

## Биохимические маркеры коронарного атеросклероза: построение моделей и оценка их прогностической значимости для верификации выраженности поражения

Жаткина М. В.<sup>1</sup>, Метельская В. А.<sup>1</sup>, Гаврилова Н. Е.<sup>2</sup>, Яровая Е. Б.<sup>1,3</sup>, Макарова Ю. К.<sup>1</sup>, Литинская О. А.<sup>1</sup>, Богданова Н. Л.<sup>1</sup>, Руденко Б. А.<sup>1</sup>, Драпкина О. М.<sup>1</sup>

**Цель.** Оценить индивидуальную и комплексную прогностическую значимость различных биохимических показателей крови (биомаркеров) в неинвазивной диагностике атеросклероза коронарных артерий (КА).

**Материал и методы.** В исследование были включены 216 пациентов: 115 мужчин и 101 женщина в возрасте от 24 до 87 лет (средний возраст 61,5±10,7 лет), которым по показаниям была проведена коронарная ангиография. Всем пациентам было выполнено биохимическое исследование крови с определением показателей липидного, углеводного и азотного обмена, системы гемостаза, маркеров воспаления, а также уровня креатинина как показателя функциональной активности почек.

**Результаты.** На основании проведенного анализа выявлены биомаркеры, отклонения в уровне которых вносят вклад в диагностику и определение степени выраженности коронарного поражения. К этим биомаркерам относятся: глюкоза, креатинин, высокочувствительный С-реактивный белок и адипонектин. С использованием указанных биохимических параметров построена многофакторная модель (M<sub>БХ</sub>), которая оказалась статистически значимой для диагностики атеросклероза КА и определения его выраженности. С помощью ROC-анализа найдена отрезная точка M<sub>БХ</sub>, которая составила 2 балла. Значения M<sub>БХ</sub> >2 баллов с чувствительностью 72% свидетельствуют о наличии атеросклероза КА любой степени выраженности и со специфичностью 62,5% позволяют его исключить. С использованием данных M<sub>БХ</sub> и отрезной точки 2 балла была построена модель бинарной логистической регрессии, согласно которой при значении M<sub>БХ</sub> >2 баллов шанс выявления атеросклероза КА любой степени выше в 2,1 раза (95% доверительный интервал (ДИ) 1,2-3,8; p=0,010), выраженного — в 4,7 раза (95% ДИ 1,9-12,0; p=0,001) по сравнению с лицами с M<sub>БХ</sub> ≤2 баллов, у которых в 2,8 раза (95% ДИ 1,4-4,9; p=0,002) выше шанс выявления интактных КА.

**Заключение.** Таким образом, суммарный балл M<sub>БХ</sub> 0-2 балла свидетельствует об отсутствии коронарного атеросклероза, 3-4 балла — о наличии атеросклероза КА любой степени выраженности.

**Ключевые слова:** атеросклероз, биохимические показатели, биохимические модели, коронарные артерии, факторы риска.

**Отношения и деятельность:** нет.

<sup>1</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины Минздрава России, Москва; <sup>2</sup>ООО Клиника персонализированной медицины "Бутик здоровья", Москва; <sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

Жаткина М. В.\* — врач-кардиолог отделения для пациентов с острым инфарктом миокарда ГКБ № 15 им. О. М. Филатова; соискатель "НМИЦ ТПМ"

Минздрава России, ORCID: 0000-0001-9991-1063, Метельская В. А. — д.б.н., профессор, г.н.с., руководитель отдела биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0001-8665-9129, Гаврилова Н. Е. — д.м.н., главный врач, ORCID: 0000-0001-8963-5325, Яровая Е. Б. — д.ф.-м.н., профессор, руководитель лаборатории биостатистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-6615-4315, Макарова Ю. К. — лаборант лаборатории биостатистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-0443-8929, Литинская О. А. — к.м.н., зав. клинико-диагностической лабораторией, ORCID: 0000-0002-0003-2681, Богданова Н. Л. — м.н.с. отдела изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-3124-5655, Руденко Б. А. — д.м.н., руководитель отдела инновационных методов профилактики, диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и других хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-5475-0048, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): mvzhatkina@gmail.com, jatkina-marija@rambler

апо — аполипротеин, вЧСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок, КА — коронарные артерии, КАГ — коронарная ангиография, ЛВП — липопротеины высокой плотности, ЛНП — липопротеины низкой плотности, Лп(а) — липопротеин(а), M<sub>БХ</sub> — биохимическая модель, МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография, СКФ — скорость клубочковой фильтрации, СРБ — С-реактивный белок, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ССР — сердечно-сосудистый риск, ТГ — триглицериды, ФР — факторы риска, ФГ — фибриноген, ХС — холестерин, ЭКГ — электрокардиография, i-BIO — интегрированный биомаркер, NO<sub>x</sub> — метаболиты оксида азота.

Рукопись получена 31.05.2021

Рецензия получена 17.06.2021

Принята к публикации 25.06.2021



**Для цитирования:** Жаткина М. В., Метельская В. А., Гаврилова Н. Е., Яровая Е. Б., Макарова Ю. К., Литинская О. А., Богданова Н. Л., Руденко Б. А., Драпкина О. М. Биохимические маркеры коронарного атеросклероза: построение моделей и оценка их прогностической значимости для верификации выраженности поражения. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(6):4559. doi:10.15829/1560-4071-2021-4559

## Biochemical markers of coronary atherosclerosis: building models and assessing their prognostic value regarding the lesion severity

Zhatkina M. V.<sup>1</sup>, Metelskaya V. A.<sup>1</sup>, Gavrilova N. E.<sup>2</sup>, Yarovaya E. B.<sup>1,3</sup>, Makarova Yu. K.<sup>1</sup>, Litinskaya O. A.<sup>1</sup>, Bogdanova N. L.<sup>1</sup>, Rudenko B. A.<sup>1</sup>, Drapkina O. M.<sup>1</sup>

**Aim.** To assess the individual and complex prognostic value of various blood biochemical parameters (biomarkers) in the non-invasive diagnosis of coronary artery (CA) atherosclerosis.

