

Биомаркеры, ассоциированные с атерогенезом: актуальный статус и перспективные направления

Магрук М. А.¹, Мосикян А. А.^{1,2}, Бабенко А. Ю.²

Биомаркеры позволяют с помощью лабораторных методов диагностировать заболевания на ранних стадиях, подтверждать диагностические предположения или оценивать результаты лечения. Определение биомаркеров атерогенеза (БМА) основано на гипотезах развития атеросклероза. Формирование атеросклеротических бляшек связано с нарушением липидного обмена, воспалением, фиброзом, кальцинозом и оксидативным стрессом. Уровень холестерина низкой плотности является признанным БМА с точки зрения концепции нарушения липидного обмена. Другой концепцией атерогенеза является воспалительная теория. К настоящему времени изучено большое количество молекул, которые участвуют в воспалительном процессе при формировании атеросклеротических бляшек. Наибольшее распространение среди воспалительных БМА получил высокочувствительный С-реактивный белок. В последние годы все чаще обсуждают роль микро-РНК в качестве БМА. Молекулы микро-РНК имеют достаточно высокую стабильность и косвенно отражают уровень экспрессии генов, участвующих в развитии атеросклероза. Определение БМА, непосредственно участвующих в формировании бляшек, будет способствовать более точной диагностике и оценке существующей и потенциальной терапии атеросклероза.

Ключевые слова: биомаркеры, оксидативный стресс, атерогенез, фиброз, воспаление.

Финансирование. Настоящий анализ выполнен в рамках выполнения работ по гранту Российского научного фонда (проект № 17-75-30052) и софинансирования, предоставленного по данному проекту ООО «Герофарм».

¹ООО «ГЕРОФАРМ», Санкт-Петербург; ²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Магрук М. А. — медицинский научный советник, ORCID: 0000-0002-4395-6921, Мосикян А. А. — медицинский научный советник, м.н.с., ORCID: 0000-0002-2863-270X, ResearcherID: AAF-1008-2019, Бабенко А. Ю.* — д.м.н., г.н.с., руководитель НИЛ Диабетологии Института эндокринологии, профессор кафедры внутренних болезней Института Медицинского Образования, ORCID: 0000-0002-0559-697X, ResearcherID: Q-6714-2016.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
alina_babenko@mail.ru

БМА — биомаркер атерогенеза, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, не-ЛПВП — липопротеины, за исключением липопротеинов высокой плотности, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности, ЛППП — липопротеины промежуточной плотности, MMP — матриксные металлопротеиназы, миРНК — микро РНК, мРНК — матричная РНК, СД — сахарный диабет, СРБ — С-реактивный белок, ОхPL — окисленные фосфолипиды, TGFβ — трансформирующий фактор роста бета, AGE — конечные продукты гликирования, RAGE — рецептор конечных продуктов гликирования.

Рукопись получена 24.11.2019
Рецензия получена 02.12.2019
Принята к публикации 09.12.2019



Для цитирования: Магрук М. А., Мосикян А. А., Бабенко А. Ю. Биомаркеры, ассоциированные с атерогенезом: актуальный статус и перспективные направления. *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(12):148–152
doi:10.15829/1560-4071-2019-12-148-152

Biomarkers associated with atherogenesis: current status and promising areas

Magruk M. A.¹, Mosikyan A. A.^{1,2}, Babenko A. Yu.²

Biomarkers are used to diagnose diseases at an early stage, confirm diagnosis or assess treatment outcomes. The definition of biomarkers of atherogenesis (BMA) is based on atherosclerosis theories. The formation of atherosclerotic plaques is associated with lipid metabolism disorders, inflammation, fibrosis, calcification and oxidative stress. Low-density cholesterol is a recognized BMA in terms of the concept of lipid metabolism disorder. Another concept is that atherosclerotic plaques are inflammatory in nature. By now, a large number of molecules that are involved in the inflammatory process of plaque formation have been studied. The most common inflammatory BMA is highly sensitive C-reactive protein. In recent years, the role of micro-RNAs as BMA has been increasingly discussed. Micro-RNAs have a high molecular stability and indirectly reflect the expression level of atherosclerosis-related genes. The determination of BMA directly involved in the plaque formation will contribute to a more accurate diagnosis and assessment of current and prospective therapies for atherosclerosis.

