

OPG/RANKL/RANK信号通路在早发冠心病中的研究进展

陈芳, 李飞*

延安大学附属医院心内科, 陕西 延安

收稿日期: 2022年7月27日; 录用日期: 2022年8月24日; 发布日期: 2022年8月31日

摘要

早发冠状动脉粥样硬化性心脏病(premature coronary heart disease, PCHD)是冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease, CHD)特有的种类, 具有起病急、发病隐匿、年轻化、高病发率、高致死率等特征, 会带来严重的不良后果。过去关于OPG/RANKL/RANK信号轴在骨骼系统方面研究的较多, 近年来在心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的研究中也引起了广泛关注, 因此探索对PCHD有意义的信号轴对于今后PCHD的发生、演变、治疗、预后等十分有意义。

关键词

骨保护素, 核因子 κ B受体激活剂, 核因子受体激活蛋白配体, 早发冠心病

Research Progress of OPG/RANKL/RANK Signaling Pathway in Premature Coronary Heart Disease

Fang Chen, Fei Li*

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

Received: Jun. 27th, 2022; accepted: Aug. 24th, 2022; published: Aug. 31st, 2022

Abstract

Premature coronary heart disease (PCHD) is a unique type of coronary atherosclerotic heart dis-

*通讯作者。

ease (CHD). With acute onset, hidden onset, young, high incidence, high mortality and other characteristics, it will bring serious adverse consequences. In the past, there have been many studies on OPG/RANKL/RANK signal axis in skeletal system. In recent years, it has also attracted wide attention in the studies of cardiovascular disease (CVD). Therefore, the exploration of significant signal axis for PCHD is of great significance for the occurrence, evolution, treatment and prognosis of PCHD in the future.

Keywords

Osteoprotegerin, Nuclear Factor κ B Receptor Activator, Nuclear Factor Receptor Activating Protein Ligand, Premature Coronary Heart Disease

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)导致的 CHD 已成为影响人类健康的“头号杀手”。据 2020 年《中国心血管健康与疾病报告》报道,我国 CVD 的患病人数已达 3.3 亿,其中 CHD 患者达 1139 万,患病率居高不下,且 PCHD 所致急性心肌缺血事件可到达 70%,如有其它风险因素并存,这种心血管不良风险会显著增加,给个人、家庭、社会带来了不可估量的负担[1] [2]。过去关于 OPG/RANKL/RANK 信号系统在骨代谢、免疫系统等方面做了许多研究[3] [4],近些年该信号轴在心血管方面的发生发展中也成为了研究热点,本文主要对 OPG/RANKL/RANK 信号通路和 AS 及 PCHD 的关系作一综述,为今后在 PCHD 靶向分子治疗发面提供更多的可能性。

2. OPG/RANKL/RANK 信号通路

2.1. OPG

1997 年 Simonet [5] 等人首次发现了骨保护素,是一种由 401 个氨基酸残基构成的天然分泌型糖蛋白,以分子量为 60 kDa (单体)和 120 kDa (二聚体)两种形式存在,且后者生物活性更强。OPG 主要在软骨组织中高表达,也可在动脉、肺脏、肾脏、胃肠道、皮肤、免疫细胞中表达。作为一种诱骗受体,OPG 能和 RANKL (核因子 κ B 受体激活蛋白配体)结合,但与 RANK (核因子 κ B 受体激活剂)相比,OPG 和 RANKL 的亲和力要高出 500 倍[6]。OPG 是由 TNFRSF11B 基因编码,据了解,编码该基因的某个多态性与冠状动脉粥样硬化相关,一项实验发现[7],血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或白细胞介素-1 β (IL-1 β)影响下,会分泌 OPG 与韦伯潘力氏小体(Weibel-Palade bodies, WPBs)形成的复合物,WPBs 是 ECs 特有的细胞器,可分泌多种细胞因子、炎性介质等,参与炎症、血栓形成、血管形成等过程。另一项动物实验表明[8],OPG 是影响破骨细胞(osteoclast, OC)骨吸收的生理调节剂,它可以防止骨质疏松和大动脉钙化。而且由于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和 ECs 在 AS 中扮演着重要的角色,这提示我们循环血中的 OPG 很可能是 ECs 和 VSMC 在炎性因子的刺激下产生的,OPG 可能具有潜在的保护血管免受钙化的作用。但后期的临床研究发现,为了使骨组织中达到治疗量的 OPG 浓度,需要给予大量重组 OPG,当 OPG 浓度达到非生理浓度后,在免疫系统或者心血管系统中,这种由 OPG/RANKL/RANK 信号轴发挥作用的特定位点会产生有害反应。