**Material and methods.** The study included 216 patients (men, 115; women, 101) aged 24 to 87 years (mean age, 61,5±10,7 years), who underwent indicated coronary angiography. All patients underwent a biochemical blood tests to determine the

parameters of lipid, carbohydrate and nitrogen metabolism, the hemostatic system, inflammatory markers, as well as the creatinine level as an indicator of renal function.

**Results.** Analysis revealed biomarkers, the deviations in the level of which contribute to the diagnosis and determination of the coronary involvement. These biomarkers include glucose, creatinine, C-reactive protein, and adiponectin. Using these biochemical parameters, a multivariate model (MVM) was constructed, which

was significant for the diagnosis of coronary atherosclerosis and determination of its severity. With the help of ROC-analysis, the cutoff point of MVM of 2 was found. MVM >2 with a sensitivity of 72% indicate CA atherosclerosis of any severity, as well as with a specificity of 62,5%, it can be ruled out. Using MVM data and a cutoff point of 2, a binary logistic regression model was built, according to which, with a MVM >2, the odds for detecting CA atherosclerosis of any degree is 2,1 times higher (95% confidence interval (CI), 1,2-3,8; p=0,010), severe CA — 4,7 times (95% CI, 1,9-12,0; p=0,001) compared with individuals with MVM ≤2, who have 2,8 times (95% CI, 1,4-4,9; p=0,002) a higher chance of detecting intact CAs.

**Conclusion.** Thus, the total MVM score of 0-2 indicates the absence of coronary atherosclerosis, while 3-4 points –CA atherosclerosis of any severity.

**Keywords:** atherosclerosis, biochemical parameters, biochemical models, coronary arteries, risk factors.

**Relationships and Activities:** none.

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, Moscow;

<sup>2</sup>LLC Clinic of personalized medicine "Butik zdorov'ya", Moscow; <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

Атеросклероз коронарных артерий (КА) является патоморфологической основой ишемической болезни сердца, распространенность и смертность от осложнений которой остаются высокими как в России, так и во всем мире [1]. Одной из причин этого является поздняя диагностика заболевания, поэтому поиск маркеров ранней стадии атеросклероза КА остаётся актуальным направлением современной кардиологии.

Нарушения в работе ряда биологических систем организма человека (липид-транспортной, углеводной, системы гемостаза), хроническое воспаление и сопряженные с ними изменения соответствующих биохимических показателей крови являются стимулом для активного поиска и изучения биохимических маркеров (биомаркеров) ранних стадий атерогенеза. Давно отмечено, что анализ биохимических показателей крови в качестве критериев, отражающих различные патофизиологические пути, которые вовлечены в атерогенез, позволяет улучшить прогнозирование сердечно-сосудистого риска (ССР) [2].

В многочисленных исследованиях рассматривались различные биохимические показатели крови, позволяющие оценивать связь изменений их содержания в крови как с атеросклерозом в целом, так и конкретно с атеросклерозом КА [3, 4]. Долгое время среди биохимических параметров основными маркерами атеросклероза считались показатели липидного обмена [5]. Однако сердечно-сосудистые осложнения атеросклеротического генеза развиваются и при нормолипидемии [6], поэтому в настоящее время внимание исследователей привлекают и другие биохимические показатели крови, отражающие связь их отклонений от нормы, которые ассоциируются с атеросклерозом. Более того, в связи с широким применением статинов и других групп гиполипидемических препаратов, интерпретация результатов липидного обмена в отсутствие воздействия на липид-транспортную систему затруднена.

Zhatkina M.V.\* ORCID: 0000-0001-9991-1063, Metelskaya V.A. ORCID: 0000-0001-8665-9129, Gavrilova N.E. ORCID: 0000-0001-8963-5325, Yarovaya E.B. ORCID: 0000-0002-6615-4315, Makarova Yu. K. ORCID: 0000-0002-0443-8929, Litinskaya O.A. ORCID: 0000-0002-0003-2681, Bogdanova N.L. ORCID: 0000-0002-3124-5655, Rudenko B.A. ORCID: 0000-0002-5475-0048, Drapkina O.M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

\*Corresponding author: mvzhatkina@gmail.com,

zhatkina-marija@rambler

**Received:** 31.05.2021 **Revision Received:** 17.06.2021 **Accepted:** 25.06.2021

**For citation:** Zhatkina M.V., Metelskaya V.A., Gavrilova N.E., Yarovaya E.B., Makarova Yu. K., Litinskaya O.A., Bogdanova N.L., Rudenko B.A., Drapkina O.M. Biochemical markers of coronary atherosclerosis: building models and assessing their prognostic value regarding the lesion severity. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(6):4559. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2021-4559

Необходимо отметить, что вклад большинства биомаркеров крови для прогнозирования атеросклероза изучали отдельно для каждого показателя. Вместе с тем, имеются данные, что использование их комбинации может повысить прогностическую ценность в выявлении атеросклероза и улучшить стратификацию ССР [7, 8]. В литературе представлены результаты нескольких исследований, объединявших визуальные и циркулирующие маркеры или включавших использование циркулирующих, генетических и/или визуальных маркеров (Framingham Heart Study, Malmö Diet and Cancer Study, MORGAN, Cardiovascular Health Study) [8-10]. Ранее нами был проведен анализ математических моделей, включающих различные комбинации биохимических показателей крови друг с другом, а также с визуальными параметрами атеросклеротических бляшек, полученных при дуплексном сканировании сонных артерий, и факторами риска (ФР) сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [11]. На основании изучения широкого спектра биохимических показателей крови и визуальных маркеров, анализа их различных комбинаций был разработан новый показатель, названный интегрированным биомаркером (i-BIO), который предназначен для оценки суммарного вклада комплекса биохимических и клинико-инструментальных маркеров в определение наличия и выраженности атеросклероза КА. Из биохимических показателей крови в i-BIO вошли уровни триглицеридов (ТГ), глюкозы, фибриногена (ФГ), С-реактивного белка (СРБ), определенного высокочувствительным методом (вЧСРБ), и адипонектина. Совокупность вошедших в i-BIO биомаркеров позволяла значимо диагностировать наличие выраженного атеросклероза КА, однако прогностическая ценность i-BIO для диагностики субклинического поражения оказалась менее значимой [11].