Key words: biomarkers, oxidative stress, atherogenesis, fibrosis, inflammation.

Conflicts of Interest: nothing to declare.

Funding. This analysis was carried out as part of the Russian Science Foundation grant (project № 17-75-30052) and co-financing provided by ООО Geropharm.

¹ООО GEROFARM, St. Petersburg; ²Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia.

Magruk M. A. ORCID: 0000-0002-4395-6921, Mosikyan A. A. ORCID: 0000-0002-2863-270X, ResearcherID: AAF-1008-2019, Babenko A. Yu. ORCID: 0000-0002-0559-697X, ResearcherID: Q-6714-2016.

Received: 24.11.2019 **Revision Received:** 02.12.2019 **Accepted:** 09.12.2019

For citation: Magruk M. A., Mosikyan A. A., Babenko A. Yu. Biomarkers associated with atherogenesis: current status and promising areas. *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(12):148–152. (In Russ.)
doi:10.15829/1560-4071-2019-12-148-152

Биомаркеры играют важную роль как в рутинной клинической практике, так и в клинических исследованиях. В соответствии с определением Национального Института Здоровья США, под биомаркером следует понимать параметр, который может быть измерен и оценен объективными методами, и характеризует физиологические или патологические процессы либо ответ на терапевтическое воздействие [1].

Биомаркеры чаще всего используются для скрининга, диагностики или оценки ответа на лечение. В соответствии с этими целями выделяют три типа биомаркеров: скрининговые, диагностические и прогностические. Биомаркер кроме высокой чувствительности и специфичности должен также обладать оптимальным отношением правдоподобия, т.е. отношением вероятности положительного результата теста при наличии заболевания к вероятности положительного результата теста при отсутствии заболевания: >10 для скрининговых тестов и $<0,1$ для диагностических тестов [2]. Еще одной важной характеристикой любого биомаркера является возможность определения референтных интервалов.

Поиск биомаркеров осуществляют среди молекул, потенциально участвующих в патогенезе заболевания. Чем лучше изучены звенья патологического процесса, тем более точным и релевантным может быть биомаркер. В качестве биомаркеров — биологических молекул, как правило, выбирают растворимые молекулы, которые обладают достаточным уровнем стабильности.

Биомаркеры атеросклероза

В последние десятилетия произошли революционные изменения в области изучения биомаркеров атеросклеротического процесса, главная причина — появление современных концепций патогенеза атеросклероза, в основе которых лежит воспаление [3].

Биомаркеры липидного обмена. Роль повышенного уровня холестерина в патогенезе атеросклероза и важность коррекции гиперхолестеринемии была доказана в ряде наблюдательных и интервенционных исследований [4, 5]. Холестерин в комплексе с белками формирует липопротеины, которые можно разделить на несколько классов в зависимости от их плотности. Повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов, не относящихся к липопротеинам высокой плотности (не-ЛПВП), и снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), ассоциировано с увеличением риска сердечно-сосудистых событий. Снижение уровня ЛПНП способствует замедлению роста атеросклеротической бляшки, в связи с чем уровень этих липопротеинов в настоящее время рассматривается как прогностический биомаркер атерогенеза (БМА) [6, 7]. Целевые значе-

ния уровня холестерина ЛПНП определяются индивидуально для каждого пациента в зависимости от группы сердечно-сосудистого риска, к которой он относится. Прогностическая ценность уровня ЛПНП снижается у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Дислипидемия у пациентов с СД2 регистрируется в 30-60% случаев, однако повышенный уровень ЛПНП в этой популяции пациентов встречается значительно реже. Основной причиной низкой чувствительности ЛПНП у пациентов с СД2 считается характерный вид нарушения липидного обмена, при котором происходит значительное повышение уровней триглицеридов, холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов промежуточной плотности (ЛППП). Именно поэтому у пациентов с СД2 в качестве БМА наибольшее предпочтение следует отдавать уровням Апо В и холестерину не-ЛПВП [8].

