Advances in Clinical Medicine 临床医学进展, 2024, 14(4), 1218-1223
Published Online April 2024 in Hans. https://www.hanspub.org/journal/acm
https://doi.org/10.12677/acm.2024.1441146

Hans汉斯

糖皮质激素诱导股骨头坏死发病机制的研究进展

葛建勋[1]，孙　水[1,2*]

[1]山东大学，山东省立医院关节外科，山东　济南
[2]山东第一医科大学附属省立医院关节外科，山东　济南

收稿日期：2024年3月17日；录用日期：2024年4月11日；发布日期：2024年4月18日

摘　要

糖皮质激素作为治疗炎症和免疫性疾病的有效药物被广泛应用，但长期使用可能会导致许多严重的副作用，其中包括股骨头坏死。本文回顾了近年来在糖皮质激素诱导股骨头坏死发病机制方面取得的研究进展。研究发现，糖皮质激素通过增加活性氧产生和氧化应激、损伤内皮细胞和凝血功能、调节脂质代谢、影响细胞凋亡和自噬以及干扰非编码RNA的调控等途径参与股骨头坏死的发生发展。

关键词

糖皮质激素，股骨头坏死，发病机制，综述

Research Progress on the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head

Jianxun Ge[1], Shui Sun[1,2*]

[1]Department of Joint Surgery, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan Shandong
[2]Department of Joint Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan Shandong

Received: Mar. 17th, 2024; accepted: Apr. 11th, 2024; published: Apr. 18th, 2024

Abstract

Glucocorticoids are widely used as effective medications for the treatment of inflammatory and

*通讯作者。

文章引用: 葛建勋, 孙水. 糖皮质激素诱导股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 1218-1223. DOI: 10.12677/acm.2024.1441146

immune disorders, but prolonged use can lead to many serious side effects, including osteonecrosis of the femoral head. This article reviews the research progress made in recent years in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head. It was found that glucocorticoids are involved in the development of osteonecrosis of the femoral head by increasing reactive oxygen species production and oxidative stress, damaging endothelial cells and coagulation, regulating lipid metabolism, affecting apoptosis and autophagy, as well as interfering with the regulation of non-coding RNAs.

Keywords

Glucocorticoids, Osteonecrosis of the Femoral Head, Pathogenesis, Review

1. 引言

股骨头坏死(Osteonecrosis of the Femoral Head, ONFH)是一种常见的骨科疾病，在骨组织因缺血逐渐坏死的过程中，股骨头结构受损、塌陷和变形，最终导致髋关节功能障碍[1]。ONFH 作为一种致残率和疼痛程度较高的疾病，为患者带来沉重的心理和经济负担[2] [3]。ONFH 可分为创伤性和非创伤性两类，其中造成非创伤性 ONFH 最主要的原因是长期过量使用糖皮质激素(Glucocorticoids, GCs) [3]。GCs 是一类重要的内分泌激素，它们在调节许多生理过程中发挥着重要作用，包括免疫反应、炎症调节和代谢调控等[4]。近年来 GCs 在各种疾病中广泛应用，然而这也带来许多副作用，包括免疫抑制、骨质疏松、骨坏死和代谢异常等[5]。虽然 GCs 诱导的 ONFH 已经被广泛报道，但其发病机制仍不明确，这给疾病防治带来了困难[6]。因此，本文旨在综述近年来关于该疾病发病机制研究的最新进展，探讨研究的现状和前景，为进一步的临床治疗提供理论基础和新的思路。

2. 发病机制

2.1. 活性氧(ROS)堆积和氧化应激产生

ROS 是在细胞正常生理过程中，由线粒体氧化磷酸化或其他途径产生的一系列具有高度反应性的代谢副产物[7] [8]。适量的 ROS 在细胞内具有重要的信号传递和调控作用，但当其生成过量或清除能力不足时，则会导致氧化应激状态的出现[8]。Jiazheng Chen 等人发现生长分化因子 15 (GDF15)可以激活雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路，上调下游包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(Cat)和谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)在内的抗氧化剂的表达，从而抑制地塞米松诱导的骨髓间充质干细胞(BMSCs)中 ROS 过量产生，改善氧化还原失衡，减缓 ONFH 进展[9]。Ning Yang 等人的研究表明，GCs 阻止核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1)在胞质内解离，无法入核的 Nrf2 随后被泛素蛋白酶体降解，减少了抗氧化基因如血红素加氧酶-1 (HO-1)的转录和翻译，显著提升了 BMSCs 中 ROS 水平，引起 ONFH 发生[10]。