Цель настоящего исследования — оценить индивидуальную и комплексную прогностическую значи-

мость различных биомаркеров в неинвазивной диагностике атеросклероза КА.

### Материал и методы

Проанализирована когорта пациентов, поступивших и обследованных в стационаре ФГБУ “ГНИЦ ПМ” Минздрава России (в настоящее время ФГБУ “НМИЦ ТПМ” Минздрава России) в период с 2016 по 2019гг, которым по показаниям была выполнена процедура диагностической коронарной ангиографии (КАГ). Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом учреждения (№ 09-05/19). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании, обработку персональных данных, взятие и биобанкирование крови.

Критерии включения: пациенты старше 18 лет, подписавшие информированное согласие на включение в исследование, взятие и биобанкирование крови.

Критерии невключения: перенесенное <6 мес. назад острое клиническое осложнение атеросклероза; любое острое воспалительное заболевание; хроническая болезнь почек III и более стадии (скорость клубочковой фильтрации (СКФ) <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>); сахарный диабет обоих типов в стадии декомпенсации (уровень глюкозы крови натощак >11 ммоль/л); фракция выброса левого желудочка <40%; онкологические заболевания; заболевания крови и иммунной системы, беременность или период лактации.

Всем пациентам была выполнена КАГ по методу Judkins 1967г [12] с использованием радиального или трансфеморального доступов в условиях рентгеноперационной на ангиографических установках “Philips Integris Allura” и “General Electric Innova 4100”. Для количественной оценки стенозов применяли компьютерную программу установки “General Electric Innova 4100”.

Пациенты были госпитализированы в стационар для проведения КАГ по различным показаниям. При анализе историй болезни пациентов выявлены следующие причины выполнения диагностической КАГ:

- боли за грудиной или в левой половине грудной клетки (предположительно коронарного генеза); невозможность, противопоказания или отказ пациента от проведения нагрузочных проб и мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) КА;

- положительные или сомнительные результаты проб с физической нагрузкой (тредмил-тест или стресс-эхокардиография) или наличие стенозов КА >50% по данным МСКТ;

- изменения на одномоментной электрокардиограмме (ЭКГ) или суточном мониторинге ЭКГ по Холтеру (предположительно ишемического генеза) и невозможность, противопоказания или отказ пациента от проведения нагрузочных проб и МСКТ КА;

- участие в клинической апробации пациентов, находившихся на стационарном лечении в ФГБУ

“НМИЦ ТПМ” Минздрава России, соответствующих критериям включения в настоящее исследование и добровольно согласившихся участвовать в клинической апробации, протокол которой подразумевает проведение КАГ;

- необходимость выполнения КАГ ввиду особенностей профессиональной деятельности пациентов (профессии, связанные с повышенным риском для окружающих людей).

Всем пациентам было выполнено биохимическое исследование крови. Определение биохимических показателей проводили в сыворотке или плазме, полученной стандартными методами из венозной крови, взятой после 12 ч голодания. Стандартизацию и контроль качества анализа биохимических показателей проводили в соответствии с требованиями “Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований”.

Концентрацию общего холестерина (ХС), ТГ и ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) определяли ферментным методом с использованием реагентов фирмы Abbott на биохимическом автоанализаторе “Architect C8000” (Abbot Diagnostics, США). Концентрацию ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП) рассчитывали по формуле Фридвальда при уровне ТГ ≤4,5 ммоль/л: ХС ЛНП = общий ХС - (ХС ЛВП+ТГ/2,2) ммоль/л. Концентрацию ХС, не входящего в состав ЛВП (ХС не-ЛВП), рассчитывали как разность: общий ХС - ХС ЛВП. Уровень липопротеина а (Лп(а)) определяли на биохимическом анализаторе “Sapphire-400” (Япония) с использованием ферментных наборов. Концентрацию основных белков ЛНП и ЛВП — аполипопротеинов (апо) В и апо АI определяли с помощью диагностических наборов “DiaSys” на этом же анализаторе. При оценке показателей липидного обмена использовали нормы, принятые в Европейских рекомендациях по коррекции дислипидемий 2019г [13].

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли глюкозооксидазным методом на биохимическом анализаторе “Architect C 8000” с использованием реагентов фирмы Abbott, а уровень инсулина — иммунохемилюминесцентным методом на автоанализаторе “Architect i2000SR”. Повышенным считали уровень глюкозы ≥6,1 ммоль/л, инсулина ≥14,0 мкЕд/мл [14].

Уровни адипонектина и лептина определяли с помощью иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя: адипонектин (BioVendor, Чехия), лептин (Diagnostic Biochem Canada Inc., Канада). Сниженным считали уровень адипонектина <8,0 мкг/мл [11], что совпало с полученными в настоящем исследовании данными (ROC-анализ); повышенным считали уровень лептина ≥18 нг/мл, что соответствует медиане распределения нашей когорты по этому показателю.

