolecules [71]. Surface functionalization gives nanoparticles the ability to interact with specific biomarkers of infection, such as viral RNA, viral proteins and virus-specific antibodies [72, 73]. The unique physico-chemical characteristics of nanoparticles (optical, reaction and/or fluorescent properties) allow them converting the fact of interaction with biomarkers into measurable detection signals [74, 75]. All this makes it possible to formulate a new scheme for detecting viruses and, in particular, COVID-19 (Figure 10).

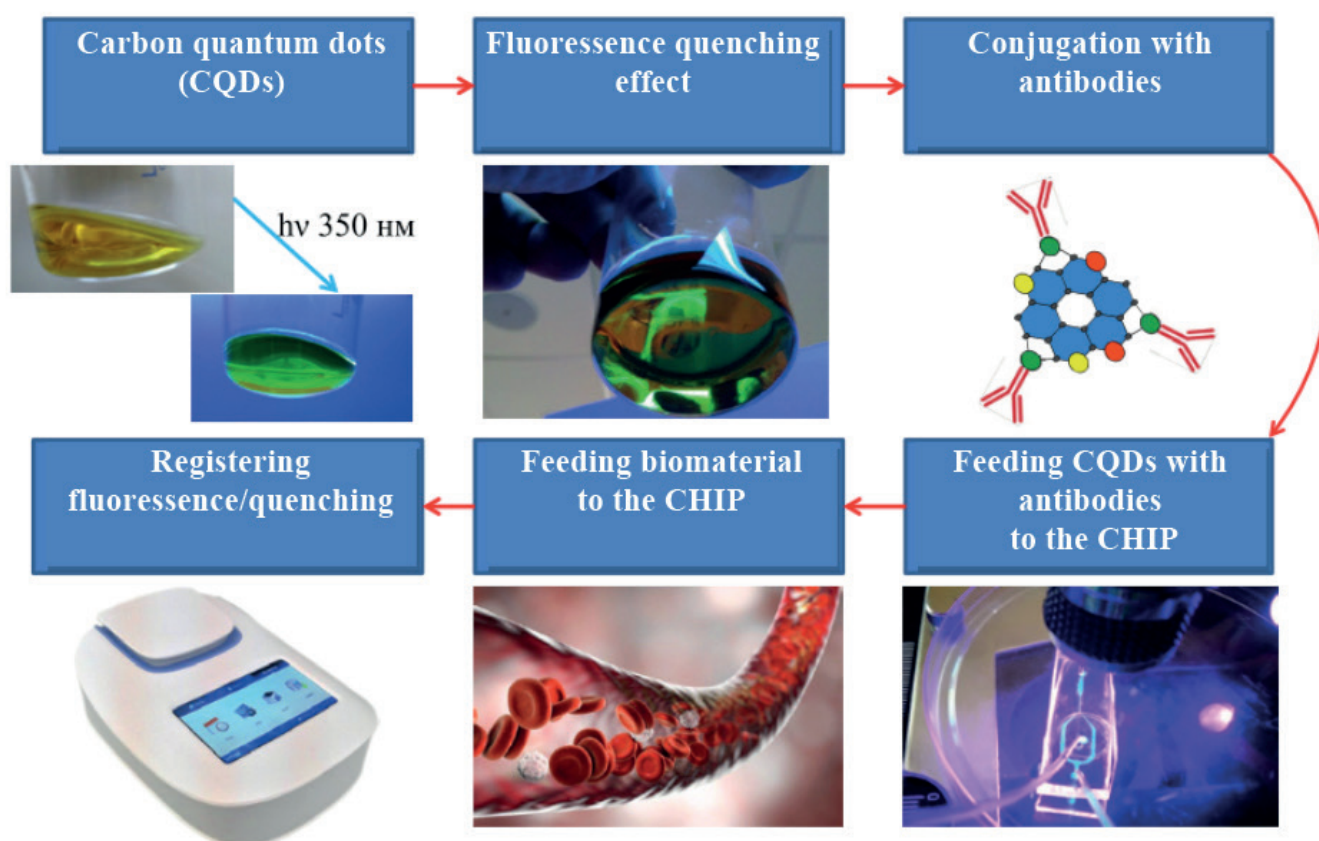


Figure 10. General schematic of a sensor based on fluorescent quenching of carbon quantum dots

The main component of the system is a fluorescent agent (FA), which is characterized by fluorescent quenching while reducing the intensity of the inducing radiation or shifting its wavelength. Colloidal quantum dots (QDs), which by their physical nature are nanoparticles, can act as FAs. QDs are conjugated with antibodies to the virus or with a protein that is tropic to any part of the virus. Such a conjugate can be launched into the channel of a microfluidic chip, where it mixes with blood and enters another chip for detection. The scheme can be portable and adapted for various viruses.

CONCLUSION

Despite the relatively recent introduction of microfluidic synthesis, it has proved highly efficient in reproducing micro- and nanoparticles in a controlled environment.

Successful synthesis and application of micro- and nanoparticles based on microfluidics have the following features:

1. Fast and sufficient mixing in microfluidic channels leads to monodisperse particles with a relatively high yield.
2. Control over the synthesis conditions allows you to accurately regulate the physical and chemical

properties and minimize their deviation from batch to batch.

3. Systematic integration of several procedures into a single microfluidic device makes it possible to produce micro- and nanoparticles with the desired complex structure in one step.

4. Microreactor technology provides improved process control based on well-defined active unit cell microstructures that can be reproduced to obtain higher chemical production volumes.

All these advantages allow us to draw a conclusion about the prospect of large-scale use of microfluidics for biomedical purposes. Currently, the use of microfluidic devices in such areas as synthesis of drugs [76], PCR analysis [77], cell research [78], synthesis of radiopharmaceuticals [79] and many others is already close to practical implementation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. El-Housiny S, Eldeen M A S, El-Attar YA, et al. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles topical gel for

treatment of pityriasis versicolor: formulation and clinical study. *Drug Deliv.* 2018;25(1):78-90.

2. Millstone JE, Kavulak DFJ, Woo CH, et al. Synthesis, properties, and electronic applications of size-controlled poly(3-hexylthiophene) nanoparticles. *Langmuir.* 2010;26:13056–13061.

3. Arroyo GV, Madrid AT, Gavilanes AF, et al. Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics. *Journal of environmental science and health, part A.* 2020;55(11):1304-1320.

4. Gao Y, Wu Y, Lu H, et al. CsPbBr₃ perovskite nanoparticles as additive for environmentally stable perovskite solar cells with 20.46% efficiency. *Nano Energy.* 2019;63:103838.

5. Lin CH, Lee GB, Lin YH, et al. A Fast Prototyping Process for Fabrication of Microfluidic Systems on Soda-Lime Glass. *J. Micromech. Microeng.* 2001;11:726–732.

6. Torabinia M, Asgari P, Dakarapu U, et al. On-chip organic synthesis enabled by engine-and-cargo in an electrowetting-on-dielectric digital microfluidic device. *Lab Chip.* 2019;19:3054-3064.

7. Herranz-Blanco B, Ginestar E, Zhang H, et al. Microfluidics platform for glass capillaries and its application in droplet and nanoparticle fabrication. *Int J Pharm.* 2017;516(1–2):100-105.

8. Talebi S, Abedini A, Lele P, et al. Microfluidics-based measurement of solubility and diffusion coefficient of propane in bitumen. *Fuel.* 2017;210:23–31.

9. Mukherjee P, Nebuloni F, Gao H, et al. Rapid prototyping of soft lithography masters for microfluidic devices using dry film photoresist in a non-cleanroom setting. *Micromachines.* 2019;10(3):192.

10. Ivanov SV, Trachevskii VV, Stolyarova NV, et al. Plasmochemical modification of polymer surfaces. *Rus J Appl Chem.* 2006;79:445–447.

11. Kim DNH, Kim KT, Kim C, et al. Soft lithography fabrication of index-matched microfluidic devices for reducing artifacts in fluorescence and quantitative phase imaging. *Microfluid Nanofluid.* 2018;22:2.

12. Costa PF, Albers HJ, Linssen JEA, et al. Mimicking arterial thrombosis in a 3D-printed microfluidic in vitro vascular model based on computed tomography angiography data. *Lab on a Chip.* 2017;17(16):2785–2792.

13. Prabhakar A, Agrawal M, Mishra N, et al. Cost-effective smart microfluidic device with immobilized silver nanoparticles and embedded UV-light sources for synergistic water disinfection effects. *RSC Advances.* 2020;10(30):17479–17485.

14. Lopez C, Oza G, Casanova JR, et al. Proposal to Develop a Microfluidic Platform with GMR Sensors and the Use of Magnetic Nanoparticles in Order to Detect Cancerous Cells: Preliminary experimentation. *Global Medical Engineering Physics Exchanges/ Pan American Health Care Exchanges (GMEPE/PAHCE).* 26-31 March 2019: 18691807.

15. Hao N, Nie Y, Zhang JXJ. Microfluidic synthesis of functional inorganic micro-/nanoparticles and applications in biomedical engineering. *International Materials Reviews.* 2018;63(8):461-487.

16. Lin WZS, Malmstadt N. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. *Eur Biophys J.* 2019;48(6):549-558.

17. Wang Y, Seidel M. Strategy for fast manufacturing of 3D hydrodynamic focusing multilayer microfluidic chips and its application for flow-based synthesis of gold nanoparticles. *Microfluid Nanofluid.* 2021;25:64.

18. Sounart TL, Safier PA, Voigt JA, et al. Spatially-resolved analysis of nanoparticle nucleation and growth in a microfluidic reactor. *Lab Chip.* 2007;7:908–915.

19. Tofighi G, Lichtenberg H, Pesek J, et al. Continuous microfluidic synthesis of colloidal ultrasmall gold nanoparticles: in situ study of the early reaction stages and application for catalysis. *React. Chem. Eng.* 2017;2:876–884.

20. Hao N, Xua Z, Nie Y, et al. Microfluidics-enabled rational design of ZnO micro-/nanoparticles with enhanced photocatalysis, cytotoxicity, and piezoelectric properties. *Chem Eng J.* 2019;378:122222.

21. Zhang Y, Tong X, Yang L, et al. A herringbone mixer based microfluidic device HBEXO-chip for purifying tumor-derived exosomes and establishing miRNA signature in pancreatic cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2021;332:129511.

22. Christopher GF, Anna SL. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *J Phys D: Appl Phys.* 2007;40:R319.

23. Schimel TM, Nguyen MA, Sarles SA, et al. Pressure-driven generation of complex microfluidic droplet networks. *Microfluidics and Nanofluidics.* 2021;25:78.

24. Xie T, Wang P, Wu L, et al. A hand-powered microfluidic system for portable and low-waste sample discretization. *Lab on a Chip.* 2021;21:3429-3437.

25. Davis JJ, Padalino M, Kaplitz AS, et al. Utility of low-cost, miniaturized peristaltic and Venturi pumps in droplet microfluidics. *Analytica Chimica Acta.* 2021;1151:338230.

26. Khizar S, Halima HB, Ahmad NM, et al. Magnetic nanoparticles in microfluidic and sensing: From transport to detection. *Electrophoresis.* 2020;41(13-14):1206-1224.

27. Abedini-Nassab R, Miandoab MP, Şaşmaz M. Microfluidic Synthesis, Control, and Sensing of Magnetic Nanoparticles: A Review. *Micromachines (Basel).* 2021;12(7):768.

28. Bemetz J, Wegemann A, Saatchi K, et al. Microfluidic-Based Synthesis of Magnetic Nanoparticles Coupled with Miniaturized NMR for Online Relaxation Studies. *Anal Chem.* 2018;90(16):9975-9982.