2.2. RANKL

RANKL 是由 316 个氨基酸组成的同源三聚体 II 型跨膜蛋白, 通常情况下, 当 RANKL 在巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)存在时会被诱导与 RANK 结合时, 同时 OPG 的表达水平也会下降, 此时 RANKL 与 OPG 比率升高, 促进 OC 分化成熟, 抑制其凋亡, 并在组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRACP)等作用下促进骨吸收同时产生活性氧(reactive oxygen species, ROS) [6], 在血管系统中, RANKL 与钙化斑块易损性有关。

2.3. RANK

RANK 是由 616 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白, 主要在成熟 OC 膜及前体细胞中表达, 也在 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、成纤维细胞、树突状细胞等中表达。RANK 的胞质区 C 端含有 383 个氨基酸, 能够结合 TNF 受体相关因子(TNF receptor-associated factors, TRAFs) 2、5、6, 然后再将信号传导给下游的 NF- κ B、Src、JNK 信号通路; 胞外区 N 端含有 184 个氨基酸; 跨膜区有 21 个氨基酸以及 28 个氨基酸构成的信号肽。RANK 和同源三聚体 RANKL 结合后激活转录因子核因子 kappa-B (nuclear factor-kappa, NF- κ B)和激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)的信号级联反应。

3. OPG/RANKL/RANK 信号通路的调控因素

OPG/RANKL/RANK 信号轴是维持骨形成和骨吸收平衡的核心。该过程受多种激素、细胞因子及局部因素的调控, OPG/RANKL/RANK 轴通过诱导成骨细胞(osteoclast, OB)合成 RANKL、下调 OPG 的表达来促进 OC 分化、骨骼重塑、骨钙释放。诱导 OPG mRNA 表达的物质包括一些细胞因子(成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)-23、TNF α 、IL-1 α 、IL-18)、类固醇激素(17 β 雌二醇)、肽类(骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein, BMP-2), 而糖皮质激素、甲状旁腺素(Parathyroid Hormone, PTH)、甲状旁腺素相关蛋白、前列腺素 E2、环孢素 A 会降低 OPG 的表达[7] [9]。此外, 同一激素或细胞因子因作用的细胞类型不同, 对 OPG 的表达影响也不同, 如: 转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β), 在平滑肌细胞中抑制 OPG 的表达, 但在成骨细胞和骨髓基质细胞中促进其表达; 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 在 ECs、平滑肌细胞、OB 中上调 OPG, 在骨髓基质细胞中 OPG 的表达下降。另外, 有研究证实粒细胞可产生 OPG, 并在 IL-4 和 IL-13 的作用下, 活化的 T 细胞也可诱导 OPG 在 OB 中表达。还有研究表明[10], 机械应力可以影响 OPG/RANKL/RANK 系统, 体育锻炼产生的机械应力对骨骼有益, 这是通过影响骨形成相关激素的表达来升高 OPG 水平和降低 RANKL 水平实现的, 但也有报道称活动后两者水平变化不显著, 此外 OPG 的升高也只是在骨细胞中体现, 目前尚未证实 ECs 中 OPG 的表达有增加。而另外一项动物实验表明, 每天不少于 1 小时, 连续一周的活动能促使血清中 FGF-23 的水平升高和骨骼肌中 FGF-23mRNA 的表达增强[11]。

4. OPG/RANKL/RANK 信号通路 with AS 的关系

近年研究发现 OPG/RANKL/RANK 轴不仅参与骨代谢的调节, 在 CVD 的发生发展中也有重要作用, 许多证据表明, OPG/RANKL/RANK 信号轴与血管钙化(vascular calcification, VC)有关, 在血管损伤及炎症中起调节作用。动脉钙化是 AS 的重要危险因素。报道显示, 这种钙化可在大动脉中膜、ECs 及 VSMC 上表达, 与 RANK、RANKL、炎症因子、CTSK 诱导成骨分化相关[12], 但这些蛋白表达水平与 AS 分期相关。免疫细胞和血管中的 RANKL 表达增强与 VC 和 AS 的发生有关。RANK 和 RANKL 结合后激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和 AP-1 下游信号分子后进一步激活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 活化的 MMP 超表达促使斑块破裂, 此外, RANK 激活 TRAF2