Уровень СРБ определяли высокочувствительным иммунотурбидиметрическим методом, основанном

Таблица 1

**Биохимические показатели крови в зависимости от степени поражения КА**

Биохимические показатели	Группа		
	1 группа (интактные КА) (n=73)	2 группа (субклинический атеросклероз КА) (n=71)	3 группа (выраженный атеросклероз КА) (n=72)
<b>Показатели липидного обмена</b>			
Общий ХС, ммоль/л	4,5±1,15	4,7±1,00	3,9±0,98 <sup>b,c</sup>
ХС ЛНП, ммоль/л	2,6±0,98	2,8±0,91	2,2±0,84 <sup>b,c</sup>
ХС ЛВП, ммоль/л:			
Мужчины	1,0±0,22	1,2±0,33	1,0±0,33 <sup>c</sup>
Женщины	1,3±0,33	1,3±0,28	1,1±0,21 <sup>b,c</sup>
ХС не-ЛВП, ммоль/л	3,3±1,07	3,4±0,9	2,8±0,92 <sup>b,c</sup>
ТГ, ммоль/л	1,4 [1,00; 1,99]; (0,11-4,85)	1,3 [0,84; 1,74]; (0,38-3,62)	1,4 [1,1; 1,75]; (0,60-5,72)
Лп(а), мг/дл	15,9 [7,3; 36,8]; (0,9-229,5)	16,9 [6,82; 33,89]; (0,9-241,27)	15,2 [5,84; 54,21]; (1,46-169)
Апо АI, мг/дл	157±32,12	159±26,82	136±25,9 <sup>b,c</sup>
Апо В, мг/дл	86±23,61	92±23,73	84±22,43
<b>Показатели системы гемостаза</b>			
ФГ, г/л	4,6±1,42	4,5±0,87	5,2±1,42 <sup>b,c</sup>
<b>Маркеры воспаления</b>			
вСРБ, мг/л	2,3 [0,88; 5,37]; (0,14-186,2)	2,2 [1,38; 3,62]; (0,28-29,8)	4,5 [2,14; 10,05] <sup>b,c</sup> ; (0,52-136,69)
<b>Маркеры углеводного обмена</b>			
Глюкоза, ммоль/л	5,9±1,37	6,3±1,47	6,9±2,0 <sup>b,c</sup>
Инсулин, мкЕД/л	8,9 [6,07; 12,45]; (1,30-73,80)	10,0 [6,9; 15,05]; (1,00- 81,00)	11,0 [8,20; 17,65]; (4,60-50,60)
<b>Показатели метаболизма висцеральной жировой ткани</b>			
Адипонектин, мг/мл	7,7 [5,97; 10,55]; (4,19-23,20)	8,8 [7,02; 11,65]; (1,10-56,30)	6,8 [4,73; 10,40] <sup>b,c</sup> ; (2,13-22,70)
Лептин, нг/мл	19,4 [5,8; 57,3]; (0,00-182,0)	27,2 [4,98; 73,2]; (0,33-225,0)	10,5 [4,0; 37,0]; (0,75-139,0)
<b>Конечный продукт креатин-фосфатной реакции</b>			
Креатинин, мкмоль/л	75,4±22,68	77,7±17,22	93,0±32,98 <sup>b,c</sup>
<b>Метаболиты NO</b>			
NO <sub>x</sub> , мкмоль/л	41,8 [42,04; 60,00]; (12,64-222,68)	30,0 [24,46; 42,06] <sup>a</sup> ; (13,91-132,12)	30,5 [25,18; 43,93] <sup>b,c</sup> ; (15,60-115,72)

**Примечание:** p<0,05: <sup>a</sup> — между 1 и 2 гр.; <sup>b</sup> — между 1 и 3 гр.; <sup>c</sup> — между 2 и 3 гр. В квадратных скобках указан интерквартильный размах; в круглых скобках указаны минимальное и максимальное значения показателей.

**Сокращения:** апо — аполипротеины, вСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок, КА — коронарные артерии, Лп(а) — липопротеин(а), ЛПН — липопротеины низкой плотности, ЛВП — липопротеины высокой плотности, ХС — холестерин, ТГ — триглицериды, ФГ — фибриноген, NO<sub>x</sub> — метаболиты оксида азота.

на взаимодействии СРБ исследуемой пробы со специфическими антителами vs СРБ человека, иммобилизованными на поверхности латексных частиц, на биохимическом автоанализаторе Architect С8000. Повышенным считали уровни вСРБ ≥1,0 мг/л [15].

Уровень ФГ в плазме крови определяли методом Клауса. Измерения проводили на автоматическом коагулометре ACL Elite (США) с реактивами фирмы “Hemosil” (США). Повышенным уровнем считали верхнюю квартиль для обследованной когорты >4,0 г/л.

Для определения содержания в сыворотке крови стабильных метаболитов оксида азота — суммарных нитратов и нитритов (NO<sub>x</sub>), на первом этапе сыворотку крови депротеинизировали путем центрифугирования в пробирках, содержащих специальный фильтр, и отбирали для определения концентрации NO<sub>x</sub>. Концентрацию NO<sub>x</sub> определяли спектрофотометрически с помощью прибора “Multiskan MCC/340” (LabSystems, Финляндия) [16]. Сниженным считали

уровень NO<sub>x</sub> <36 мкмоль/л, что соответствует отрезной точке, найденной с помощью ROC-анализа на нашей когорте пациентов.

Уровень креатинина определяли с помощью иммуноферментного анализа. Измерения проводили на биохимическом анализаторе “Architect С 8000”. За нормальный уровень креатинина согласно международным нормативам принят диапазон значений от 70 до 110 мкмоль/л. В нашем исследовании, согласно отрезной точке, найденной с помощью ROC-анализа на исследуемой когорте, повышенным считали уровень креатинина ≥73 мкмоль/л.