29. Hermann CA, Mayer M, Griesche C, et al. Microfluidic-enabled magnetic labelling of nanovesicles

for bioanalytical applications. *Analyst*. 2021;146(3):997-1003.

30. Rao L, Cai B, Bu LL, et al. Microfluidic Electro- poration-Facilitated Synthesis of Erythrocyte Membrane-Coated Magnetic Nanoparticles for Enhanced Imaging-Guided Cancer Therapy. *ACS Nano*. 2017;11(4): 3496-3505.

31. Ma J, Yi C, Li CW. Facile synthesis and functionalization of color-tunable Ln^{3+} -doped KGdF_4 nanoparticles on a microfluidic platform. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;108:110381.

32. Melerzanov A, Moskalev A, Zharov V. Precision medicine and molecular theranostics. Doctor. 2016;2:11-14. In Russian [Мелерзанов А, Москалев А, Жаров В. Прецизионная медицина и молекулярная тераностика. Врач. 2016;2:11-14].

33. Stratified, personalised or P4 medicine: a new direction for placing the patient at the centre of healthcare and health education (Technical report). Academy of Medical Sciences, 2015. p. 37.

34. Papavassiliou AG. Transcription-factor-modulating agents: precision and selectivity in drug design. *Mol Med Today*. 1998;4(8):358-66.

35. Kalash RS, Lakshmanan VK, Cho CS, et al. Theranostics. In: Mitsuhiro Ebara. *Biomaterials Nanoarchitectonics*. Elsevier Inc., 2016:197–215.

36. Mosayebi J, Kiyasatfar M, Laurent S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Adv. Healthcare Mater*. 2017;6:1700306.

37. Khositanon C, Adpakpang K, Bureekaew S, et al. Continuous-flow purification of silver nanoparticles and its integration with flow synthesis. *J Flow Chem*. 2020;10:353–362.

38. Chastek TQ, Iida K, Amis EJ, et al. A microfluidic platform for integrated synthesis and dynamic light scattering measurement of block copolymer micelles. *Lab on a Chip*. 2008;8(6):950–957.

39. Perro A, Lebourdon G, Henry S, et al. Combining microfluidics and FT-IR spectroscopy: towards spatially resolved information on chemical processes. *React. Chem. Eng*. 2016;1:577–594.

40. Măriuța D, Colin S, Barrot-Lattes C, et al. Miniaturization of fluorescence sensing in optofluidic devices. *Microfluid Nanofluid*. 2020;24:65.

41. Ryu G, Huang J, Hofmann O, et al. Highly sensitive fluorescence detection system for microfluidic lab-on-a-chip. *Lab on a Chip*. 2011;11(9):1664.

42. Bates KE, Lu H. Optics-Integrated Microfluidic Platforms for Biomolecular Analyses. *Biophysical Journal*. 2016;110(8):1684-1697.

43. Li Z, Ju R, Sekine S, et al. All-in-one microfluidic device for on-site diagnosis of pathogens based on integrated continuous flow PCR and electrophoresis biochip. *Lab Chip*. 2019;19:2663–2668.

44. Bomers M, Charlot B, Barho F, et al. Microfluidic surface-enhanced infrared spectroscopy with semiconductor plasmonics for the fingerprint region. *React Chem Eng*. 2020;5:124.

45. Vaccari L, Birarda G, Businaro L, et al. Infrared Microspectroscopy of Live Cells in Microfluidic Devices (MD-IRMS): Toward a Powerful Label-Free Cell-Based Assay. *Analytical Chemistry*. 2012;84(11):4768–4775.

46. Xiao L, Zhang P, Li W, et al. Multi-angle Fiber DLS system Based on Microfluidics Technology. *International Applied Computational Electromagnetics Society Symposium. China (ACES)*. 2019:19565492.

47. McArdle H, Jimenez-Mateos EM, Raoof R, et al. "TORNADO" – Theranostic One-Step RNA Detector; microfluidic disc for the direct detection of microRNA-134 in plasma and cerebrospinal fluid. *Sci Rep*. 2017;7:1750.

48. Kaur G, Tomar M, Gupta V. Development of a microfluidic electrochemical biosensor: Prospect for point-of-care cholesterol monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;261:460–466.

49. Shin SR, Kilic T, Zhang YS, et al. Label-Free and Regenerative Electrochemical Microfluidic Biosensors for Continual Monitoring of Cell Secretomes. *Advanced Science*. 2017;4(5):1600522.

50. Kirsch J, Siltanen C, Zhou Q, et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine *Chem Soc Rev*. 2013;42:8733–8768.

51. Ghrera AS, Pandey CM, Malhotra BD. Multiwalled carbon nanotube modified microfluidic-based biosensor chip for nucleic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;266:329–336.

52. Jiang H, Jiang D, Zhu P, et al. A novel mast cell co-culture microfluidic chip for the electrochemical evaluation of food allergen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 83: 126–133.

53. Campaña A, Florez S, Noguera M, et al. Enzyme-Based Electrochemical Biosensors for Microfluidic Platforms to Detect Pharmaceutical Residues in Wastewater. *Biosensors*. 2019;9(1):41.

54. Arora A, Simone G, Salieb-Beugelaar GB, et al. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Analytical Chemistry*. 2010;82(12):4830–4847.

55. Fernández-la-Villa A, Pozo-Ayuso DF, Castaño-Álvarez M. Microfluidics and electrochemistry: An emerging tandem for next-generation analytical microsystems. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2019;15:175-185.

56. Haeberle S, Zengerle R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*. 2007;7:1094–1110.

57. Rackus DG, Shamsi MH, Wheeler AR. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(15):5320–5340.

58. Jin Z, Liu Y, Fan W, et al. Integrating Flexible Electrochemical Sensor into Microfluidic Chip for Simulating and Monitoring Vascular Mechanotransduction. *Small*. 2019;1903204.
59. Wang S, Zheng L, Cai G, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using fluorescence labeling and smartphone video processing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;111333.
60. Ahadian S, Civitarese R, Bannerman D, et al. Organ-On-A-Chip Platforms: A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies. *Adv Healthc Mater*. 2018;7:1700506.
61. Asif A, Kim KH, Jabbar F, et al. Real-time sensors for live monitoring of disease and drug analysis in microfluidic model of proximal tubule. *Microfluid Nanofluid*. 2020;24:43.
62. Khetani S, Yong KW, Kollath, VO, et al. Engineering Shelf-Stable Coating for Microfluidic Organ-on-a-Chip using Bioinspired Catecholamine Polymers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(6):6910-6923.
63. Arefi SMA, Tony Yang CWT, Sin DD, et al. Simulation of nanoparticle transport and adsorption in a microfluidic lung-on-a-chip device. *Biomicrofluidics*. 2020;14(4):044117.
64. Xia Y, Chen Y, Tang Y et al. A Smartphone-based Point-of-care Microfluidic Platform Fabricated with ZnO Nanorod Template for Colorimetric Virus Detection. *ACS Sensors*. 2019 ;4(12):3298-3307.
65. Wang Y, Wang P, Qin J. Microfluidic Organs-on-a-Chip for Modeling Human Infectious Diseases. *Acc. Chem. Res*. 2021;54(18):3550–3562.
66. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, et al. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(8):615–626.
67. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opin Med Diagn*. 2008;2(10):1155–1171.
68. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance. *Nat Biotechnol*. 2020;38(10):1174–1183.
69. Peeling RW, Wedderburn CJ, Garcia PJ, et al. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *Lancet*. 2020;20(9):E245–E249.
70. Derakhshan MA, Amani A, Faridi-Majidi R. State-of-the-Art of Nanodiagnosics and Nanotherapeutics against SARS-CoV-2. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(13):14816–14843.
71. Bellan LM, Wu D, Langer RS. Current trends in nanobiosensor technology. *Wiley Interdiscip. Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(3):229–246.
72. Talebian S, Wallace GG, Schroeder A, et al. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. *Nat Nanotechnol*. 2020;15(8):618–621.
73. Saxena A, Khare D, Agrawal S et al. Recent advances in materials science: a reinforced approach toward challenges against COVID-19. *Emergent Mater*. 2021;4(1):57–73.
74. Chintagunta AD, M SK, Nalluru S, et al. Nanotechnology: An emerging approach to combat COVID-19. *Emergent Mater*. 2021;4:119–130.
75. Hassanzadeh P. Nanotheranostics against COVID-19: From multivalent to immune-targeted materials. *J Control Release*. 2020;328:112–126.
76. Akhmedova DA, Shatalov DO, Ivanov IS, et al. The use of microfluidic hardware in the synthesis of oligohexamethylene guanidine derivatives. *Fine Chemical Technologies*. 2021;16(4):307-317.
77. Woolley AT, Hadley B, Landre P, et al. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem*. 1996;68(23):4081–4086.
78. Kukhtevich IV, Evstrapov AA, Bukatin AS. Microfluidic devices for cell research (review). *Scientific instrumentation*. 2013;4:66-75. In Russian [Кухтевич И.В., Евстратов А.А., Букатин А.С. Микрофлюидные устройства для исследований клеток (обзор). *Научное приборостроение*. 2013;4:66–75].
79. Zhanavskiy ML, Mironova AA, Popov AM, et al. Application of microfluidic technology for the synthesis of ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals. *Medical physics*. 2013;4:44-51. In Russian [Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М. и др. Применение микрофлюидной технологии для синтеза радиофармпрепаратов, меченных ¹⁸F. *Медицинская физика*. 2013;4:44-51].

Author information:

Lazareva Elizaveta O., Junior Researcher of the Research Laboratory of Nanotechnology, Center for Experimental Biomodelling, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Evstrapov Anatoly A. Dr. Sci., Acting Director of the Institute for Analytical Instrumentation Russian Academy of Science;

Gareev Kamil G., PhD, Associate Professor, Micro and Nanoelectronics Department, Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Chebуркин Yuri V., PhD, Head of the Research Laboratory of Contagious and Biomolecular Nanostructures, Center for Preclinical Translational Research Almazov National Medical Research Centre;

Krizhanovich Alexander, Master's student, Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Korolev Dmitrii V., Dr. Sci., Head of the Research Laboratory of Nanotechnology, Center for Experimental Biomodelling, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.391

АМИЛОИДОЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА. КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

**Солоницын Е. Г.^{1, 2}, Алиева Ю. Ш.¹, Сейфединова С. Ш.²,
Баранов Д. Г.¹, Митрофанова Л. Б.¹, Грозов Р. В.¹, Перминова А. А.¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Алиева Юлия Шахиновна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: alieva-yulia@list.ru

Статья поступила в редакцию
06.10.2021 и принята к печати
03.11.2021.

РЕЗЮМЕ

Амилоидоз — группа заболеваний, характеризующихся внеклеточным отложением в тканях и органах фибриллярного белка (амилоида), состоящих из β -складчатых пластин. Клинические проявления и эндоскопическая картина амилоидоза разнообразна и малоспецифична, в связи с чем у специалистов возникают трудности с постановкой диагноза. Наиболее часто проявления со стороны желудочно-кишечного тракта отмечаются при AL-амилоидозе. Морфологический диагноз устанавливают при обнаружении характерного яблочно-зеленого двойного лучепреломления в поляризованном свете после окрашивания конго красным. В данной статье представлены клинические случаи диагностики амилоидоза желудочно-кишечного тракта и современные данные литературы.

Ключевые слова: AL-амилоидоз, AA-амилоидоз, амилоид, амилоидоз, эндоскопия.