和 TRAF6 后可进一步激活 OB 基因, 这一过程也参与了血管钙化[13], 进一步的研究表明 RANKL 激活 ECs 的非典型 NF- κ B/p52 通路, 会使 VSMC 的促钙化反应活化[14]。在一项 OPG 基因敲除的小鼠模型实验中会产生主动脉中层钙化, 而在载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, ApoE)基因敲除的小鼠模型中, 我们观察到这种钙化程度和 AS 斑块大小明显增加, 这提示 OPG 也许具有血管保护作用, 但是这种保护作用和 VC 发生时间密切相关, Min 等人在给予 OPG 基因敲除的小鼠重组 OPG 后观察到这样虽可以防止 VC 的发生, 但是在成年小鼠身上并没有观察到 VC 的逆转[7]。AS 的病理生理改变十分复杂, AS 的钙化始于氧化的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 在巨噬细胞和 T 淋巴细胞聚集、VSMC 迁移、泡沫细胞形成等一系列持续的炎症和组织重塑变化中逐渐形成易损斑块。既往在人类 AS 斑块中检测到 OPG、RANKL 的 mRNA 和蛋白质的表达, 种种发现都表明 OPG/RANKL/RANK 轴可能参与 AS 的形成[15]。

5. OPG/RANKL/RANK 信号通路 with PCHD 的关系

人们普遍认为, CHD 的发生与传统的危险因素及遗传因素相关, 其中遗传易感性占比约 40%~60% [2]。PCHD 是 CHD 的特殊形式, 基于前期的临床研究[16] [17], 我们发现 CHD 患者的血清 OPG 水平较非 CHD 人群高, 且与非 PCHD 患者相比, OPG 的水平在 PCHD 患者中明显升高, 且当血浆 OPG 浓度不低于 396.64 pg/ml 时, 更容易发生早发急性冠脉综合征(premature acute coronary syndrome, PACS), 这提示在 PCHD 患者中 OPG 水平越高, 心肌缺血风险越高, 远期心血管不良事件(major adverse cardiovascular events, MACE)的风险也显著增加。这些结果与之前的小鼠模型所观察到 OPG 具有保护作用有矛盾, 所以我们猜测 OPG 水平的升高可能是对病理性血管钙化的一种代偿保护反应, 而 OPG/RANKL/RANK 信号通路在免疫炎症、氧化应激、心室重构、心力衰竭等病理生理改变也有影响。

6. OPG/RANKL/RANK 信号通路 with AS 和 PCHD 的机制关联性

钙化是 AS 斑块形成的主动过程, 近年来在 AS 的病理生理改变中一直是焦点问题, 炎症、骨丢失、VC 三者介导的 CVD 风险存在相关性。此外, VSMC 转分化学说也是大多数人认可的理论[14]。相对传统的 CVD 危险因素, VC 和骨代谢间的关系在其发病机制中有着重要意义, 据 Eghbali-Fatourehchi 等描述, OB 是二者的纽带, 这些细胞主要来源于髓系, 和异位钙化有关, 后来的研究也发现, 循环血中骨祖细胞的水平和 CVD 的发生相关[11]。CVD 的发病机制与骨质疏松症之间有关联, 骨质疏松患者常出现血管钙化, 但影像学研究表明这和年龄关系不大。另外, London 等认为 VC 程度与 CVD 生存率高低相关。AS 导致动脉管壁变硬, 弹性下降, 血管重塑, 且这种硬化以广泛的内中膜钙化为主, 钙化程度与 AS 斑块负荷成正相关[18], 可以看作是 AS 斑块负荷的一个定量标志物。研究发现[19], 年龄 \geq 65 岁的人群中, 有超过一半的健康者和约 95% 的心肌缺血者会发生冠状动脉钙化(coronary artery calcification, CAC), 且 CAC 程度随着年龄的增加而加重, 和性别关系不大, 此外, 在 2008 年开展的一项由 6722 名多种族参与者的前瞻性研究中, 通过对其后 10 年的随访所做出的荟萃分析表明, 在没有其它心血管危险因素的人群中, CAC 的程度和临床相关事件发生率成正相关。最新发布在 JAMA 杂志上的一项研究表明, CAC 的检测对有临界及中风险的个体获益比更高, 因为在血流动力学变化之前, 通过对个体化患者 CAC 程度评估更加有助于筛选出亚临床患者, 为具有 PCHD 家族史及 CAC 评分高的 CAD 患者一级预防提供更可靠的证据[20]。