Появление воспалительной теории атерогенеза, позволило создать новую концепцию атерогенеза, которая также смогла объяснить роль холестерина в данном процессе. В соответствии с этой концепцией, основной вклад в развитие атеросклероза вносит не столько общий уровень холестерина различных фракций липопротеинов, сколько содержание их модифицированных форм. К возможным модификациям липопротеинов относят окисление, гликирование, ассоциацию с протеогликанами и иммунными комплексами. Именно измененные липопротеины участвуют в повреждении сосудистой стенки и откладываются в ней в виде депозитов, формируя атеросклеротические бляшки [9]. В качестве БМА могут использоваться модифицированные липиды, например, окисленные фосфолипиды (ОхPL). Образование ОхPL происходит либо благодаря активности липооксигеназы, либо за счет реактивных форм кислорода. ОхPL способствуют инициации процесса перекисного окисления липидов. Окисленные липиды усиливают миграцию моноцитов в сосудистую стенку через активацию β_1 интегрина [10]. Уровень ОхPL можно оценить путем определения массы или активности фермента липопротеин-ассоциированной фосфолипазы A_2 (Lp-PLA₂), который участвует в их деактивации. Высокая активность данного фермента определяется у пациентов с первичной гиперхолестеринемией и относится к независимым факторам сердечно-сосудистого риска [11].

Биомаркеры воспаления. Другим важным подходом к определению БМА считается оценка активности воспалительного процесса. Биомаркеры воспаления известны давно и широко используются для оценки других воспалительных заболеваний. Например, уровень С-реактивного белка (СРБ) является одним из критериев диагностики ревматоидного артрита [12]. По результатам метаанализа, в который были включены свыше 160 тыс. пациентов с перио-

дом наблюдения около 1,6 млн пациенто-лет, была установлена корреляционная зависимость между повышенным уровнем СРБ и риском ишемической болезни сердца, а также сердечно-сосудистой смертностью [13].

Подтверждением роли биомаркеров воспаления в атерогенезе можно считать результаты исследования “Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study” (CANTOS), в котором принял участие 10061 пациент. В соответствии с дизайном исследования, в него включили пациентов с недавно перенесенным острым коронарным синдромом и уровнем высокочувствительного СРБ выше 2 мг/л. Пациенты в данном исследовании получали либо препарат канакинумаб, ингибитор интерлейкина 1-бета, в трех различных дозах, либо плацебо. В качестве первичной конечной точки использовали комбинированную точку, включающую не приводящий к смерти инфаркт миокарда, не приводящий к смерти инсульт и смерть от сердечно-сосудистых причин. По результатам исследования пациенты, получавшие канакикумаб в дозах 150 и 300 мг, реже достигали первичной конечной точки по сравнению с плацебо. При этом канакинумаб не оказывал влияния на уровень липидов, однако значительно снижал уровень СРБ. У пациентов, у которых на фоне терапии, уровень СРБ был <2 мг/л отмечалась значимо меньшая летальность (ОШ: 0,69; 95% ДИ: 0,58-0,81) [14].

Для высокочувствительного СРБ приняты интервалы значений, соответствующие риску сердечно-сосудистых событий: <1 мг/л — низкий риск, 1,0-3,0 мг/л — умеренный риск, >3 мг/л — высокий риск. В группе высокого риска относительный риск увеличен почти в два раза по сравнению с группой низкого риска [13]. Из-за высокой индивидуальной вариабельности рекомендуется оценивать среднее значение двух измерений: одно измерение выполняется натощак с одновременной оценкой липидограммы, второе измерение осуществляется через две недели после еды.