2.2. 内皮细胞损伤和凝血功能障碍

内皮细胞具有高度活跃的内分泌功能，通过释放生长因子和细胞因子等物质，影响包括骨细胞、

成骨细胞和破骨细胞在内的细胞活性和功能代谢，从而调节骨组织的生长和修复过程[11] [12]。Huachen Yu 等人研究发现在 GCs 的作用下，骨微血管内皮细胞(BMECs)的迁移能力降低，血管生成减少，凋亡增多[13]。而 Qingyu Zhang 等人提出 GCs 通过提高缺氧诱导因子 1α (HIF-1α)和 ROS 的产生，并下调内皮一氧化氮合酶(eNOS)的表达，导致血管内皮细胞损伤和凋亡，包括 BMECs，考虑到正常功能的骨血管网络是骨骼发育和再生的先决条件，BMEC 的损伤被认为与 GCs 诱发的骨坏死和骨质疏松症相关[14]。

ONFH 的特征是由于血液供应减少或中断导致股骨头细胞部分死亡，如果发生凝血功能障碍，包括血栓形成和纤溶功能低下，随之而来的是血流阻塞、静脉压升高、动脉血流受损、骨性缺氧和骨死亡[15]。有研究表明 GCs 可直接损伤内皮细胞，导致股骨头毛细血管疏松、凝血纤溶系统紊乱和血栓形成，从而严重减少松质骨的血供[16]。此外有学者发现服用大剂量可的松的兔出现脂肪细胞肥大和脂肪栓子，这些栓子导致股骨头软骨下骨中的血管闭塞，另一方面，软骨下血管和血窦内脂肪栓子的沉积激活了补体途径，导致免疫复合体沉积，随后激活血栓形成过程，如血管内凝血，导致 ONFH [17]。

2.3. 脂质代谢异常

脂质代谢紊乱一方面使 BMSCs 向脂肪细胞过度分化，阻断骨髓的血液供应，另一方面改变循环中脂质水平，在骨微血管中形成脂肪微栓子，继而导致骨内压升高，凝血－纤溶系统紊乱，最终引起骨缺血[18] [19]。一项血浆脂质组学分析显示 GCs 引起 ONFH 患者的脂质特征发生改变，具体表现为脂质 4-氨基苯甲酸的相对丰度显著增加，从而影响白细胞介素 2 (IL2)、肿瘤坏死因子(TNF)和环腺苷酸反应元件结合蛋白 1 (CREB1)等多个蛋白的表达[20]。Yini Jiang 等人发现 GCs 诱导大鼠股骨头中过氧化物酶体增殖物活化 γ 受体激动剂(PPARγ)表达增加，激活 Wnt 信号通路，增加下游包括低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5)和 runt 相关转录因子 2 (RUNX2)在内的蛋白表达，引起大鼠骨髓空骨陷窝比率、脂肪组织面积和脂肪细胞周长增加，而降脂药物普伐他汀可以逆转这一进程，从而预防 ONFH [21]。

2.4. 细胞凋亡和自噬

骨的发育和维持主要受成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收之间的动态平衡控制，破骨细胞凋亡减少或成骨细胞凋亡增多，导致骨吸收过度，超过骨形成速度，骨重塑平衡被打破，引起骨量丢失[22]。Shi-Cong Tao 等人研究表明在地塞米松处理的体外细胞模型和甲基强的松龙处理的体内大鼠模型中，由富血小板血浆(PRP)衍生的外泌体在内质网应激下，通过阻断 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)介导的对 B 细胞淋巴瘤 2 蛋白(Bcl2)表达的抑制，从而阻止 GCs 诱导的 ONFH 模型细胞凋亡[23]。Zhigang Nie 等人则发现糖原合成酶激酶 3β (GSK3β)基因敲除可减弱地塞米松通过线粒体途径引起的一系列效应，包括成骨细胞凋亡、线粒体跨膜电位丢失、细胞色素 C (CytC)从线粒体释放到胞浆和增加细胞凋亡相关蛋白的表达[24]。另外，D. Jia 等人提出 GCs 过量引起的早期、快速的骨质丢失是直接作用于破骨细胞使其凋亡的结果[25]。