7. OPG/RANKL/RANK 信号通路 with PCHD 的相关治疗

因 PCHD 发病的隐匿性, 现有的筛查方式还不足以证明可对这些年轻的人群实施有效的干预措施。随着社会经济的发展, 在全世界范围内, 除外传染性疾病, CVD 的高发病率及高致死率是影响人类健康

的主要原因, 虽然年龄大于 55 岁的 CVD 人群的死亡率有明显下降, 但低于该年龄的人群并没有得到改善, 而且据世卫组织报道, 80% 的 PCHD 是可以预防的, 并且在 2013 年已启动“25”全球计划, 有望在 2025 年把 CVD 引起的过早死亡降低 25% [21] [22] [23]。血管内皮功能障碍和慢性炎症在 AS 的发病机制中占着十分重要的作用, 而且, 在后续有针对性的炎症干预中也证明了这一点。他汀类药物是干预 CHD 最有效的药物之一。一项荟萃分析显示, 在综合分析 CVD 的危险因素并调整用药后, 他汀类药物的使用可增加骨密度, 且这种效应与他汀的使用时间和在体内的累积剂量成正相关, 因此 CVD 患者可以从骨折风险评估中获益[19] [24]。他汀类药物可抑制细胞增殖、降脂、诱导 OC 和肿瘤细胞凋亡、还有强大的抗炎作用。研究表明, 在骨代谢的相关机制中, 他汀会对其产生一定的影响, 而且不同种类的他汀作用机制不同[25]。一项荟萃分析指出他汀类药物会使 IL-6、TNF- α 、CRP、IL-1、IL-8 等炎症因子的水平明显下降, 而 MMPs、IL-10、TGF- β 等的表达升高[26]。通常情况下, 在 TNF- α 、IL-1 β 的刺激下, 血管 ECs 上 OPG 的表达增强, 在 VSMC 中, IL-1 β 、TNF- α 也会使 OPG 水平升高, 他汀的使用让 PCHD 患者的斑块由不稳定变得稳定, OPG 的水平理论上也应该下降。但是也有研究发现[27], CHD 患者在使用他汀后, 血清 OPG 的水平有升高也有降低。所以他汀对 PCHD 患者 OPG 的这种影响是矛盾的, 这可能和药物的种类、服药剂量、斑块的情况等有关, 接下来我们也会进一步探索 OPG/RANKL/RANK 信号轴与 PCHD 之间的联系, 为今后的临床干预等提供更多的可能性。

综上所述, 目前很多研究都肯定了 OPG/RANKL/RANK 信号轴在 AS 和 PCHD 中发挥的作用, 尽管在临床上, 有对 OPG/RANKL/RANK 信号系统有关 PCHD 的干预做了一定的探索, 但由于缺乏大量的随机对照试验, 目前在该方面仍存在较大的空缺。接下来需要进一步明确新途径在对 PCHD 患者加以合适的干预后有关 OPG/RANKL/RANK 方面所带来的影响。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
- [2] Wang, H., Liu, Z., Shao, J., *et al.* (2020) Pathogenesis of Premature Coronary Artery Disease: Focus on Risk Factors and Genetic Variants. *Genes and Diseases*, **9**, 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.11.003>
- [3] Kovács, B., Vajda, E. and Nagy, E.E. (2019) Regulatory Effects and Interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK Signaling at the Bone-Cartilage Interface in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article No. 4653. <https://doi.org/10.3390/ijms20184653>
- [4] Delpino, M.V. and Quarleri, J. (2020) Influence of HIV INFECTION and Antiretroviral Therapy on Bone Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, **11**, Article No. 502. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00502>
- [5] Hofbauer, L.C. and Heufelder, A.E. (1997) Osteoprotegerin: A Novel Local Player in Bone Metabolism. *European Journal of Endocrinology*, **137**, 345-346. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1370345>
- [6] Infante, M., Fabi, A., Cognetti, F., *et al.* (2019) RANKL/RANK/OPG System beyond Bone Remodeling: Involvement in Breast Cancer and Clinical Perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **38**, Article No. 12. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1001-2>
- [7] Venuraju, S.M., Yerramasu, A., Corder, R., *et al.* (2010) Osteoprotegerin as a Predictor of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Mortality and Morbidity. *Journal of the American College of Cardiology*, **55**, 2049-2061. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.013>
- [8] Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., *et al.* (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, **89**, 309-319. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3)
- [9] Carrillo-López, N., Martínez-Arias, L., Fernández-Villabril, S., *et al.* (2021) Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ β -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. *Calcified Tissue International*, **108**, 439-451. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00803-2>
- [10] Tobeiha, M., Moghadasian, M.H., Amin, N., *et al.* (2020) RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 6910312. <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>
- [11] Peralice, S., Vigeveno, F., Del Toro, R., Napoli, N. and Maddaloni, E. (2018) Lifestyle Management of Diabetes: Im-