Для цитирования: Солоницын Е.Г., Алиева Ю.Ш., Сейфединова С.Ш. и др. Амилоидоз желудочно-кишечного тракта. Клинические случаи. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):237-253.

ВВЕДЕНИЕ

Амилоидоз — группа заболеваний, характеризующихся внеклеточным отложением в тканях и органах фибриллярного белка (амилоида), состоящих из β -складчатых пластин [1]. Диагноз устанавливается при обнаружении характерного яблочно-зеленого двойного лучепреломления в поляризованном свете после окрашивания конго красным [2, 3]. Согласно принятой Международным обществом амилоидоза номенклатуре (International Society of Amyloidosis), первая буква А обозначает амилоид, а следующие буквы относятся к белку-предшественнику: А (амилоидный А-протеин), L (легкие цепи иммуноглобулинов), TTR (транстиретин), β 2M (β 2-микроглобулин), В (В-протеин), IAPP (островковый амилоидный полипептид) и др. [4].

Первичный AL-амилоидоз является наиболее распространенной формой с генерализованным отложением избыточных световых цепей, ассоциирован с плазмоклеточной дискразией и имеет максимальное поражение ЖКТ [5]. AL-амилоидоз вызывается дискразией плазматических клеток, которая может возникать сама по себе или быть связана со множественной миеломой [6].

Вторичный AA-амилоидоз связан с инфекционными, воспалительными или реже неопластическими заболеваниями. Механизм поражения органов заключается в том, что на фоне воспалительного процесса происходит повышение белка острой фазы (SAA), часть которого откладывается в органах и тканях в виде амилоидных фибрилл [5]. Данная патология встречается при ревматоидном артрите, болезни Крона, анкилозирующем спондилите, синдроме Рейтера, псориазе, прогрессирующем системном склерозе, первичном билиарном циррозе, стромальных опухолях желудочно-кишечного тракта и при других заболеваниях.

Семейный амилоидоз (ATTR) имеет несколько подтипов. Наиболее распространенный наследственный аутосомно-доминантный ATTR-амилоидоз обусловлен мутациями в молекуле транстиретина (который вырабатывается в печени) или возрастным нарушением секреции тетрамеров транстиретина печенью. В обоих случаях происходит распад тетрамеров транстиретина до мономеров, обладающих выраженной нестабильностью конформации белка [7].

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Поражение со стороны желудочно-кишечного тракта чаще проявляется при AL-амилоидозе. В ротовой полости наиболее частым проявлением

является макроглоссия, которая может вызывать апноэ во сне, нарушение речи, оральную дисфагию, затруднения при жевании [8]. Со стороны пищевода основными симптомами являются: дисфагия, боль в груди, изжога и рвота [9]. Также в пищеводе могут наблюдаться манометрические изменения, которые проявляются преимущественно при AL-амилоидозе. Определяется низкое давление в нижнем пищеводном сфинктере и снижение амплитуды сокращений, в то время как верхний сфинктер пищевода и глотка работают нормально [10]. Данная картина наблюдается при ахалазии. В отличие от идиопатической ахалазии, у пациентов достаточно быстро появляются симптомы, и они резко теряют вес [11]. У пациентов с амилоидозом поражение желудка проявляется тошнотой, рвотой, болью в эпигастральной области. Также возможны осложнения в виде перфораций, свищей и кровотечений [12, 13].

Наибольшая степень отложения амилоида наблюдается в тонкой кишке, в интима и адвентиции сосудов, тем самым поражая сосудистую сеть. Когда стенка сосуда утолщается ее просвет сужается и в конечном итоге полностью закупоривается, тромбируется, что приводит к ишемии и инфаркту [14]. Также амилоид откладывается между мышечными волокнами, вызывая атрофию соседних волокон за счет сдавления, так что в конечном итоге весь мышечный слой заменяется амилоидом. К клиническим проявлениям у пациентов с амилоидозом тонкой кишки относятся: диарея, стеаторея, потеря белка, кровотечение, непроходимость, перфорация, инвагинация, пневматоз, запор и псевдообструкция [5].

Клинические проявления амилоидоза толстой кишки могут имитировать такие заболевания, как воспалительное заболевание кишечника [15], злокачественные новообразования [16], ишемический колит [17, 18] и коллагеновый колит [19].

ДИАГНОСТИКА

В диагностике амилоидоза желудочно-кишечного тракта важным аспектом является гистологическое исследование биоптатов с обнаружением характерного яблочно-зеленого двойного лучепреломления в очагах скопления амилоида при исследовании в поляризованном свете. Необходимо отметить, что каждый конкретный амилоидный белок имеет преимущественное место отложения в желудочно-кишечном тракте. Амилоид AL, β 2MG (β 2-микроглобулин) и ATTR имеют тенденцию откладываться в подслизистом слое, тогда как амилоид AA имеет тенденцию откладываться в поверхностных слоях [20, 21]. Наиболее крупное

исследование определения наиболее частой локализации поражения желудочно-кишечного тракта было проведено в 2016 году Freudenthaler et al. Они проанализировали 542 пациента с амилоидозом и поражением желудочно-кишечного тракта. В результате было выявлено, что частота отложений амилоида при биопсии была 38 % в толстой кишке, 23 % в желудке, 17 % в прямой кишке, 16 % в двенадцатиперстной кишке и 6 % в тощей или подвздошной кишке [21–23]. Еще в одном крупном ретроспективном исследовании Cowan et al. обследовали 2334 пациента, у 76 (3,3 %) по результатам биопсии было диагностировано поражение желудочно-кишечного тракта, амилоидные фибриллы были идентифицированы в 50 % в тонкой кишке, 44 % в желудке и 32 % в толстой кишке [24]. Проанализировав ряд исследований, отражающих степень отложения амилоида, можно сделать выводы, что тонкая и толстая кишки могут быть подходящим местом для эндоскопической биопсии, так как являются наиболее частой локализацией отложения амилоида по сравнению с другими отделами желудочно-кишечного тракта.

Эндоскопические проявления амилоидоза желудочно-кишечного тракта разнообразны и неспецифичны. На слизистых оболочках могут определяться эрозии, изъязвления, зернистость слизистой, полипы, утолщение складок желудка, подслизистые гематомы, петехиальные элементы [5, 20]. Возможны и осложнения, включающие в себя: дилатацию толстой кишки [25, 26], псевдообструкцию [27–29], стриктуры, ректальное кровотечение [25–30], заворот [26] и перфорацию [31]. Одно из ретроспективных исследований, изучавших корреляцию расположения отложений амилоида и его эндоскопический вид, показало, что пациенты с поверхностными

эндоскопическими поражениями обычно имеют отложения амилоида в собственной пластинке, в то время как пациенты с зернистой или утолщенной слизистой оболочкой при эндоскопии имеют отложения амилоида в подслизистой оболочке [32, 33].

Iida et al. провели исследование, в котором оценили различия положительных результатов при эндоскопической биопсии у пациентов при системном амилоидозе с поражением желудочно-кишечного тракта, биоптаты брали как из измененных участков слизистой оболочки, так и из неизмененных. Процент положительных результатов биопсий желудка был значительно выше у пациентов с эндоскопическими данными, чем у пациентов без таких результатов (80 vs. 44 %), аналогичная тенденция наблюдалась в тонкой кишке и толстой кишке. Однако в двенадцатиперстной кишке и прямой кишке достоверной разницы в процентном соотношении между пациентами не наблюдалось (89 vs 90 %) (табл. 1) [21].

В диагностике амилоидоза толстой кишки используется эндоскопия с высоким разрешением и в режиме узкого спектра. Для амилоидоза прямой кишки характерна зернистость слизистой оболочки и появление узелков серовато-зеленого цвета при применении узкоспектральной эндоскопии, вероятно, это связано с отложением амилоидного белка в собственной пластинке. Этот метод может помочь отличить ректальные отложения амилоида от неопластических поражений [34, 35].

ЛЕЧЕНИЕ

В настоящее время общепринятых протоколов лечения амилоидоза желудочно-кишечного тракта не существует. Лечение зависит от причин, клинических проявлений и типа амилоидного белка.

Таблица № 1. Различия в частоте положительных результатов при эндоскопической биопсии системного амилоидоза с поражением ЖКТ у пациентов с или без эндоскопических данных

Показатели	Желудок	Двенадцатиперстная кишка	Тонкая кишка	Толстая кишка	Прямая кишка
С эндоскопическими данными	76,00 %	89,00 %	50,00 %	89,00 %	88,00 %
Без эндоскопических данных	44,00 %	90,00 %	25,00 %	33,00 %	78,00 %
P-значение	0,02	0,96	0,47	0,02	0,6

Терапия AL-амилоидоза направлена на снижение продукции легких цепей моноклонального иммуноглобулина путем подавления пролиферации плазматических клеток. Терапией первой линии, особенно у больных с высоким риском быстрого прогрессирования, считают комбинированные схемы на основе бортезомиба, мелфалана и дексаметазона. По мере достижения ремиссии у некоторых больных применяют высокодозную химиотерапию с поддержкой аутологичными стволовыми клетками, которая позволяет достичь длительной ремиссии. Необходим строгий подбор больных в связи со множественными противопоказаниями [36].

На фоне эффективной борьбы с воспалением происходит подавление продукции белка-предшественника, что является главной целью для лечения AA-амилоидоза. В результате уменьшается выработка сывороточного амилоидного белка A и реакция острой фазы.

Биологические препараты (в том числе ингибиторы ФНО, интерлейкин-6, ритуксимаб), цитостатики играют ключевую роль в лечении основных хронических воспалительных состояний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, псориаз и др. Средством выбора для лечения AA-амилоидоза при периодической болезни и тяжелой прогрессирующей подагре служит колхицин. При его постоянном приеме можно полностью прекратить рецидивирование приступов у большинства больных и затормозить у них развитие амилоидоза, возможен пожизненный прием колхицина [36, 37].

Для лечения наследственного амилоидоза необходимо устранить источник выработки генетически измененного белка. Печень вырабатывает большую часть циркулирующего в организме ТТР-белка. Ортотопическая трансплантация печени может быть использована для значительного снижения продукции патогенного белка, так как больная печень, выделяющая мутировавшую форму ТТР, заменяется печенью, которая выделяет нормальный белок [38].

ПРОГНОЗ

Прогноз зависит от типа амилоида, его этиологии и степени поражения органов. AL-амилоидоз связан с наиболее неблагоприятными исходами. Как правило, при данном типе амилоидоза у пациентов вовлечен желудочно-кишечный тракт и они имеют более тяжелое течение и более низкую выживаемость. При AA-амилоидозе уровень острофазового реактивного белка амилоида A в сыворотке крови коррелируется со смертностью. Несмотря

на то что осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта могут привести к ухудшению общего заболевания, они обычно не являются причиной смерти [3].

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

В данном сообщении мы представляем два случая амилоидоза ЖКТ, выявленных в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Основная цель демонстрации показать особенности эндоскопической картины амилоидоза ЖКТ.

Пациентка Ж., 44 года, поступила в клинику с жалобами на боли в животе, рвоту с прожилками крови, также она отмечала несколько эпизодов рвоты «кофейной гущей». При обследовании в амбулаторных условиях был заподозрен амилоидоз желудочно-кишечного тракта. Учитывая нарастание симптоматики, появление «симптомов тревоги» и не верифицированный диагноз амилоидоза, пациентка с подозрением на моноклональную гаммапатию была госпитализирована в клинику для дообследования и определения дальнейшей тактики лечения. В ходе лабораторно-инструментального обследования был выявлен системным AL-амилоидоз, ассоциированный со множественной миеломой.