自噬是唯一已知的细胞内降解机制，以移除功能失调的细胞器和氧化蛋白，虽然自噬可能会延长细胞在压力条件下的存活时间，但这是一个低效的过程，随着时间的推移，细胞积累代谢碎片，导致细胞和器官功能的下降[26]。Xin-Yuan Wang 等人发现一种新型药物 Pinocembrin 通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)信号通路激活自噬，减轻了 GCs 诱导的骨细胞凋亡，有助于预防和治疗 ONFH [27]。Yudi Han 等人则提出地塞米松可诱导成骨细胞发生自噬，并呈剂量依赖关系，自噬水平并不是随着时间的推移而继续增加，而是在 48 h 达到峰值，然后逐渐下降，随后成骨细胞凋亡水平逐渐上升[28]。自噬与细胞凋亡在骨相关细胞中的相互作用决定了 GCs 诱导的 ONFH 进程。

2.5. 非编码 RNA 的调控

MicroRNA(miRNA)是一种与靶基因的 3’非翻译区(3’UTRs)结合的非编码单链小 RNA 分子，广泛参与基因表达调控。Tingting Liu 等人研究结果显示中国北部人群 MIR17HG 和 MIR155HG 基因突变与激素性 ONFH 易感性相关，为 ONFH 的早期发现和预防提供新的证据[29]。Fei Xu 等人发现 GCs 诱导 miR-141 过表达，而 E2F 转录因子 3 (E2F3)作为 miR-141 调节细胞增殖的靶点被抑制表达，进一步减少了 BMSCs 的成骨分化，造成 ONFH [30]。另一项临床研究则提示类固醇治疗会增加人类 miR-10a-5p、miR-99a-5p 和 miR-21-5p 的血清水平[31]。

长链非编码 RNA (lncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子，虽然它们不编码蛋白质，但在基因表达和细胞功能调控中具有重要作用。Shuai Xiang 等人通过分离正常人和 ONFH 患者的 BMSCs，RNA 测序鉴定差异表达，证实了 lncRNA RP11-154D6 促进了 BMSCs 的成骨分化，而抑制了成脂分化，激素性 ONFH 患者 BMSCs 中存在 lncRNA 的异常表达[32]。Yadi Wu 等人发现 lncRNA FGD5-AS1 的过表达促进了地塞米松处理的 BMSCs 的细胞增殖，抑制了细胞凋亡，在机制上，lncRNA FGD5-AS1 可以结合 miR-296-5p 上调 BMSCs 中信号转导和转录激活因子 3(STAT3)的表达，为 ONFH 治疗提供新思路[33]。

环状 RNA (circRNA)是一种闭合环形的 RNA 分子，主要存在于细胞质中，通过调节其靶标 miRNA 来调节生物学功能。Xiaobo Feng 等人定位了激素诱导的 ONFH 中 BMSCs 的 circRNA 表达谱，并确定了一个显著上调的关键 circRNA，称为 circHGF，其通过靶向 miR-25-3p/Smad7 轴抑制 ONFH 中 BMSCs 的增殖和成骨分化[34]。Peng Peng 等人则揭示了 circHIPK3 下调在类固醇诱导的 ONFH 中的作用，通过靶向 miR-7 和激活 Kruppel 样因子 4 (KLF4)/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路抑制 BMECs 的凋亡，从而促进细胞的增殖、迁移和血管生成[35]。

3. 小结与展望

目前，GCs 诱导 ONFH 的发病机制研究取得了越来越多的进展。从细胞水平到分子水平，人们不断深入探索 GCs 对骨细胞氧化应激、股骨头血供、脂质代谢和骨细胞功能等方面的影响。当前学界的共识是 GCs 诱导 ONFH 并非是单一成因，而是在多重因素共同作用下形成。然而，当前的研究仍面临挑战，对于疾病发生的确切机制在不同动物模型和临床研究中观察到的结果之间存在差异。随着综合利用基础研究和临床研究的成果，相信未来可以更好地理解和应对 GCs 诱导的 ONFH 这一挑战性疾病。

参考文献

[1] Zhao, D., Zhang, F., Wang, B., *et al*. (2020) Guidelines for Clinical Diagnosis and Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head in Adults (2019 Version). *Journal of Orthopaedic Translation*, **21**, 100-110. https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.12.004

[2] Huang, C., Qing, L., Xiao, Y., *et al*. (2023) Insight into Steroid-Induced ONFH: The Molecular Mechanism and Function of Epigenetic Modification in Mesenchymal Stem Cells. *Biomolecules*, **14**, Article 4. https://doi.org/10.3390/biom14010004

[3] Hines, J.T., Jo, W.L., Cui, Q., *et al*. (2021) Osteonecrosis of the Femoral Head: An Updated Review of ARCO on Pathogenesis, Staging and Treatment. *Journal of Korean Medical Science*, **36**, e177. https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e177

[4] Scherholz, M.L., Schlesinger, N. and Androulakis, I.P. (2019) Chronopharmacology of Glucocorticoids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **151-152**, 245-261. https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.02.004

[5] Timmermans, S., Souffriau, J. and Libert, C. (2019) A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article 1545. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545

[6] Tan, G., Kang, P.D. and Pei, F.X. (2012) Glucocorticoids Affect the Metabolism of Bone Marrow Stromal Cells and

Lead to Osteonecrosis of the Femoral Head: A Review. *Chinese Medical Journal*, **125**, 134-139.