**Статистический анализ.** Статистический анализ результатов проводили с использованием пакетов статистических программ Statistica v.10 и SPSS v.20. В зависимости от типа распределения непрерывных переменных для них приведены среднее арифметическое значение со стандартным отклонением (общий ХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, ХС не-ЛВП, апо АI, апо В, ФГ, глюкоза, креатинин) или медиана и интерквартильный

Таблица 2

**Однофакторная и многофакторная модели логистической регрессии  
определения наличия атеросклероза КА любой степени выраженности (2 гр. + 3 гр.)**

Биохимические показатели	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95%; ДИ)	p	ОШ (95%; ДИ)	p
Глюкоза, ммоль/л	2,44 (1,34-4,47)	0,004	2,17 (1,15-4,11)	0,017
Креатинин, мкмоль/л	2,37 (1,33-4,22)	0,003	2,45 (1,35-4,52)	0,004
вчСРБ, мг/л	2,80 (1,36-5,76)	0,005	2,83 (1,37-6,41)	0,008
Адипонектин, мкг/мл	0,71 (0,40-1,25)	0,232	0,51 (0,27-0,96)	0,037

**Примечание:** глюкоза, ммоль/л  $\geq 6,1$  (1),  $< 6,1$  (0); креатинин, мкмоль/л  $\geq 73$  (1),  $< 73$  (0); вчСРБ, мг/л  $\geq 1$  (1),  $< 1$  (0); адипонектин, мкг/мл  $< 8$  (1),  $\geq 8$  (0).

**Сокращения:** ДИ — доверительный интервал, вчСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок, ОШ — отношение шансов.

Таблица 3

**Однофакторная и многофакторная модели логистической регрессии  
определения выраженного атеросклероза КА (3 гр.)**

Биохимические показатели	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95%; ДИ)	p	ОШ (95%; ДИ)	p
Глюкоза, ммоль/л	2,87 (1,60-5,15)	0,000	2,41 (1,31-4,43)	0,005
Креатинин, мкмоль/л	3,03 (1,63-5,62)	0,000	2,79 (1,47-5,33)	0,002
вчСРБ, мг/л	3,83 (1,42-10,39)	0,008	3,48 (1,24-9,77)	0,018
Адипонектин, мкг/мл	1,61 (0,91-2,85)	0,103	1,33 (0,72-2,45)	0,368

**Примечание:** глюкоза, ммоль/л  $\geq 6,1$  (1),  $< 6,1$  (0); креатинин, мкмоль/л  $\geq 73$  (1),  $< 73$  (0); вчСРБ, мг/л  $\geq 1$  (1),  $< 1$  (0); адипонектин, мкг/мл  $< 8$  (1),  $\geq 8$  (0).

**Сокращения:** ДИ — доверительный интервал, вчСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок, ОШ — отношение шансов.

размах с указанием максимального и минимального значений (ТГ, Лп(а), NO<sub>x</sub>, вчСРБ, инсулин, адипонектин, лептин). Для оценки отрезных точек непрерывных параметров использовали ROC-анализ с построением кривых для определения чувствительности и специфичности теста. Пороговый уровень определяли по сочетанию значений чувствительности и специфичности в месте пересечения кривых, в сумме дающих 100%. Шансом в каждой группе пациентов называли вероятность наличия исследуемого признака к вероятности его отсутствия. Для вычисления точечной оценки отношения шансов в группах и 95% доверительного интервала (ДИ) применяли модель бинарной логистической регрессии. Уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

### Результаты

В исследование включено 216 пациентов: 115 мужчин и 101 женщина в возрасте от 24 до 87 лет (средний возраст  $61,5 \pm 10,7$  лет), которые были подобраны в соответствии с критериями включения в одну из следующих групп:

1 группа (n=73) — бессимптомные пациенты с отсутствием атеросклероза в КА (интактные КА);

2 группа (n=71) — бессимптомные пациенты с субклиническим атеросклерозом в КА (степень стеноза КА  $\leq 50\%$ );

3 группа (n=72) — симптомные пациенты с выраженным атеросклерозом в КА (наличие стенозов в двух и более КА с гемодинамически значимым поражением

одного и/или нескольких сосудов). Необходимо отметить, что гемодинамически значимыми стенозами считали [17]:

- стенозы  $> 50\%$  в любой КА с наличием результатов визуализирующих методов, подтверждающих ишемию миокарда в области кровоснабжения пораженного сосуда;

- стенозы  $> 90\%$  в любой КА даже при отсутствии подтверждения ишемии по визуализирующим методам.

В таблице 1 приведены биохимические показатели сыворотки крови в группах с разной степенью поражения КА.

Анализ биохимических параметров, представленных в таблице 1, показал, что в группе с выраженным атеросклерозом КА (3 гр.) липидный профиль оказался менее атерогенным по сравнению с группами пациентов с интактными КА (1 гр.) и субклиническим поражением КА (2 гр.), что, по всей видимости, обусловлено приемом статинов. Действительно, в 3 гр. статины принимали 93% пациентов, 2 гр. — 50,7%, а в 1 группе только 26%. Вместе с тем, показатели обратного транспорта ХС (уровни ХС ЛВП и апо AI) у женщин с выраженным атеросклерозом КА были ниже, чем у остальных пациентов, а у мужчин — ниже, чем в группе с субклиническим поражением КА. Уровни ФГ и вчСРБ, как показатели системы воспаления, выше в группе пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом по сравнению с группами пациентов с отсутствием гемодинамически значимого атеросклеротического поражения КА (1 гр. и 2 гр.).