При проведении эндоскопического исследования в пищеводе на слизистой оболочке определялись единичные, красного цвета, плоские, с четкими границами пятна с гладкой поверхностью, размером 2–4 мм. При осмотре в режиме LCI с использованием ZOOM создавалось впечатление о подслизистом расположении данных элементов. В желудке была выявлена выраженная контактная ранимость слизистой оболочки желудка, множественные фиксированные сгустки, геморрагии, эрозии. В луковице двенадцатиперстной кишки слизистая оболочка была контактно-ранима, рисунок рельефа ее асимметричный. Выполнена мультифокальная биопсия, результатом которой являлось обнаружение отложений амилоида (рис. 1–3).

Пациентка Ж., 55 лет, поступила в клинику с жалобами на образования в молочных железах. В ходе обширного лабораторно-инструментального обследования пациентке был выставлен диагноз миелома Бенс-Джонса с секрецией легкой цепи Карра, I A ст., ISS. Было проведено гистологическое исследование биоптата молочной железы, в котором определялось диффузное массивное отложение амилоида. В моче был обнаружен моноклональный компонент (белок Бенс-Джонса), и при количественном определении легких цепей

каппа ламбда в моче отмечалась секреция до 6 мг/дл (выше референсных значений). При МРТ сердца выявлено патологическое накопление контрастного вещества в миокарде левого желудочка, правого желудочка и предсердий, что может быть обусловлено проявлением амилоидоза. Пациентке было назначено скрининговое эндоскопическое обследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта для оценки слизистой. При осмотре в области дна желудка определялась измененная,

контактно-ранимая слизистая с бесструктурными очагами красного цвета. При биопсии измененных участков гистологически было выявлено отложение амилоида с яблочно-зеленым свечением при окраске конго красным (рис. 4, 5). За время госпитализации на основании полученных данных был выставлен диагноз: Миелома Бенс-Джонса с секрецией легкой цепи Карра, I A ст., ISS — 1 ст. Первичный системный AL-амилоидоз с поражением сердца, ЖКТ, молочных желез.

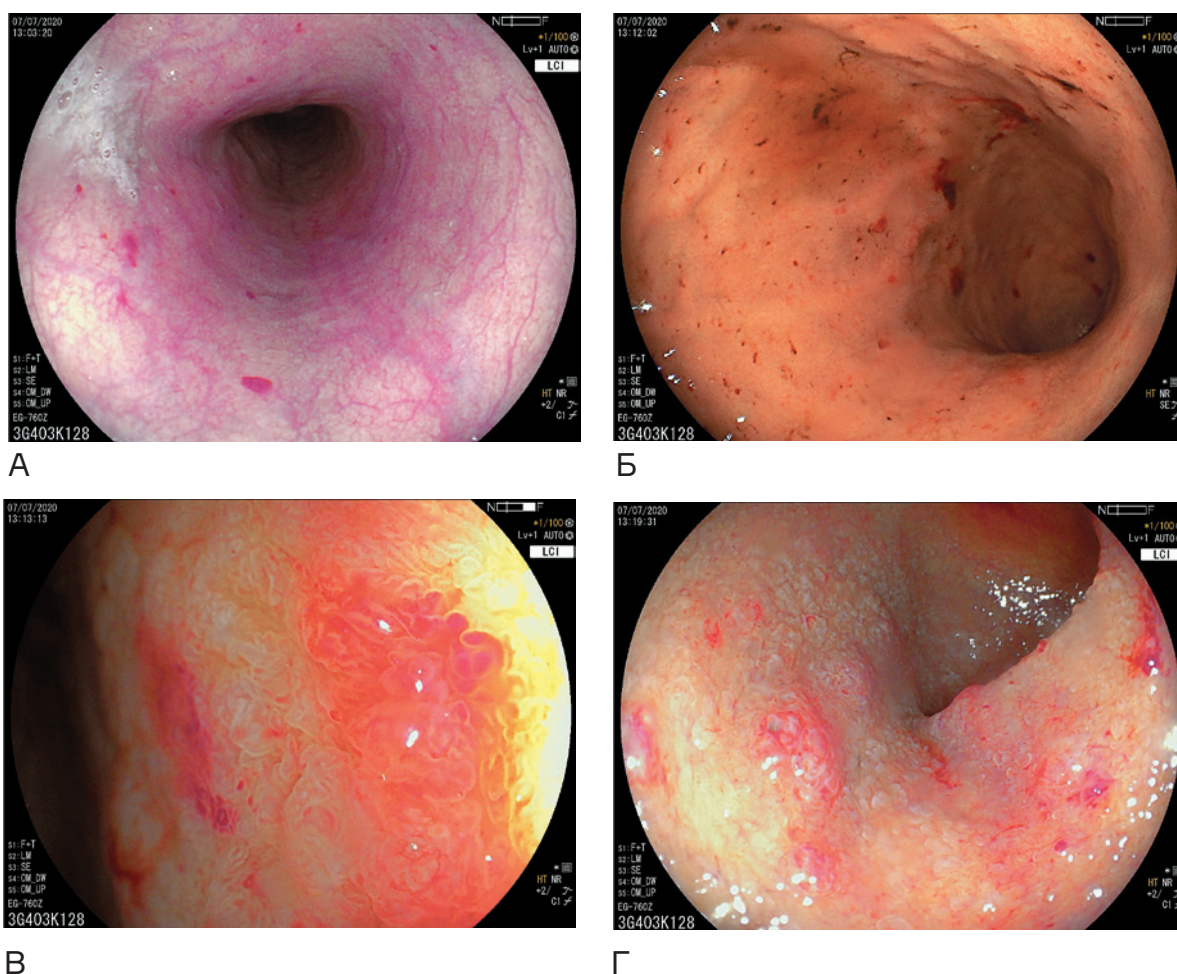
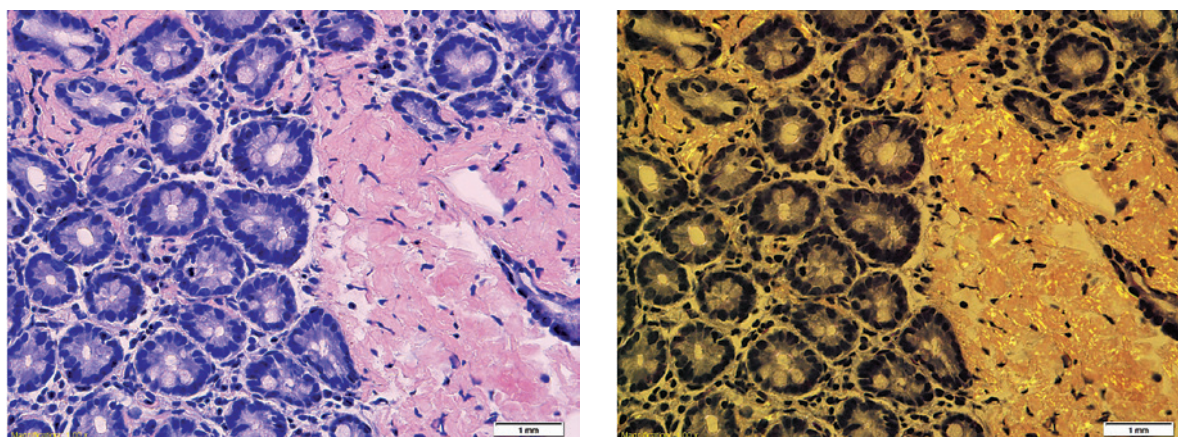


Рис. 1. AL-амилоидоз у женщины, 44 года, эндоскопическая картина:

А — на слизистой оболочке пищевода определяются единичные, красного цвета, плоские, с четкими границами пятна с гладкой поверхностью, размером 2–4 мм; при осмотре в режиме LCI с использованием ZOOM создается впечатление о подслизистом расположении данных элементов;

Б, В — слизистая оболочка в теле и антральном отделе контактно-ранимая, с множественными фиксированными сгустками небольшого размера, черного цвета, а также геморрагическими эрозиями, преимущественно в теле желудка; при осмотре в режимах LCI, BLI, ZOOM слизистая представлена очагами атрофии и гиперплазии, с признаками кишечной метаплазии; рельеф слизистой не соответствует желудочному, асимметричен, определяются расширенные капилляры; обращает на себя внимание выраженная контактная ранимость;

Г — луковица двенадцатиперстной кишки очагово гиперемирована, контактно-ранимая, рисунок рельефа асимметричен



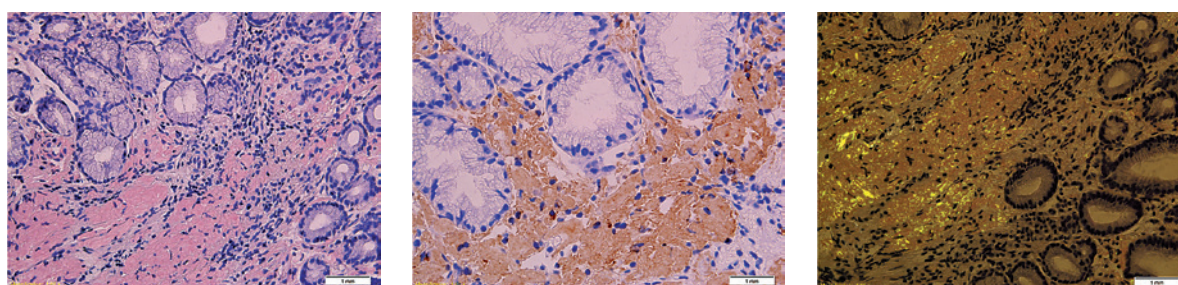
А

Б

Рис. 2. AL-амилоидоз двенадцатиперстной кишки у женщины, 44 года, гистологическое исследование:

А — амилоид в собственной пластинке двенадцатиперстной кишки, окраска — гематоксилин-эозин, увеличение $\times 600$;

Б — исследование в поляризованном свете, окраска конго красным, увеличение $\times 600$



А

Б

В

Рис. 3. AL-амилоидоз желудка у женщины, 44 года, гистологическое исследование:

А — амилоид в интерстиции собственной пластинки слизистой оболочки желудка, окраска — гематоксилин-эозин, увеличение $\times 600$;

Б — окрашивание конго красным, увеличение $\times 600$;

В — исследование в поляризованном свете, окраска конго красным, увеличение $\times 600$



А

Б

В

Рис. 4. AL-амилоидоз желудка у женщины, 55 лет, эндоскопическая картина:

А — в теле и антральном отделе на фоне атрофии определяются участки яркой гиперемии;

Б — в области дна желудка определяется контактно-ранимый участок измененной слизистой с бесструктурными очагами;