[7] Wang, L., Lu, Z., Zhao, J., *et al*. (2021) Selective Oxidative Stress Induces Dual Damage to Telomeres and Mitochondria in Human T Cells. *Aging Cell*, **20**, e13513. https://doi.org/10.1111/acel.13513

[8] Tolba, M.F., El-Serafi, A.T. and Omar, H.A. (2017) Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects against Glucocorticoid-Induced Osteoporosis *in Vivo*: Impact on Oxidative Stress and RANKL/OPG Signals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **324**, 26-35. https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.03.021

[9] Chen, J., Cui, Z., Wang, Y., *et al*. (2022) Cyclic Polypeptide D7 Protects Bone Marrow Mesenchymal Cells and Promotes Chondrogenesis during Osteonecrosis of the Femoral Head *via* Growth Differentiation Factor 15-Mediated Redox Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**, Article ID: 3182368. https://doi.org/10.1155/2022/3182368

[10] Yang, N., Sun, H., Xue, Y., *et al*. (2021) Inhibition of MAGL Activates the Keap1/Nrf2 Pathway to Attenuate Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Clinical and Translational Medicine*, **11**, e447. https://doi.org/10.1002/ctm2.447

[11] Zuo, W., Guo, W.S., Yu, H.C., *et al*. (2020) Role of Junction-Mediating and Regulatory Protein in the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Endothelial Cell Lesions. *Orthopaedic Surgery*, **12**, 964-973. https://doi.org/10.1111/os.12680

[12] Salhotra, A., Shah, H.N., Levi, B., *et al*. (2020) Mechanisms of Bone Development and Repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**, 696-711. https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w

[13] Yu, H., Liu, P., Zuo, W. and Longaker, M.T. (2020) Decreased Angiogenic and Increased Apoptotic Activities of Bone Microvascular Endothelial Cells in Patients with Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *BMC Musculoskeletal Disorders*, **21**, Article No. 277. https://doi.org/10.1186/s12891-020-03225-1

[14] Zhang, Q., Li, T., Li, Z., *et al*. (2022) Autocrine Activity of Extracellular Vesicles Induced by Icariin and Its Effectiveness in Glucocorticoid-Induced Injury of Bone Microvascular Endothelial Cells. *Cells*, **11**, Article 1921. https://doi.org/10.3390/cells11121921

[15] Kim, T.H., Baek, S.H., Lim, J.O., *et al*. (2015) Genetic Variation in the Coagulation Factor V Gene and Risk of Femoral Head Osteonecrosis. *Molecular Medicine Reports*, **12**, 4434-4440. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4000

[16] Zhang, Y., Yin, J., Ding, H., *et al*. (2016) Vitamin K2 Ameliorates Damage of Blood Vessels by Glucocorticoid: A Potential Mechanism for Its Protective Effects in Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in a Rat Model. *International Journal of Biological Sciences*, **12**, 776-785. https://doi.org/10.7150/ijbs.15248

[17] Chan, K.L. and Mok, C.C. (2012) Glucocorticoid-Induced Avascular Bone Necrosis: Diagnosis and Management. *The Open Orthopaedics Journal*, **6**, 449-457. https://doi.org/10.2174/1874325001206010449

[18] Wang, X.Y., Ma, T.L., Chen, K.N., *et al*. (2021) Accumulation of LDL/Ox-LDL in the Necrotic Region Participates in Osteonecrosis of the Femoral Head: A Pathological and *in Vitro* Study. *Lipids in Health and Disease*, **20**, Article No. 167. https://doi.org/10.1186/s12944-021-01601-x

[19] Yuan, L., Li, W., Wang, X., *et al*. (2018) The Relationship Between Genetic Polymorphisms in Apolipoprotein E (ApoE) Gene and Osteonecrosis of the Femoral Head Induced by Steroid in Chinese Han Population. *Genes & Genomics*, **40**, 225-231. https://doi.org/10.1007/s13258-017-0625-5