Следует отметить, что используемый в рутинной клинической практике лабораторный метод определения СРБ не является в достаточной мере чувствительным. Предел обнаружения СРБ у этого теста находится в диапазоне от 3 до 5 мг/л. В Российской Федерации методика определения высокочувствительного СРБ доступна лишь в некоторых лабораториях. Данный маркер обладает наибольшей стабильностью по сравнению с другими биомаркерами воспаления, что позволяет его использовать в лабораторной практике.

Биомаркеры фиброза. Фиброгенез относится к одному из процессов формирования атеросклеротической бляшки. Наиболее изученным биомаркером фиброза считается трансформирующий фактор роста бета (TGFB). Данный биомаркер можно также

рассматривать как БМА: увеличенный уровень TGFB ассоциирован с повышенным риском развития атеросклероза периферических артерий [15]. Однако широкое применение TGFB в качестве БМА ограничено низкой специфичностью. Несмотря на наличие трех изоформ TGFB, все они взаимодействуют с одним типом рецепторов и активируют идентичные сигнальные пути [16]. Таким образом, при развитии фиброза в печени или легких уровень TGFB может значительно повышаться при отсутствии связи с атерогенезом.

В фиброгенезе также принимают участие матриксные металлопротеиназы (ММП). Эти ферменты относятся к группе цинк-зависимых эндопептидаз, которые способны расщеплять такие компоненты межклеточного матрикса, как коллаген, желатин и эластин. ММП усиливают миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток в сосудистую стенку и приводят к реорганизации межклеточного матрикса. По сравнению со здоровыми добровольцами у пациентов с атеросклеротическим поражением сосудистой стенки отмечается повышенный уровень ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-7, ММП-9, ММП-10, ММП-11, ММП-12. Также ММП-1, ММП-8 и ММП-12 способствуют нестабильности атеросклеротической бляшки, вероятно, вследствие реорганизации ее структуры. Экспрессия ММП неоднородна: ММП-8 обнаруживается в нейтрофилах, ММП-9, ММП-10, ММП-11 и ММП-14 экспрессируются в области наибольшего содержания пенных клеток. Патогенетическая роль ММП была также подтверждена в *in vivo* исследованиях: процесс атеросклероза замедляется у нокаутных мышей по генам ММП-2 или ММП-8. В качестве БМА могут использоваться ММП-1, ММП-2, ММП-8, ММП-9, ММП-12 [17]. По результатам исследования “Surrogate Markers for Micro- and Macrovascular Hard End Points for Innovative Diabetes Tools” (SUMMIT) активность таких ММП, как ММП-7 и ММП-12 была повышена у субъектов с СД2 и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Кроме того, высокий уровень ММП-10 и ММП-12 был ассоциирован с повышенной жесткостью сосудистой стенки [18].

Биомаркеры кальцификации. Атеросклеротические бляшки в процессе их формирования часто подвергаются кальцификации. Процесс кальцификации во многом схож с процессом минерализацией костной ткани. Неоднородная кальцификация способствует механической дестабилизации бляшки и может провоцировать ее разрыв. Значительный вклад в процесс кальцификации вносит фермент метаболизма окисленных липидов Lp-PLA₂. Роль данного БМА была доказана в исследовании с участием 1097 пациентов, у большинства из которых был установлен диагноз СД 1 типа. У всех пациентов оценивали активность и массу фермента Lp-PLA₂, степень каль-

цификации определяли с помощью компьютерной томографии. Период наблюдения за участниками исследования составил $2,6 \pm 0,3$ лет. Было установлено, что активность Lp-PLA₂ является независимым фактором риска кальцификации коронарных артерий: ОШ=1,77 (1,08-2,91), при этом масса Lp-PLA₂ не оказывала значимого влияния на кальцификацию коронарного русла [19].