В — в режиме узкого спектра рисунок нерегулярный, местами отсутствует

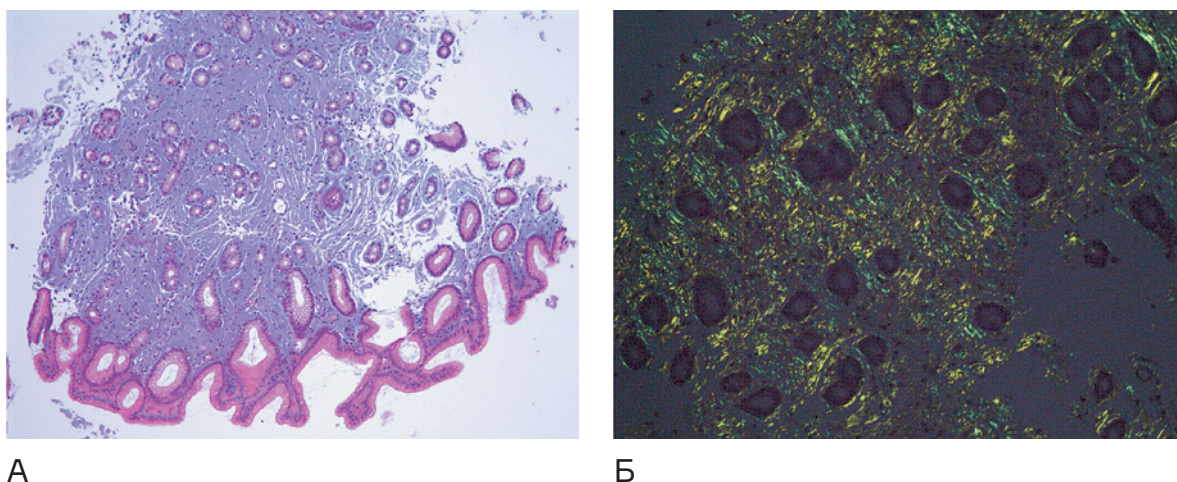


Рис. 5. AL-амилоидоз желудка у женщины, 55 лет, гистологическое исследование:

А — биоптат слизистой оболочки желудка с фиброзом собственной пластинки, окраска — гематоксилин-эозин, альциановый синий, увеличение $\times 100$;

Б — биоптат слизистой оболочки желудка, окраска — конго красный, увеличение $\times 200$, поляризационная микроскопия; отложения амилоида имеют яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете

Как показывают данные случаи, у одной из пациенток была явная симптоматика со стороны желудочно-кишечного тракта, что и помогло диагностировать амилоидоз. В случае другой пациентки жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта не наблюдалось, однако настороженность клиницистов и тщательный осмотр при эндоскопическом исследовании также помогли не пропустить данное заболевание.

ВЫВОДЫ

Амилоидоз — тяжелое системное заболевание, которое в ряде случаев поражает желудочно-кишечный тракт. Эндоскопическая картина амилоидоза желудочно-кишечного тракта малоспецифична и не имеет патогномоничных признаков. Данное заболевание имеет неблагоприятный прогноз, поэтому важна его ранняя диагностика. При эндоскопическом исследовании необходим тщательный осмотр слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта как в белом свете, так и с использованием дополнительных режимов (увеличение, узкоспектральный режим). При подозрении на амилоидоз желудочно-кишечного тракта необходим забор материала не только из подозрительных, но и из неизмененных участков. Учитывая наиболее частое обнаружение амилоидных отложений в двенадцатиперстной кишке и прямой кишке, рекомендован забор образцов слизистой оболочки именно из данных отделов.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan MF, Falk RH. Amyloidosis. *Postgrad Med J*. 2001;77(913):686–693. DOI: 10.1136/pmj.77.913.686.
2. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*. 2003;349(6):583–596. DOI: 10.1056/NEJMr023144.
3. Bansal R, Syed U, Walfish J, et al. A. Small bowel amyloidosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2018;20(3):11. DOI: 10.1007/s11894-018-0616-y.
4. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2019;25(4):215–219. DOI: 10.1080/13506129.2018.1549825.
5. Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal manifestations of amyloidosis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(3):776–787. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01669.x.
6. Shah KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med*. 2006;166(17):1805–1813. DOI: 10.1001/archinte.166.17.1805.
7. Sekijima Y. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Published Online First: [please include Day Month Year]. DOI: 10.1136/jnnp2014-308724.

8. Carlson HC, Breen JF. Amyloidosis and plasma cell dyscrasias: gastrointestinal involvement. *Semin Roentgenol.* 1986;21(2):128–138. DOI: 10.1016/0037-198x(86)90029-5.
9. Heitzman EJ, Heitzman GC, Elliott CF. Primary esophageal amyloidosis. Report of a case with bleeding, perforation, and survival following resection. *Arch Intern Med.* 1962;109:595–600. DOI: 10.1001/archinte.1962.03620170093015
10. Rubinow A, Burakoff R, Cohen AS, et al. Esophageal manometry in systemic amyloidosis. A study of 30 patients. *Am J Med.* 1983;75(6): 951–956. DOI: 10.1016/0002-9343(83)90874-4.
11. Suris X, Moya F, Panes J, et al. Achalasia of the esophagus in secondary amyloidosis. *Am J Gastroenterol.* 1993;88(11):1959–1960.
12. Iijima-Dohi N, Shinji A, Shimizu T, et al. Recurrent gastric hemorrhaging with large submucosal hematomas in a patient with primary al systemic amyloidosis: endoscopic and histopathological findings. *Intern Med.* 2004;43(6):468–472. DOI: 10.2169/internalmedicine.43.468.
13. Brown SJ, Shackleton M, Salem H, et al. Gastrocolic fistula complicating primary (AL) Amyloidosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(1):110–111. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2002.02655.x.
14. Gilat T, Spiro HM. Amyloidosis and the gut. *Am J Dig Dis.* 1968;13(7):619–633. DOI: 10.1007/bf02232969.
15. Vernon SE. Amyloid colitis. *Dis Colon Rectum.* 1982;25(7):728–730. DOI: 10.1007/bf02629550.
16. Chen J-H, Lai S-J, Tsai P-P, et al. Localized amyloidosis mimicking carcinoma of the colon. *AJR Am J Roentgenol.* 2002;179:536–537. DOI: 10.2214/ajr.179.2.1790536.
17. Rives S, Pera M, Rosiñol L, et al. Primary systemic amyloidosis presenting as a colonic stricture: successful treatment with left hemicolectomy followed by autologous hematopoietic stem-cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2002;45(9):1263–1266. DOI: 10.1007/s10350-004-6403-x.
18. Biggers JA, Remmers AR, Lindley JD, et al. Femoral neuropathy and ischemic colitis associated with amyloidosis in hemodialysis patients. *Ann Surg.* 1975;182(2):161–162. DOI: 10.1097/00000658-197508000-00014.
19. García-González R, Fernández FA, Garijo FM, et al. Amyloidosis of the rectum mimicking collagenous colitis. *Pathol Res Pract.* 1998;194(10):731–735. DOI: 10.1016/s0344-0338(98)80134-9.
20. Tada S, Iida M, Yao T, et al. Endoscopic features in amyloidosis of the small intestine: clinical and morphologic differences between chemical types of amyloid protein. *Gastrointest Endosc.* 1994;40(1):45–50. DOI: 10.1016/S0016-5107(94)70008-7.
21. Iida T, Yamano H, Nakase H. Systemic amyloidosis with gastrointestinal involvement: Diagnosis from endoscopic and histological views. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018;33(3):583–590. doi:10.1111/jgh.13996
22. Tada S, Iida M, Iwashita A, et al. Endoscopic and biopsy findings of the upper digestive tract in patients with amyloidosis. *Gastrointest Endosc.* 1990;36:10–14.
23. Freudenthaler S, Hegenbart U, Schönland S, et al. Amyloid in biopsies of the gastrointestinal tract – a retrospective observational study on 542 patients. *Virchows Arch.* 2016;468:569–577. Cowan AJ, Skinner M, Seldin DC, et al. Amyloidosis of the gastrointestinal tract: a 13-year, single-center, referral experience. *Haematologica.* 2013;98:141–146.
24. Ikegaya N, Kobayashi S, Hishida A, et al. Colonic dilatation due to dialysis – related amyloidosis. *Am J Kidney Dis.* 1995;25(5):807–809. DOI: 10.1016/0272-6386(95)90559-6.
25. Sanath Kumar S, Appavu SS, Abcarian H, et al. Amyloidosis of the colon. *Dis Colon Rectum.* 1983;26(8): 541–544. DOI: 10.1007/bf02563751.
26. Legge DA, Wollaeger EE, Carlson HC. Intestinal pseudo-obstruction in systemic amyloidosis. *Gut.* 1970;11(9):764–767. DOI: 10.1136/gut.11.9.764.
27. Fraser AG, Arthur JF, Hamilton I. Intestinal pseudoobstruction secondary to amyloidosis responsive to cisapride. *Digestive Diseases and Sciences.* 1991;36(4):532–535. DOI: 10.1007/bf01298889.
28. Hiramatsu K, Kaneko S, Shiota Y, et al. Digestive Diseases and Sciences. 1998;43(8):1824–1830. DOI: 10.1023/a:1018856324810.
29. Maeshima E, Yamada Y, Yukawa S. Massive gastrointestinal hemorrhage in a case of amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis: case report. *Scand J Rheumatol.* 1999;28(4):262–264. DOI: 10.1080/03009749950155670
30. Sánchez JAG, Molinero RM, Sayans JD, et al. Colonic perforation by amyloidosis. *Dis Colon Rectum.* 1989;32(5):437–440. DOI: 10.1007/bf02563700.
31. Alcalde-Vargas A, Leo-Carnerero E, Rojas-Mercedes N, et al. Correlation between location of amyloid deposits and endoscopic and clinical manifestations in symptomatic gastrointestinal amyloidosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(1):49–51.
32. Bansal R, Syed U, Walfish J, et al. Small Bowel Amyloidosis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2018;20(3):11. DOI: 10.1007/s11894-018-0616-y.
33. Hui YT, Lam TW, Yee Lam PW, et al. Narrow-band imaging system with magnifying endoscopy for rectal amyloidosis. *Gastrointestinal Endoscopy.* 2008;68(2):400–401. DOI: 10.1016/j.gie.2007.11.049.
34. Sattianayagam PT, Hawkins PN, Gillmore JD. Systemic amyloidosis and the gastrointestinal tract. *Nat*

Rev Gastroenterol Hepatol. 2009;6(10):608–617. DOI: 10.1038/nrgastro.2009.147.

35. Koh Y. AL amyloidosis: advances in diagnosis and management. Blood Res. 2020;55:S54-S57. DOI: 10.5045/br.2020.S009.

36. Lysenko (Kozlovskaya) LV, Rameev VV, Moiseev SV, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. Klinicheskaya farmakologiya i terapiya. 2020;29(1):13-24. DOI: 10.32756/0869-5490-2020-1-13-24. In Russian [Лысенко (Козловская) Л.В., Рамеев В.В., Моисеев С.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению системного амилоидоза. Клиническая фармакология и терапия. 2020;29(1):13-24. DOI: 10.32756/0869-5490-2020-1-13-24].

37. Kapoor M, Rossor AM, Laura M, et al. Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment of TTR Amyloidosis. J Neuromuscul Dis. 2019;6(2):189–199. DOI: 10.3233/jnd-180371.

Информация об авторах:

Солоницын Евгений Геннадьевич, к.м.н., заведующий эндоскопическим отделением; доцент кафедры хирургических болезней с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», заведующий НИЛ онкологических заболеваний пищеварительной системы НЦМУ «Персонализированная медицина»;

Алиева Юлия Шахиновна, врач-эндоскопист ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сейфединова Сабина Шерафединовна, младший научный сотрудник НИЛ онкологических заболеваний пищеварительной системы НЦМУ «Персонализированная медицина»;

Баранов Дмитрий Геннадьевич, врач-эндоскопист, врач-гастроэнтеролог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Митрофанова Любовь Борисовна, д.м.н., доцент, заведующая НИЛ патоморфологии, главный научный сотрудник НИЛ патоморфологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Грозов Роман Викторович, к.м.н., врач-патоморфолог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Перминова Анастасия Аркадьевна, врач-патоморфолог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

AMYLOIDOSIS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. CLINICAL CASES

**Solonitsyn E. G.^{1,2}, Alieva Iu. Sh.¹, Seyfedinova S. Sh.²,
Baranov D. G.¹, Mitrofanova L. B.¹, Grozov R. V.¹, Perminova A. A.¹**

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Alieva Iuliia Sh.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: alieva-yulia@list.ru

Received 06 October 2021; accepted 03
November 2021.