[20] Yan, Y., Wang, J., Huang, D., *et al*. (2022) Plasma Lipidomics Analysis Reveals Altered Lipids Signature in Patients with Osteonecrosis of the Femoral Head. *Metabolomics*, **18**, Article No. 14. https://doi.org/10.1007/s11306-022-01872-0

[21] Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, H., *et al*. (2014) Pravastatin Prevents Steroid-Induced Osteonecrosis in Rats by Suppressing PPARγ Expression and Activating Wnt Signaling Pathway. *Experimental Biology and Medicine*, **239**, 347-355. https://doi.org/10.1177/1535370213519215

[22] Jiang, Y., Zhang, Y., Chen, W., *et al*. (2014) Achyranthes Bidentata Extract Exerts Osteoprotective Effects on Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats by Regulating RANKL/RANK/OPG Signaling. *Journal of Translational Medicine*, **12**, Article No. 334. https://doi.org/10.1186/s12967-014-0334-7

[23] Tao, S.C., Yuan, T., Rui, B.Y., *et al*. (2017) Exosomes Derived from Human Platelet-Rich Plasma Prevent Apoptosis Induced by Glucocorticoid-Associated Endoplasmic Reticulum Stress in Rat Osteonecrosis of the Femoral Head Via the Akt/Bad/Bcl-2 Signal Pathway. *Theranostics*, **7**, 733-750. https://doi.org/10.7150/thno.17450

[24] Nie, Z., Chen, S. and Peng, H. (2019) Glucocorticoid Induces Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats through GSK3β-Mediated Osteoblast Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **511**, 693-699. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.118

[25] Jia, D., O'Brien, C.A., Stewart, S.A., *et al*. (2006) Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. *Endocrinology*, **147**, 5592-5599. https://doi.org/10.1210/en.2006-0459

[26] Jia, J., Yao, W., Guan, M., *et al*. (2011) Glucocorticoid Dose Determines Osteocyte Cell Fate. *FASEB Journal*, **25**,

3366-3376. https://doi.org/10.1096/fj.11-182519

[27] Wang, X.Y., Gong, L.J., Huang, J.M., *et al*. (2020) Pinocembrin Alleviates Glucocorticoid-Induced Apoptosis by Activating Autophagy *via* Suppressing the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Osteocytes. *European Journal of Pharmacology*, **880**, Article ID: 173212. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173212

[28] Han, Y., Zhang, L., Xing, Y., *et al*. (2018) Autophagy Relieves the Function Inhibition and Apoptosis-Promoting Effects on Osteoblast Induced by Glucocorticoid. *International Journal of Molecular Medicine*, **41**, 800-808. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3270

[29] Liu, T., Cao, Y., Han, C., *et al*. (2021) Association of MIR17HG and MIR155HG Gene Variants with Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in the Population of Northern China. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **16**, Article No. 673. https://doi.org/10.1186/s13018-021-02669-y

[30] Xue, F., Wu, J., Feng, W., *et al*. (2022) MicroRNA-141 Inhibits the Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Steroid-Induced Osteonecrosis *via* E2F3. *Molecular Medicine Reports*, **26**, Article No. 234. https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12750

[31] Li, Z., Jiang, C., Ye, C., *et al*. (2018) MiR-10a-5p, MiR-99a-5p and MiR-21-5p Are Steroid-Responsive Circulating MicroRNAs. *American Journal of Translational Research*, **10**, 1490-1497.

[32] Xiang, S., Li, Z. and Weng, X. (2019) The Role of LncRNA RP11-154D6 in Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head through BMSC Regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 18435-18445. https://doi.org/10.1002/jcb.29161

[33] Wu, Y., Fang, L., Gao, Y., *et al*. (2022) LncRNA FGD5-AS1 Regulates Bone Marrow Stem Cell Proliferation and Apoptosis by Affecting MiR-296-5p/STAT3 Axis in Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Journal of Healthcare Engineering*, **2022**, Article ID: 9364467. https://doi.org/10.1155/2022/9364467

[34] Feng, X., Xiang, Q., Jia, J., *et al*. (2022) CircHGF Suppressed Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of BMSCs in ONFH Via Inhibiting MiR-25-3p Binding to SMAD7. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **28**, 99-113. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.02.017

[35] Peng, P., He, W., Zhang, Y.X., *et al*. (2023) CircHIPK3 Promotes Bone Microvascular Endothelial Cell Proliferation, Migration and Angiogenesis by Targeting MiR-7 and KLF4/VEGF Signaling in Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, **32**, 43-55. https://doi.org/10.17219/acem/153042