Таблица 4

**Балльная оценка отклонений биохимических параметров по M<sub>БХ</sub>**

Биохимический параметр	Баллы
Глюкоза	≥6,1 ммоль/л — 1 <6,1 ммоль/л — 0
Креатинин	≥73 мкмоль/л — 1 <73 мкмоль/л — 0
вЧСРБ	≥1 мг/л — 1 <73 мг/л — 0
Адипонектин	<8 мкг/мл — 1 ≥8 мкг/мл — 0

**Сокращение:** вЧСРБ — высокочувствительный С-реактивный.

Значения глюкозы и инсулина, отражающие активность углеводного обмена, оказались выше в группах с наличием атеросклероза КА любой степени выраженности (2 гр. и 3 гр.), по сравнению с лицами, не имеющими коронарного атеросклероза (1 гр.). Среди параметров метаболизма висцеральной жировой ткани рассмотрены адипонектин и лептин. Самые высокие значения лептина получены во 2 гр., а самые низкие значения адипонектина — в 3 гр. Значения креатинина нарастают от 1 гр. к 3 гр. Более низкие значения NO<sub>x</sub> получены в группе пациентов с субклиническим атеросклерозом КА, а более высокие — в группе с отсутствием атеросклероза КА по сравнению с группой с выраженным поражением КА.

Для определения вклада биохимических параметров в оценку вероятности наличия коронарного атеросклероза и определения степени его выраженности был использован метод логистической регрессии; при этом в однофакторных и многофакторных моделях учитывали статистически значимые различия между группами по проанализированным биохимическим показателям крови (табл. 1).

Однофакторный анализ с включением вышеперечисленных биохимических показателей выявил, что независимый вклад в диагностику выраженного коронарного атеросклероза (3 гр.) вносят повышенный уровень ХС ЛВП >1 ммоль/л у мужчин (p=0,006) и >1,2 ммоль/л у женщин (p=0,002), ХС нЛВП >2,2 ммоль/л (p<0,001), глюкоза ≥6,1 ммоль/л (p=0,000), вЧСРБ ≥1 мг/л (p=0,008) и креатинин ≥73 мкмоль/л (p<0,001). При диагностике атеросклероза КА любой степени выраженности (1 гр. + 2 гр.) свою значимость в однофакторных моделях сохраняют глюкоза ≥6,1 ммоль/л (p=0,004), вЧСРБ ≥1 мг/л (p=0,005), креатинин ≥73 мкмоль/л (p=0,003), а также NO<sub>x</sub> <36 мкмоль/л (p=0,001). Однако многофакторные модели, учитывающие различные комбинации показателей липидного обмена, а также их сочетания с другими биохимическими показателями, оказались незначимы ни для выявления атеросклероза КА, ни для определения его выраженности (p>0,05).

Таблица 5

**Определение степени выраженности атеросклероза КА по M<sub>БХ</sub>**

M <sub>БХ</sub> , суммарный балл	Группа поражения
0-2 балла	Интактные КА (атеросклероз коронарных артерий отсутствует)
3-4 балла	Атеросклероз КА любой степени выраженности (наличие АСБ в КА ≥20%)

**Сокращения:** АСБ — атеросклеротическая бляшка, КА — коронарные артерии, M<sub>БХ</sub> — биохимическая модель.

В то же время значимыми оказались модели, включающие глюкозу, креатинин, вЧСРБ и адипонектин. Согласно результатам однофакторного анализа (табл. 2), определяющего независимый вклад каждого параметра в оценку риска наличия и выраженности коронарного атеросклероза, значимыми оказались все включенные показатели, кроме адипонектина.

Многофакторная модель, включающая вышеуказанные показатели (табл. 3), оказалась значима как для выявления атеросклероза любой степени выраженности (1 гр. + 2 гр.) (p<0,001), так и детекции выраженного коронарного поражения (3 гр.) (p=10<sup>-4</sup>).

Принимая во внимание мультифакториальную этиологию атеросклероза, тесную сопряженность биомаркеров друг с другом и их взаимопотенцирующее действие, а также полученные результаты однофакторного и многофакторного анализа биохимических показателей крови, мы сформировали биохимическую модель (M<sub>БХ</sub>), позволяющую осуществлять неинвазивную диагностику атеросклероза КА. В модель M<sub>БХ</sub> были включены следующие биомаркеры: глюкоза, креатинин, вЧСРБ, адипонектин. Отклонение от нормы одного биохимического показателя оценивали в 1 балл. Таким образом, суммарно по M<sub>БХ</sub> можно получить от 0 до 4 баллов (табл. 4).

С помощью ROC-анализа была оценена статистическая значимость M<sub>БХ</sub> для диагностики атеросклероза КА; найдена отрезная точка, которая составила 2 балла. Значения M<sub>БХ</sub> >2 баллов с чувствительностью 72% свидетельствовали о наличии атеросклероза КА любой степени выраженности, а со специфичностью 62,5% исключали его. С использованием данных M<sub>БХ</sub> и отрезной точки 2 балла была построена модель бинарной логистической регрессии, по данным которой при значении M<sub>БХ</sub> >2 баллов шанс выявления атеросклероза КА любой степени выраженности увеличивается в 2,1 раза (95% ДИ 1,2-3,8; p=0,010), выраженного — в 4,7 раза (95% ДИ 1,9-12,0; p=0,001). Значения M<sub>БХ</sub> ≤2 баллов увеличивали шанс выявления интактных КА в 2,8 раза (95% ДИ 1,4-4,9; p=0,002). Интерпретация результатов по суммарному баллу M<sub>БХ</sub> представлена в таблице 5.

**Обсуждение**

Изучение биохимических маркеров ключевых патофизиологических механизмов развития атеросклероза

является перспективным направлением, поскольку их действие осуществляется на молекулярно-клеточном уровне и охватывает все стадии атерогенеза.

Нами были рассмотрены маркеры липидного, углеводного обмена, медиаторы воспаления, показатели системы гемостаза, продукты метаболизма висцеральной жировой ткани, конечный продукт креатин-фосфатной реакции.