ABSTRACT

Amyloidosis is a group of diseases characterized by extracellular deposition of fibrillar protein (amyloid) in tissues and organs, consisting of β -sheet plates. The clinical manifestations and the endoscopic picture of amyloidosis are diverse and not very specific, which makes it difficult for specialists to make a diagnosis. The most common manifestations from the gastrointestinal tract are observed in AL-amyloidosis. The morphological diagnosis is made by detecting the characteristic apple-green birefringence in polarized light after staining with Congo red. This article presents clinical cases of diagnosis of amyloidosis of the gastrointestinal tract and modern literature data.

Key words: AA-amyloidosis, AL-amyloidosis, amyloid, amyloidosis, endoscopy.

For citation: Solonitsyn EG, Alieva IuSh, Seyfedinova SSh et al. Amyloidosis of the gastrointestinal tract. Clinical cases. Russian Journal for Personalized Medicine. 2021;1(1):237-253.

INTRODUCTION

Amyloidosis is a group of diseases characterized by extracellular deposition of fibrillar protein (amyloid) consisting of β -pleated sheets in tissues and organs [1]. The diagnosis is made when characteristic apple-green birefringence is detected in polarized light after the congo is stained red [2, 3]. According to the nomenclature adopted by the International Society of Amyloidosis, the first letter A stands for amyloid, and the following letters refer to the precursor protein: A (amyloid A-protein), L (immunoglobulin light chains), TTR (transstyretin), β 2M (β 2-microglobulin), B (B protein), IAPP (islet amyloid polypeptide), etc. [4].

Primary AL amyloidosis is the most common form with generalized deposition of excess light chains, is associated with plasma cell dyscrasia and has the maximum GIT lesion [5]. AL amyloidosis is caused by plasma cell dyscrasia, which may occur on its own or be associated with multiple myeloma [6].

Secondary AA amyloidosis is associated with infectious, inflammatory or less often neoplastic diseases. The mechanism of organ damage is that against the background of the inflammatory process, an increase in the acute phase protein (SAA) occurs, part of which is deposited in organs and tissues in the form of amyloid fibrils [5]. This pathology occurs in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome, psoriasis, progressive systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis, stromal tumors of the gastrointestinal tract and other diseases.

Familial amyloidosis (ATTR) has several subtypes. The most common hereditary autosomal dominant ATTR amyloidosis is due to mutations in the transstyretin molecule (which is produced in the liver) or age-related disorder of transstyretin tetramers secretion by the liver. In both cases, transstyretin tetramers break down to monomers with pronounced protein conformation instability [7].

CLINICAL MANIFESTATIONS

Damage from the gastrointestinal tract is more often manifested in AL amyloidosis. In the oral cavity, the most common manifestation is macroglossia, which can cause sleep apnea, speech disorders, oral dysphagia and chewing problems [8]. The main symptoms of the esophagus are: dysphagia, chest pain, heartburn and vomiting [9]. Manometric changes can also be observed in the esophagus, which are manifested mainly in AL amyloidosis. Low pressure in the lower esophageal sphincter and a decrease in the amplitude of contractions are determined, while the upper sphincter of the esophagus and pharynx work normally [10]. This

picture is observed with achalasia. Unlike idiopathic achalasia, patients develop symptoms quickly enough and lose weight drastically [11]. In patients with amyloidosis, gastric damage is manifested by nausea, vomiting, epigastric pain. Complications in the form of perforations, fistulas and bleeding are also possible [12, 13].

The greatest degree of amyloid deposition is observed in the small intestine, in intima and adventitia of blood vessels, thereby affecting the vascular network. When the wall of a vessel thickens, its lumen narrows down and eventually gets completely clogged and thrombosed, which leads to ischemia and heart attack [14]. Also, amyloid is deposited between the muscle fibers, causing atrophy of neighboring fibers due to compression, so that eventually the entire muscle layer is replaced by amyloid. Clinical manifestations in patients with small intestine amyloidosis include: diarrhea, steatorrhea, protein loss, bleeding, obstruction, perforation, invagination, pneumatosis, constipation, and pseudoobstruction [5].

Clinical manifestations of large intestine amyloidosis can mimic diseases such as inflammatory bowel disease [15], malignant neoplasms [16], ischemic colitis [17, 18] and collagen colitis [19].

DIAGNOSTICS

An important aspect in the diagnosis of amyloidosis of the gastrointestinal tract is the histological examination of biopsy species with the detection of the characteristic apple-green birefringence in the foci of the amyloid clusters when examined in polarized light. It should be noted that each particular amyloid protein has a predominant place of deposition in the gastrointestinal tract. AL amyloid, A β 2mg (β 2-microglobulin) and ATTR tend to be deposited in the submucosal layer, while AA amyloid tends to be deposited in the surface layers [20, 21]. The largest study to determine the most frequent localization of gastrointestinal lesions was conducted in 2016 by Freudenthaler et al. They analyzed 542 patients with amyloidosis and gastrointestinal lesions. As a result, it was revealed that the frequency of amyloid deposits during biopsy was 38% in the colon, 23% in the stomach, 17% in the rectum, 16% in the duodenum and 6% in the jejunum or ileum [21-23]. In another major retrospective study, Cowan et al. examined 2334 patients, in 76 (3.3%) patients biopsy diagnosed gastrointestinal tract lesions; amyloid fibrils were identified in 50% in the small intestine, 44% in the stomach and 32% in the large intestine [24]. After analyzing a number of studies reflecting the degree of amyloid deposition, it can be concluded that the small and large intestines may be a suitable place for endoscopic biopsy, as they are the most frequent local-

ization of amyloid deposits compared to other parts of the gastrointestinal tract.

Endoscopic manifestations of gastrointestinal amyloidosis are diverse and nonspecific. Erosions, ulcerations, mucosal granularity, polyps, thickening of the gastric folds, submucosal hematomas and petechial elements can be determined on the mucous membranes [5, 20]. Eventual complications may also include: colon dilation [25, 26], pseudo-obstruction [27–29], strictures, rectal bleeding [25–30], inversion [26] and perforation [31]. One of the retrospective surveys that studied the correlation between the location of amyloid deposits and its endoscopic appearance showed that patients with superficial endoscopic lesions usually have amyloid deposits in the lamina propria, while patients with granular or thickened mucosa during endoscopy have amyloid deposits in the submucosa [32, 33].

Iida et al. conducted a study assessing the differences in positive results of endoscopic biopsy in patients with systemic amyloidosis accompanied with gastrointestinal tract lesion; biopsy samples were taken both from altered areas of the mucous membrane, and from unaltered ones. The percentage of positive gastric biopsies was significantly higher in patients with endoscopic data than in patients without such results (80 vs. 44%), a similar trend was observed in the small intestine and large intestine. However, in the duodenum and rectum, there was no reliable difference in the percentage between patients (89 vs 90%) (Table 1) [21].

The diagnosis of amyloidosis of the large intestine uses high-resolution and narrow-spectrum endoscopy. Rectal amyloidosis is characterized by mucosal granularity and grayish-green nodules when using narrow-spectrum endoscopy, probably due to the deposition of amyloid protein in the lamina propria. This method can help distinguish rectal amyloid deposits from neoplastic lesions [34, 35].

TREATMENT

Currently, there are no generally accepted protocols for the treatment of gastrointestinal amyloidosis. Treatment depends on the causes, clinical manifestations and type of amyloid protein.

The therapy of AL amyloidosis is aimed at reducing the production of monoclonal immunoglobulin light chains by suppressing the proliferation of plasma cells. Combined regimens based on bortezomib, melphalan and dexamethasone are considered to be first-line therapy, especially in patients with a high risk of rapid progression. As remission is achieved in some patients, high-dose chemotherapy with autologous stem cell support is used, which allows for long-term remission. Strict selection of patients is necessary due to multiple contraindications [36].

Against the background of effective inflammation control, the production of the precursor protein is suppressed, which is the main goal for the treatment of AA amyloidosis. As a result, the production of serum amyloid protein A and the acute phase reaction decrease.

Biologics (including TNF inhibitors, interleukin-6, rituximab) and cytostatics play a key role in the treatment of major chronic inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriasis etc. Colchicine is the remedy of choice for the treatment of AA amyloidosis in recurrent illness and severe progressive gout. When used constantly, it is possible to completely stop the recurrence of seizures in most patients and slow down the development of amyloidosis in them; lifelong colchicine intake is possible [36, 37]. For the treatment of hereditary amyloidosis, it is necessary to eliminate the source of the genetically modified protein production. The liver produces most of the TTR protein circulating in the body. Orthotopic liver transplantation can be used to significantly reduce the production of pathogenic protein, since the diseased liver,

Table 1. Differences in the frequency of positive results in endoscopic biopsy of systemic amyloidosis with gastrointestinal lesion in patients with or without endoscopic data

Indicators	Stomach	Duodenum	Small intestine	Large intestine	Rectum
With endoscopic data	76,00 %	89,00 %	50,00 %	89,00 %	88,00 %
No endoscopic data	44,00 %	90,00 %	25,00 %	33,00 %	78,00 %
P-value	0.02	0.96	0.47	0.02	0.6

which secretes the mutated form of TTP, is replaced by the liver, which secretes normal protein [38].

PROGNOSIS

The prognosis depends on the type of amyloid, its etiology and the degree of organ damage. AL amyloidosis is associated with the most unfavorable outcomes. Typically, in patients with this type of amyloidosis the gastrointestinal tract is involved and they have a more severe course and a lower survival rate. In AA-amyloidosis, the level of acute-phase reactive protein amyloid A in the blood serum correlates with mortality. Although gastrointestinal complications may worsen the overall disease, they are not usually a cause of death [3].

CLINICAL OBSERVATIONS

In this report, we present two cases of gastrointestinal amyloidosis identified at the Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of Russia. The main purpose of the demonstration is to show the features of the endoscopic picture of gastrointestinal amyloidosis.