- plications for the Bone-Vascular Axis. *Current Diabetes Reports*, **18**, Article No. 84. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1060-y>
- [12] Naranjo, M.C., Bermudez, B., Garcia, I., *et al.* (2017) Dietary Fatty Acids on Aortic Root Calcification in Mice with Metabolic Syndrome. *Food and Function*, **8**, 1468-1474. <https://doi.org/10.1039/C7FO00143F>
- [13] Tamtaji, O.R., Borzabadi, S., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G. and Asemi, Z. (2019) The Effects of Fatty Acids Consumption on OPG/RANKL/RANK System in Cardiovascular Diseases: Current Status and Future Perspectives for the Impact of Diet-Gene Interaction. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 2774-2781. <https://doi.org/10.1002/jcb.27672>
- [14] Gu, W., Wang, Z., Sun, Z., *et al.* (2020) Role of NFATc1 in the Bone-Vascular Axis Calcification Paradox. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **75**, 200-207. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000788>
- [15] Sandberg, W.J. (2006) Enhanced T-Cell Expression of RANK Ligand in Acute Coronary Syndrome: Possible Role in Plaque Destabilization. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, **26**, 857-863. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204334.48195.6a>
- [16] 刘倩茹. 血浆骨保护素水平与早发冠心病的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 延安: 延安大学, 2020.
- [17] 边娟. 血浆骨保护素对早发急性冠脉综合征危险分层预测价值研究[D]: [硕士学位论文]. 延安: 延安大学, 2021.
- [18] Efstratiadis, G., Koskinas, K. and Pagourelis, E. (2007) Coronary Calcification in Patients with End-Stage Renal Disease: A Novel Endocrine Disorder? *Hormones (Athens)*, **6**, 120-131. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.111108>
- [19] García-Gómez, M.C. and Vilahur, G. (2020) Osteoporosis and Vascular Calcification: A Shared Scenario. Osteoporosis y calcificación vascular: Un escenario compartido. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, **32**, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2019.03.008>
- [20] Greenland, P. and Lloyd-Jones, D.M. (2022) Role of Coronary Artery Calcium Testing for Risk Assessment in Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Review. *JAMA Cardiology*, **7**, 219-224. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.3948>
- [21] WHO (2016) The Challenge of Cardiovascular Disease—Quick Statistics. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics>
- [22] Joseph, P., Leong, D., McKee, M., *et al.* (2017) Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circulation Research*, **121**, 677-694. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.308903>
- [23] Smith, C.L., Seigerman, M., Adusumalli, S., *et al.* (2021) Evolution and Outcomes of Premature Coronary Artery Disease. *Current Cardiology Reports*, **23**, Article No. 36. <https://doi.org/10.1007/s11886-021-01457-8>
- [24] An, T., Hao, J., Sun, S., *et al.* (2017) Efficacy of Statins for Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Osteoporosis International*, **28**, 47-57.
- [25] de Carvalho, R.D.P., Casarin, R.C.V., de Lima, P.O., *et al.* (2021) Statins with Potential to Control Periodontitis: From Biological Mechanisms to Clinical Studies. *Journal of Oral Biosciences*, **63**, 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.06.002>
- [26] Satny, M., Hubacek, J.A. and Vrablik, M. (2021) Statins and Inflammation. *Current Atherosclerosis Reports*, **23**, Article No. 80. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00977-6>
- [27] Giaginis, C., Papadopoulou, A., Zira, A., *et al.* (2012) Correlation of Plasma Osteoprotegerin (OPG) and Receptor Activator of the Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) Levels with Clinical Risk Factors in Patients with Advanced Carotid Atherosclerosis. *Medical Science Monitor*, **18**, CR597-CR604. <https://doi.org/10.12659/MSM.883485>