При диагностическом поиске маркеров атеросклероза традиционно исследуют показатели липидного обмена. Несмотря на то, что около половины сердечно-сосудистых событий происходит на фоне нормолипидемии, дислипидемия продолжает занимать ведущее место среди ФР ССЗ, а её коррекция является первостепенной задачей лечения пациентов высокого и очень высокого ССР [13]. В связи с этим нами были проанализированы основные показатели липидного профиля плазмы крови. Оказалось, что в обследуемой когорте пациентов менее атерогенный липидный профиль наблюдался в группе с выраженным атеросклерозом КА (3 гр.) по сравнению с группами пациентов с интактными КА (1 гр.) и субклиническим поражением КА (2 гр.), что, по всей видимости, обусловлено приемом статинов. Построенные однофакторные и многофакторные регрессионные модели, включающие различные показатели липидного обмена, а также их сочетание с другими биомаркерами оказались незначимы ( $p > 0,05$ ).

Проведенный анализ связи нарушений инсулин-зависимого поглощения глюкозы клетками в виде отклонений в уровнях глюкозы и инсулина и параметров энергетического обмена (адипонектина и лептина) показал, что значения глюкозы  $>6,1$  ммоль/л и снижение уровня адипонектина  $<8$  мкг/мл достоверно свидетельствуют о наличии у пациентов атеросклероза КА. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что пациенты с атеросклерозом, в т.ч. КА, достоверно чаще имеют метаболические нарушения [18-20].

Учитывая патогенетические аспекты атеросклероза, связанные с хроническим воспалением, нами были рассмотрены такие показатели, как ФГ и вчСРБ. Данные биомаркеры были выбраны не случайно, их выбор обоснован результатами доказательной медицины и практической значимостью [21-23]. По данным исследований, повышенный уровень ФГ является диагностически и прогностически значимым маркером атеросклероза, при котором ряд выраженных нарушений в системе гемостаза ассоциируется с осложнениями и более высокой сердечно-сосудистой смертностью [24, 25]. По данным литературы уровень вчСРБ независимо ассоциирован со степенью атеросклеротического поражения и площадью стенозирования в КА. Однако целесообразность использования вчСРБ с целью выявления субклинического атеросклероза до конца неясна [23]. Метаанализ 22 исследований показал, что концен-

трация вчСРБ  $\geq 3,0$  мг/л с вероятностью 60% ассоциирована с развитием ишемической болезни сердца. При этом для стратификации риска развития сердечно-сосудистых осложнений высоким принято считать повышение уровня вчСРБ  $\geq 1,0$  мг/л [24]. Результаты нашего исследования показали достоверную связь между ФГ и вчСРБ не только с наличием, но и степенью выраженности атеросклероза КА.

С повышенным риском развития ССЗ независимо от других ФР связана и хроническая болезнь почек. Сниженная СКФ повышает риск сердечно-сосудистой смерти. Согласно Европейским клиническим рекомендациям по кардиоваскулярной профилактике в клинической практике [25], при наличии хронической болезни почек со снижением СКФ  $<30$  мл/мин пациента относят к категории очень высокого риска,  $<60$  мл/мин — высокого риска. Поскольку при расчете СКФ используется уровень креатинина, мы проанализировали его возможные ассоциации с атеросклерозом КА и степенью его выраженности как изолированно, так в сочетании с другими биомаркерами. Оказалось, что уровень креатинина положительно связан не только с наличием, но и выраженностью атеросклероза КА.

Целесообразность оценки уровня  $NO_x$  для оценки  $NO$ -продуцирующей активности эндотелия подтверждена в исследованиях как на экспериментальных животных, так и на человеке [26, 27]. Данные литературы показывают связь  $NO_x$  не только с сердечно-сосудистой, но и общей смертностью [28]. Есть данные, свидетельствующие о связи  $NO_x$  с атеросклерозом [29]. В нашем исследовании при анализе концентрации  $NO_x$  в сыворотке крови нами была найдена отрезная точка, равная 36 мкМ/л, и выявлена отрицательная корреляция этого биомаркера с наличием и выраженностью атеросклероза КА. Однако, учитывая малую выборку пациентов и сложность определения  $NO_x$ , данный показатель не включали в многофакторные регрессионные модели. Полученный результат требует дальнейшего изучения на большей когорте.

На основании полученных нами результатов анализа биомаркеров крови была сформирована  $M_{БХ}$ , которая позволяет верифицировать наличие атеросклероза КА, однако возможности данной модели для верификации выраженности коронарного поражения ограничены. Это, вероятнее всего, связано с тем, что обнаруженные отклонения от нормальных уровней включенных в модель метаболитов ассоциируются с инициацией атеросклеротического процесса, а в ходе его прогрессирования значимо не изменяются.

### Заключение

Таким образом, на основании проведенного анализа биохимических показателей крови были отобраны параметры для формирования диагностической шкалы ( $M_{БХ}$ ), позволяющей верифицировать пациентов с атеросклерозом КА или его отсутствием.

Количественное определение уровней глюкозы, креатинина, вчСРБ и адипонектина, вошедших в  $M_{БХ}$ , вполне доступно, что позволяет широко использовать её в практическом здравоохранении. Согласно полученному баллу по  $M_{БХ}$  пациентов можно рекласифицировать по вероятности наличия атеросклероза КА и по необходимости направить их на дополни-

тельные исследования для подтверждения диагноза и определения выраженности атеросклеротического поражения.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