Patient J., 44 years old, was admitted to the clinic with complaints of abdominal pain, vomiting with blood streaks, and she also noted several episodes of vomiting “spent coffee grounds”. During an outpatient examination, gastrointestinal amyloidosis was suspected. Given the increase in symptoms, the appearance of

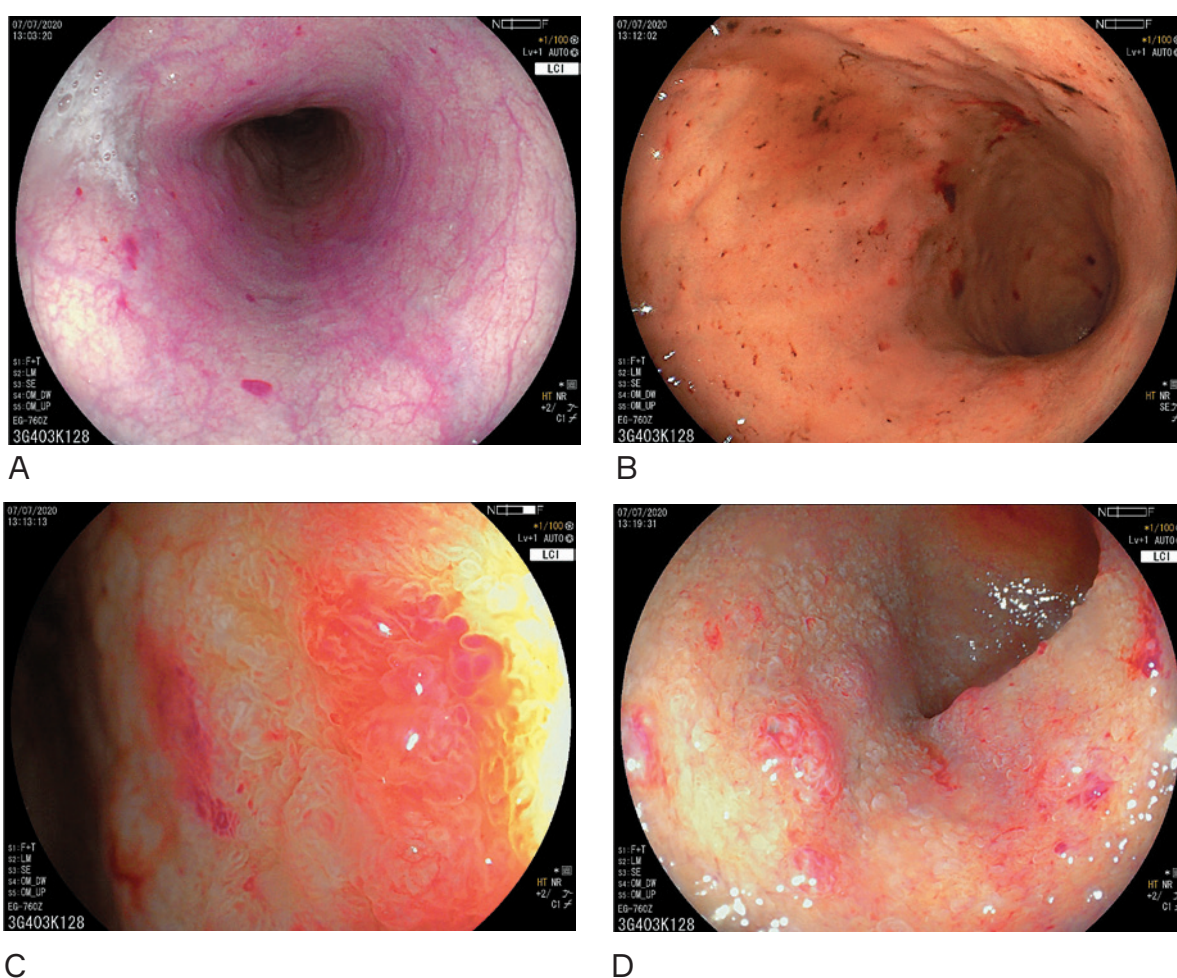


Fig. 1. AL amyloidosis in a woman, 44 years old, endoscopic picture:

A — single red flat spots with clear borders and a smooth surface, 2-4 mm in size are determined on the mucous membrane of the esophagus; when examined in LCI mode using ZOOM, the submucosal location of these elements is presumed;

B, C — the mucous membrane in the body and antrum is contact-vulnerable, with multiple fixed clots of small size, black color, as well as hemorrhagic erosions, mainly in the body of the stomach; when examined in LCI, BLI, ZOOM modes, the mucosa is represented by foci of atrophy and hyperplasia, with signs of intestinal metaplasia; the mucosa relief does not correspond to the gastric one, it is asymmetrical, capillary dilatation is determined; pronounced contact vulnerability is drawing attention;

D — the duodenal bulb is focally hyperemic, contact-vulnerable, the relief pattern is asymmetric

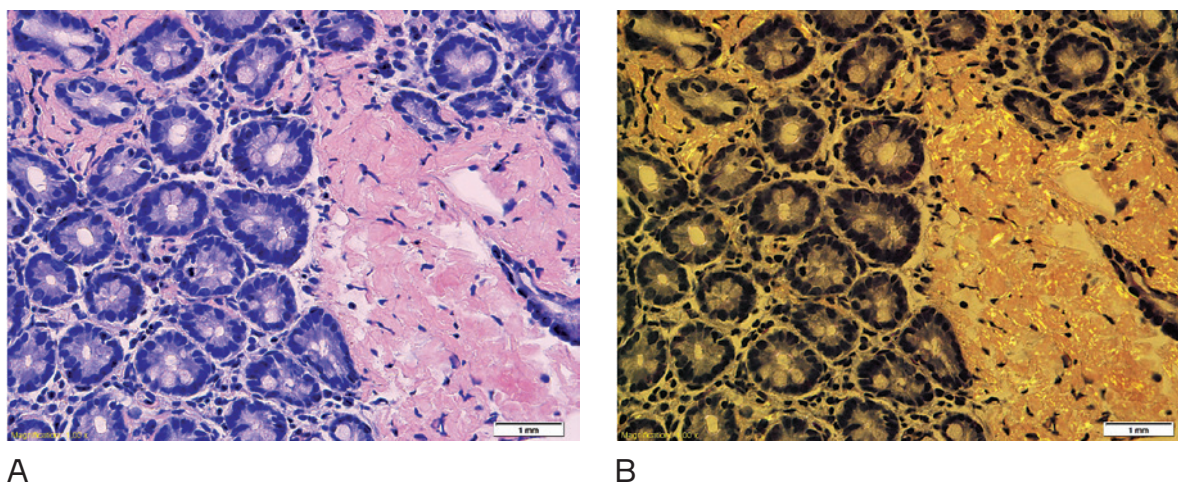


Figure 2. AL amyloidosis of the duodenum in a woman, 44 years old, histological examination:

A — amyloid in the lamina propria of the duodenum, color — hematoxylin-eosin, magnification $\times 600$;
B — polarized light study, staining with Congo red, magnification $\times 600$

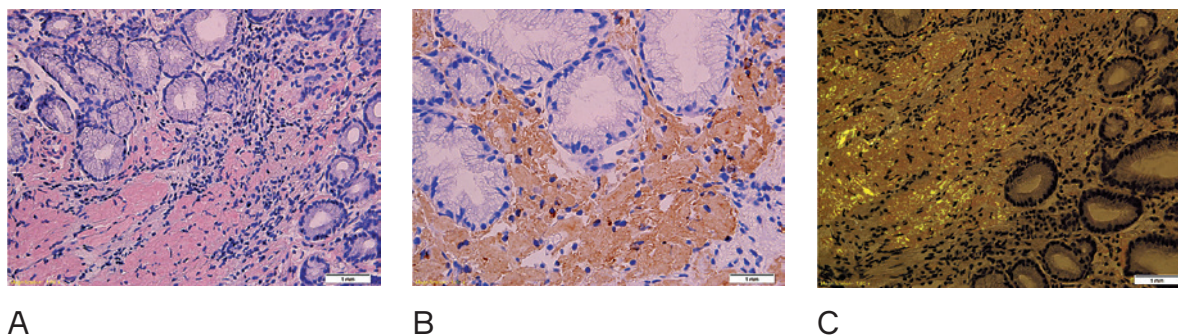


Figure 3. Gastric AL amyloidosis in a woman, 44 years old, histological examination:

A — amyloid in the interstitia of the lamina propria of the gastric mucosa, hematoxylin-eosin stain, magnification $\times 600$;
B — staining with Congo red, magnification $\times 600$;
C — polarized light study, staining with Congo red, magnification $\times 600$



Figure 4. Gastric AL amyloidosis in a woman, 55 years old, endoscopic picture:

A — in the body and antrum, areas of bright hyperemia are determined against the background of atrophy;
B — in the area of the fundus of the stomach, a contact-vulnerable area of the altered mucosa with structureless foci is determined;
C — in the narrow spectrum mode, the pattern is irregular, sometimes absent

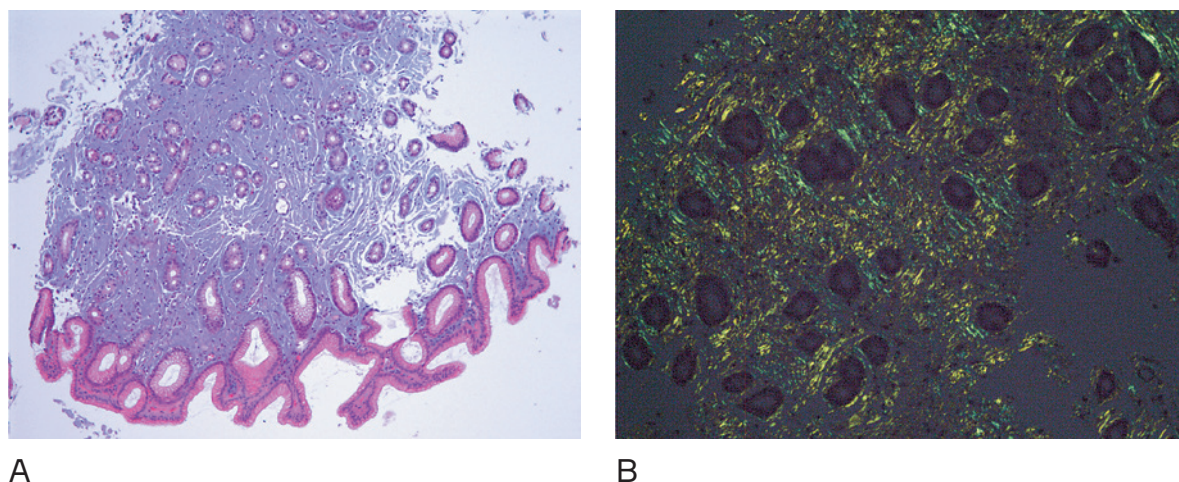


Figure 5. Gastric AL amyloidosis in a woman, 55 years old, histological examination:

A — biopsy of the gastric mucosa with fibrosis of the lamina propria, hematoxylin-eosin stain, alcian blue, magnification $\times 100$;

B — biopsy of the gastric mucosa, Congo red stain, magnification $\times 200$, polarization microscopy; amyloid deposits glow apple-green in polarized light

“anxiety symptoms” and the unverified diagnosis of amyloidosis, the patient with suspected monoclonal gammopathy was hospitalized in the clinic for additional examinations and determination of further treatment tactics. A laboratory and instrumental examination revealed systemic AL amyloidosis associated with multiple myeloma.

During endoscopic examination in the esophagus, single red flat spots with a smooth surface of 2–4 mm in size were determined on the mucous membrane. When viewed in LCI mode using ZOOM, the submucosal location of these elements was presumed. The stomach revealed pronounced contact vulnerability of the gastric mucosa, multiple fixed clots, hemorrhages, and erosions. In the duodenal bulb, the mucous membrane was contact-vulnerable, its relief pattern was asymmetrical. A multifocal biopsy was performed, which resulted in the detection of amyloid deposits (Figures 1–3).

Patient Zh., 55 years old, was admitted to the clinic with complaints of mammary gland formations. During an extensive laboratory and instrumental examination, the patient was diagnosed with Bence Jones myeloma with Carr light chain secretion, st. I A, ISS. A histological examination of a breast biopsy was performed, in which a diffuse massive deposition of amyloid was determined. A monoclonal component (Bence Jones protein) was detected in the urine, and the quantification of the light chains of kappa lambda in the urine showed secretion up to 6 mg/dL (above the reference values). MRI of the heart revealed a pathological accumulation of contrast agent in the myocardium of the left

ventricle, right ventricle and atria, which may be due to the manifestation of amyloidosis. The patient was assigned a screening endoscopic examination of the upper gastrointestinal tract to assess the mucosa. When examined in the area of the fundus of the stomach, an altered, contact-vulnerable mucosa with unstructured foci of red color was determined. Biopsy of the altered areas histologically revealed amyloid deposition with an apple-green glow when stained with Congo red (Figures 4, 5). During hospitalization, based on the data obtained, the diagnosis was made: Bence Jones myeloma with Carr light chain secretion, st. I A, ISS — 1 st. Primary systemic AL amyloidosis with damage to the heart, gastrointestinal tract and mammary glands.