Биомаркеры оксидативного стресса. Одной из непосредственных причин воспаления можно считать AGE-RAGE сигнальный путь. Активация данного сигнального пути происходит за счет взаимодействия конечных продуктов гликирования (AGE) с соответствующим рецептором (RAGE). Конечные продукты гликирования — это молекулы, подвергшиеся ферментативной модификации в ходе реакции Майяра. При активации RAGE усиливается синтез провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и увеличивается уровень оксидативного стресса.

RAGE присутствует в организме в виде нескольких изоформ: связанный с клеточной мембраной N-RAGE и C-RAGE, растворимый в плазме sRAGE. Одна из функций sRAGE — защита RAGE, связанных с мембраной, от избыточной активации. Такой эффект достигается посредством связывания sRAGE с циркулирующими AGE, так называемый механизм ловушки лиганда.

У пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов отмечается повышенное потребление sRAGE, в результате чего снижается концентрация sRAGE в плазме крови. В соответствии с этой теорией, sRAGE стали использовать в качестве биомаркера атеросклеротического поражения, однако впоследствии были получены неоднозначные результаты: в одних работах, действительно, наблюдалась корреляционная зависимость между сниженным уровнем sRAGE и риском сердечно-сосудистых заболеваний, в других, наоборот, сердечно-сосудистые события были ассоциированы с повышенным уровнем sRAGE. Таким образом, релевантность биомаркера sRAGE оказалась под вопросом.

Дополнительные исследования помогли разобраться в проблеме: у пациентов с хронической болезнью почек и СД наблюдается повышенная экспрессия sRAGE. При этом у данных групп пациентов повышенный уровень sRAGE не оказывает защитных свойств, что связано с соответствующим увеличением количества AGE. Например, у пациентов с СД увеличение AGE связано с гипергликемией. Таким образом, по причине высокой гетерогенности популяции вместо sRAGE в качестве биомаркера стали использовать соотношение AGE/sRAGE [20]. Увеличенное соотношение AGE/sRAGE наблюдается у пациентов с инфарктом миокарда, гиперхолестеринемией, аортальными аневризмами. Например,

у пациентов с инфарктом миокарда соотношение AGE/sRAGE выше на 218%, чем в контрольной группе [21]. Данный БМА обладает высокой чувствительностью и специфичностью у пациентов с СД, однако определение референтных интервалов требует проведения дополнительных исследований.

Перспективные БМА

Наиболее перспективным направлением в поиске биомаркеров стало исследование микро РНК (миРНК). Впервые миРНК были открыты в 1993г. Молекула миРНК состоит примерно из 22 нуклеотидов и способна связываться с 3' нетранслируемой областью матричной РНК (мРНК). В результате взаимодействия миРНК с мРНК может происходить либо ингибирование процессов трансляции, либо усиление деградации целевой мРНК. Некоторые миРНК играют роль в развитии атеросклеротического поражения сосудов. У пациентов с ангиографически подтвержденной ишемической болезнью сердца значительно снижена концентрация миРНК-17, миРНК-92а, миРНК-126, миРНК-145, миРНК-155 по сравнению со здоровыми добровольцами [22].

Одной из миРНК, играющих ключевую роль в развитии атеросклеротического поражения, считается миРНК-21. Данная молекула имеет высококонсервативную последовательность для большинства позвоночных. При возникновении сердечно-сосудистых заболеваний отмечается аномальная экспрессия данной миРНК. В *in vivo* исследованиях было установлено, что миРНК-21 подавляет экспрессию генов *PDCD4* и *PTEN*. Уменьшение экспрессии генов *PDCD4* и *PTEN* приводит к усиленной пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки [23].