- Andreev EM. Mortality in Moscow and other megacities of the world: similarities and differences. Demographic review. 2016;3(3):39-79. (In Russ.) Андреев Е. М. Смертность в Москве и других мегаполисах мира: сходства и различия. Демографическое обозрение. 2016;3(3):39-79.
- Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. Circulation. 2006;113:2335-62. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570.
- Huang Y, Gulshan K, Nguyen T, Wu Y. Biomarkers of Cardiovascular Disease. Dis Markers. 2017;2017:8208609. doi:10.1155/2017/8208609.
- Lyngbakken MN, Myhre MR, Røsjø H. Novel biomarkers of cardiovascular disease: Applications in clinical practice. Crit Rev Clin Lab Sci. 2019;56(1):33-60. doi:10.1080/10408363.2018.1525335.
- Preiss D, Sattar N. Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: a review of the evidence. Clin Endocrinol. 2009;70:815-28. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03490.
- Oravec S, Dukat A, Gavornik P, et al. Atherogenic normolipidemia — a new phenomenon in the lipoprotein profile of clinically healthy subjects. Neuro Endocrinol Lett. 2011;32(3):317-21.
- Subirana I, Fitó M, Diaz O, et al. Prediction of coronary disease incidence by biomarkers of inflammation, oxidation, and metabolism. Sci Rep. 2018;8(1):3191. doi:10.1038/s41598-018-21482-y.
- Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. N Engl J Med. 2006;355:2631-9. doi:10.1056/NEJMoa055373.
- Melander O, Newton-Cheh C, Almgren P, et al. Novel and conventional biomarkers for prediction of incident cardiovascular events in the community. JAMA. 2009;302:49-57. doi:10.1001/jama.2009.943.
- Blankenberg S, Zeller T, Saarela O, et al. Contribution of 30 biomarkers to 10-year cardiovascular risk estimation in 2 population cohorts: the MONICA, risk, genetics, archiving, and monograph (MORGAM) biomarker project. Circulation. 2010;121:2388-97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.901413.
- Metelskaya VA, Gavrilova NE, Yarovaia EA, et al. An integrative biomarker: opportunities for non-invasive diagnostics of coronary atherosclerosis. Russ J Cardiol. 2017;(6):132-8. (In Russ.) Метельская В. А., Гаврилова Н. Е., Яровая Е. Б. и др. Интегрированный биомаркер: возможности неинвазивной диагностики коронарного атеросклероза. Российский кардиологический журнал. 2017;(6):132-8. doi:10.15829/1560-4071-2017-6-132-138.
- Merkulov EV, Mironov VM, Samko AN. Coronary angiography, ventriculography, bypass angiography in graphics and diagrams. M.: Media Medika 2011. p.100. (In Russ.) Меркулов Е. В., Миронов В. М., Самко А. Н. Коронароангиография, вентрикулография, шунтография в иллюстрациях и схемах. М.: Медиа Медика 2011. с.100. ISBN 978-5-905305-03-0.
- Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. Eur Heart J. 2020;41:111-88. doi:10.1093/eurheartj/ehz455.
- 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. Russian Journal of Cardiology. 2020;25(4):3839. (In Russ.) 2019 Рекомендации ESC/EASD по сахарному диабету, предиабету и сердечно-сосудистым заболеваниям. Российский кардиологический журнал. 2020;25(4):3839. doi:10.15829/1560-4071-2020-3839.
- Genkel VV, Kuznetsova AS, Salashenko AO, et al. Increased level of highly sensitive C-reactive protein as a marker of multifocal atherosclerosis in patients with cardiovascular diseases. Medical Board. 2019;(16):86-93. (In Russ.) Генкель В. В., Кузнецова А. С., Салашенко А. О. и др. Увеличение уровня высоко-чувствительного С-реактивного белка как маркер мультифокального атеросклероза у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Медицинский совет. 2019;(16):86-93. doi:10.21518/2079-701X-2019-16-86-93.
- Metelskaya VA, Gumanova NG. Screening-method for determining the level of nitrogen oxide metabolites in blood serum. Clinical laboratory diagnostics. 2005;6:15-8. (In Russ.) Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2005;6:15-8.
- 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Russian Journal of Cardiology. 2020;25(2):3757. (In Russ.) 2019 Рекомендации ESC по диагностике и лечению хронического коронарного синдрома. Российский кардиологический журнал. 2020;25(2):3757. doi:10.15829/1560-4071-2020-2-3757.
- Shuvaev IP, Asymbekova EU, Buziashvili Yul. Features of coronary heart disease in metabolic syndrome. Creative cardiology. 2017;11(1):20-30. (In Russ.) Шуваев И. П., Асымбекова Э. У., Бузиашвили Ю. И. Особенности течения ишемической болезни сердца при метаболическом синдроме. Креативная кардиология. 2017;11(1):20-30. doi:10.15275/kreatkard.2017.01.03.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. JAMA. 2002;288(21):2709-16. doi:10.1001/jama.288.21.2709.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 2004;43(Suppl 1):S14-S31. doi:10.2337/dc20-S002.
- Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. JAMA. 2005;294(14):1799-809. doi:10.1001/jama.294.14.1799.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women. Circulation. 2003;107(3):391-7. doi:10.1161/01.cir.0000055014.62083.05.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med. 2000;342:836-43. doi:10.1056/NEJM200003233421202.
- Cheng JM, Oemrawsingh RM, Garcia-Garcia HM, et al. Relation of C-reactive protein to coronary plaque characteristics on grayscale, radiofrequency intravascular ultrasound, and cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris (from the ATHEROREMO-IVUS study). Am J Cardiol. 2014;114(10):1497-503. doi:10.1016/j.amjcard.2014.08.013.
- 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Russ J Cardiol. 2017;(6):7-85. (In Russ.) Европейские рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике (пересмотр 2016). Российский кардиологический журнал. 2017;(6):7-85. doi:10.15829/1560-4071-2017-6-7-85.
- Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. Methods enzymol. 1999;301:49-61. doi:10.1016/s0076-6879(99)01068-x.
- Bachetti T, Comini L, Pasini E, et al. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. J Mol Cell Cardiol. 2001;33:395-403. doi:10.1006/jmcc.2000.1311.
- Gumanova NG, Deev AD, Zhang W, et al. Serum nitrite and nitrate levels, NOx, can predict cardiovascular mortality in the elderly in a 3-year follow-up study. Biofactors. 2016;43(1):82-9. doi:10.1002/biof.1321.
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med. 2005;26(1-2):33-65. doi:10.1016/j.mam.2004.09.003.