As these cases show, one of the patients had obvious symptoms from the gastrointestinal tract, which helped diagnose amyloidosis. In the case of another patient, no gastrointestinal complaints were observed, but the vigilance of clinicians and a thorough examination during the endoscopic examination also helped not to miss this disease.

CONCLUSIONS

Amyloidosis is a severe systemic disease that in some cases affects the gastrointestinal tract. The endoscopic picture of the gastrointestinal amyloidosis is not very specific and has no pathognomonic signs. This disease has an unfavorable prognosis, so its early diagnosis is important. Endoscopic examination requires a thorough examination of the mucous membrane of the gastrointes-

tinal tract both in white light and using additional modes (enlargement, narrow-spectrum mode). If amyloidosis of the gastrointestinal tract is suspected, it is necessary to take material not only from the abnormal areas, but also from the unaltered ones. Taking into account the most frequent detection of amyloid deposits in the duodenum and rectum, it is recommended to take samples of the mucous membrane from these departments.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Khan MF, Falk RH. Amyloidosis. *Postgrad Med J*. 2001;77(913):686–693. DOI: 10.1136/pmj.77.913.686.
2. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*. 2003;349(6):583–596. DOI: 10.1056/NEJMr023144.
3. Bansal R, Syed U, Walfish J, et al. A. Small bowel amyloidosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2018;20(3):11. DOI: 10.1007/s11894-018-0616-y.
4. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2019;25(4):215–219. DOI: 10.1080/13506129.2018.1549825.
5. Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal manifestations of amyloidosis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(3):776–787. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01669.x.
6. Shah KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med*. 2006;166(17):1805–1813. DOI: 10.1001/archinte.166.17.1805.
7. Sekijima Y. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Published Online First: [please include Day Month Year]. DOI: 10.1136/jnnp2014-308724.
8. Carlson HC, Breen JF. Amyloidosis and plasma cell dyscrasias: gastrointestinal involvement. *Semin Roentgenol*. 1986;21(2):128–138. DOI: 10.1016/0037-198x(86)90029-5.
9. Heitzman EJ, Heitzman GC, Elliott CF. Primary esophageal amyloidosis. Report of a case with bleeding, perforation, and survival following resection. *Arch Intern Med*. 1962;109:595–600. DOI: 10.1001/archinte.1962.03620170093015
10. Rubinow A, Burakoff R, Cohen AS, et al. Esophageal manometry in systemic amyloidosis. A study of 30 patients. *Am J Med*. 1983;75(6): 951–956. DOI: 10.1016/0002-9343(83)90874-4.
11. Suris X, Moya F, Panes J, et al. Achalasia of the esophagus in secondary amyloidosis. *Am J Gastroenterol*. 1993;88(11):1959–1960.
12. Iijima-Dohi N, Shinji A, Shimizu T, et al. Recurrent gastric hemorrhaging with large submucosal hematomas in a patient with primary al systemic amyloidosis: endoscopic and histopathological findings. *Intern Med*. 2004;43(6):468–472. DOI: 10.2169/internalmedicine.43.468.
13. Brown SJ, Shackleton M, Salem H, et al. Gastrocolic fistula complicating primary (AL) Amyloidosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(1):110–111. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2002.02655.x.
14. Gilat T, Spiro HM. Amyloidosis and the gut. *Am J Dig Dis*. 1968;13(7):619–633. DOI: 10.1007/bf02232969.
15. Vernon SE. Amyloid colitis. *Dis Colon Rectum*. 1982;25(7):728–730. DOI: 10.1007/bf02629550.
16. Chen J-H, Lai S-J, Tsai P-P, et al. Localized amyloidosis mimicking carcinoma of the colon. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179:536–537. DOI: 10.2214/ajr.179.2.1790536.
17. Rives S, Pera M, Rosiñol L, et al. Primary systemic amyloidosis presenting as a colonic stricture: successful treatment with left hemicolectomy followed by autologous hematopoietic stem-cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2002;45(9):1263–1266. DOI: 10.1007/s10350-004-6403-x.
18. Biggers JA, Remmers AR, Lindley JD, et al. Femoral neuropathy and ischemic colitis associated with amyloidosis in hemodialysis patients. *Ann Surg*. 1975;182(2):161–162. DOI: 10.1097/00000658-197508000-00014.
19. García-González R, Fernández FA, Garijo FM, et al. Amyloidosis of the rectum mimicking collagenous colitis. *Pathol Res Pract*. 1998;194(10):731–735. DOI: 10.1016/s0344-0338(98)80134-9.
20. Tada S, Iida M, Yao T, et al. Endoscopic features in amyloidosis of the small intestine: clinical and morphologic differences between chemical types of amyloid protein. *Gastrointest Endosc*. 1994;40(1):45–50. DOI: 10.1016/S0016-5107(94)70008-7.
21. Iida T, Yamano H, Nakase H. Systemic amyloidosis with gastrointestinal involvement: Diagnosis from endoscopic and histological views. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(3):583–590. doi:10.1111/jgh.13996
22. Tada S, Iida M, Iwashita A, et al. Endoscopic and biopsy findings of the upper digestive tract in patients with amyloidosis. *Gastrointest Endosc*. 1990;36:10–14.
23. Freudenthaler S, Hegenbart U, Schönland S, et al. Amyloid in biopsies of the gastrointestinal tract – a retrospective observational study on 542 patients. *Virchows Arch*. 2016;468:569–577.
24. Cowan AJ, Skinner M, Seldin DC, et al. Amyloidosis of the gastrointestinal tract: a 13-year, single-center, referral experience. *Haematologica*. 2013;98:141–146.
25. Ikegaya N, Kobayashi S, Hishida A, et al. Colonic dilatation due to dialysis – related amyloidosis. *Am J*

Kidney Dis. 1995;25(5):807–809. DOI: 10.1016/0272-6386(95)90559-6.

25. Sanath Kumar S, Appavu SS, Abcarian H, et al. Amyloidosis of the colon. *Dis Colon Rectum*. 1983;26(8):541–544. DOI: 10.1007/bf02563751.

26. Legge DA, Wollaeger EE, Carlson HC. Intestinal pseudo-obstruction in systemic amyloidosis. *Gut*. 1970;11(9):764–767. DOI: 10.1136/gut.11.9.764.

27. Fraser AG, Arthur JF, Hamilton I. Intestinal pseudoobstruction secondary to amyloidosis responsive to cisapride. *Digestive Diseases and Sciences*. 1991;36(4):532–535. DOI: 10.1007/bf01298889.

28. Hiramatsu K, Kaneko S, Shiota Y, et al. *Digestive Diseases and Sciences*. 1998;43(8):1824–1830. DOI: 10.1023/a:1018856324810.

29. Maeshima E, Yamada Y, Yukawa S. Massive gastrointestinal hemorrhage in a case of amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis: case report. *Scand J Rheumatol*. 1999;28(4):262–264. DOI: 10.1080/03009749950155670

30. Sánchez JAG, Molinero RM, Sayans JD, et al. Colonic perforation by amyloidosis. *Dis Colon Rectum*. 1989;32(5):437–440. DOI: 10.1007/bf02563700.

31. Alcalde-Vargas A, Leo-Carnerero E, Rojas-Mercedes N, et al. Correlation between location of amyloid deposits and endoscopic and clinical manifestations in symptomatic gastrointestinal amyloidosis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2015;107(1):49–51.

32. Bansal R, Syed U, Walfish J, et al. Small Bowel Amyloidosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2018;20(3):11. DOI: 10.1007/s11894-018-0616-y.

33. Hui YT, Lam TW, Yee Lam PW, et al. Narrow-band imaging system with magnifying endoscopy for rectal amyloidosis. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2008;68(2):400–401. DOI: 10.1016/j.gie.2007.11.049.

34. Sattianayagam PT, Hawkins PN, Gillmore JD. Systemic amyloidosis and the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(10):608–617. DOI: 10.1038/nrgastro.2009.147.

35. Koh Y. AL amyloidosis: advances in diagnosis and management. *Blood Res*. 2020;55:S54–S57. DOI: 10.5045/br.2020.S009.

36. Lysenko (Kozlovskaya) LV, Rameev VV, Moiseev SV, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2020;29(1):13–24. DOI: 10.32756/0869-5490-2020-1-13-24. In Russian [Лысенко (Козловская) Л.В., Рамеев В.В., Моисеев С.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению системного амилоидоза. *Клиническая фармакология и терапия*. 2020;29(1):13–24. DOI: 10.32756/0869-5490-2020-1-13-24].

37. Kapoor M, Rossor AM, Laura M, et al. Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment of TTR

Amyloidosis. *J Neuromuscul Dis*. 2019;6(2):189–199. DOI: 10.3233/jnd-180371.

Author information:

Solonitsyn Evgeny G., PhD., Head of the Endoscopy Department, Associate Professor of the Department of Surgical Diseases with the Clinic of the Almazov National Medical Research Centre; Head of the Research Laboratory of Oncological Diseases of the Digestive System, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Alieva Iuliia Sh., Endoscopist of the Almazov National Medical Research Centre;

Seyfedinova Sabina Sh., Junior Researcher, Research Laboratory of Oncological Diseases of the Digestive System, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Baranov Dmitry G., Endoscopist, Gastroenterologist of the Almazov National Medical Research Centre;

Mitrofanova Lyubov B., MD, Dr.Sc., Pathomorphologist, Associate Professor, Head of the Research Laboratory of Pathomorphology, Chief Researcher of the Research Laboratory of Pathomorphology, Almazov National Medical Research Centre;

Grozov Roman V., PhD., Pathomorphologist of the Almazov National Medical Research Centre;

Perminova Anastasia A., Pathomorphologist of the Almazov National Medical Research Centre.

Сетевые решения для интеграции медицинского оборудования

- Оцифрованные, персонализированные данные пациента для машинной обработки, анализа, обучения и построения нейросетей
- Проектирование операционных и палат интенсивной терапии под ключ



1

Мониторинг BeneVision N19

Инновационный интерфейс пользователя с мультиоконным меню, инфографической индикацией тревог и интерактивным руководством пользователя.

4

Операционный стол HyBase 8300

Электрогидравлический операционный стол является универсальным решением для различных областей хирургии, позволяющим сократить больничные расходы на покупку дополнительного стола за счет использования специальных модулей и встроенной системы распознавания модулей.

2

Наркотно-дыхательный аппарат A7

Данная станция обеспечивает широкие функциональные возможности, удобство работы специалистов и сводит к минимуму риски осложнений после перенесенной анестезии у пациентов.

5

Потолочные консоли HyPort 3000

Благодаря большому набору специализированных принадлежностей удастся достичь удобного размещения оборудования в любом помещении. Потолочные консоли позволяют значительно упростить процесс организации рабочего пространства и саму работу специалистов.

3

Автоматическая система управления освещением HyLED 9

Купол светильника крестообразной формы обеспечивает равномерный световой поток и освещение операционного поля, создает минимальную турбулентность в ламинарном потоке. Встроенная камера высокой четкости с углом поворота 330°.

Характеристики и информация по медоборудованию доступна по QR-коду