Заключение

Биомаркеры — важный инструмент в арсенале практикующего врача. К настоящему моменту идентифицировано множество биомаркеров атеросклеротического процесса, детально изучена их роль в процессе атерогенеза. Врачи все чаще используют высокочувствительный СРБ для оценки сердечно-сосудистых рисков. Этот маркер довольно стабилен, обладает хорошей прогностической ценностью, а также имеет валидированные референтные значения. Применение этого биомаркера позволяет проводить быстрый и эффективный скрининг с помощью лабораторного метода диагностики. В совокупности с оценкой концентрации липидов, высокочувствительный СРБ способен довольно точно оценивать степень риска сердечно-сосудистых осложнений. Кроме того, он также может использоваться для оценки эффективности лечения. Другие биомаркеры в настоящее время используются как правило в научно-исследовательских целях, доказательств целесообразности их применения в рутинной клини-

ческой практике на текущий момент недостаточно. Актуальность их применения может возрасти при появлении новых подходов к лечению.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989.
2. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ.* 2004 Jul 17;329(7458):168-9. doi:10.1136/bmj.329.7458.168.
3. Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, et al. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Oct 23;72(17):2071-81. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1043.
4. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, et al. The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. *Lancet.* 2014 Mar 15;383(9921):999-1008. doi:10.1016/S0140-6736(13)61752-3.
5. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2459-72. doi:10.1093/eurheartj/ehx144.
6. Bonaca MP, Nault P, Giugliano RP, et al. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering With Evolocumab and Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease: Insights From the FOURIER Trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation.* 2018 Jan 23;137(4):338-50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032235.
7. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal.* (2019);00:1-78. doi:10.1093/eurheartj/ehz455.
8. Taskinen MR, Boren J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2015;239(2):483-95. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.039.
9. Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascu Pharmacol.* 2016 Sep;84:1-7. doi:10.1016/j.vph.2016.05.013.
10. Valk FM, Bekkering S, Kroon J, et al. Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation.* 2016 Aug 23;134(8):611-24. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.020838.
11. Tselepis AD. Oxidized phospholipids and lipoprotein-associated phospholipase A2 as important determinants of Lp(a) functionality and pathophysiological role. *J Biomed Res.* 2018 Jan 26;32(1):13-22. doi:10.7555/JBR.31.20160009.
12. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569-81.
13. Ridker PM. A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Feb 16;67(6):712-23. doi:10.1016/j.jacc.2015.11.037.
14. Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet.* 2018 Jan 27;391(10118):319-28. doi:10.1016/S0140-6736(17)32814-3.
15. Agarwal I, Arnold A, Glazer NL, et al. Fibrosis-related biomarkers and large and small vessel disease: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis.* 2015 Apr;239(2):539-46. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.020.
16. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011 Oct;29(5):196-202. doi:10.3109/08977194.2011.595714.
17. Ketelhuth DFJ, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2011 Apr;13(2):162-9. doi:10.1007/s11883-010-0159-7.
18. Goncalves I, Bengtsson E, Colhoun HM, et al. Elevated plasma levels of MMP-12 are associated with atherosclerotic burden and symptomatic cardiovascular disease in subjects with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jul;35(7):1723-31. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305631.
19. Kinney GL, Snell-Bergeon JK, Maahs DM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A activity predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis. *Diabetes Technol Ther.* 2011 Mar;13(3):381-7. doi:10.1089/dia.2010.0175.
20. Prasad K, Dhar I, Zhou Q, et al. AGEs/sRAGE, a novel risk factor in the pathogenesis of end-stage renal disease. *Mol Cell Biochem.* 2016 Dec;423(1-2):105-14. doi:10.1007/s11010-016-2829-4.
21. Prasad K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem.* 2019 Jan;451(1-2):139-44. doi:10.1007/s11010-018-3400-2.
22. Szelenberger R, Kacprzak M, Saluk-Bijak J, et al. Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clin Chim Acta.* 2019 Sep 6;499:98-107. doi:10.1016/j.cca.2019.09.005.
23. Cheng Y, Zhang Ch. MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease. *J of Cardiovasc. Trans. Res.* (2010) 3:251-5. doi:10.1007/s12265-010-9169-7.