

# Содержание фибронектина в сыворотке крови при синдроме поликистозных яичников у женщин с различной массой тела

К.м.н. Л.А. МОГИЛЬНИЦКАЯ

Хмельницкая областная больница, Хмельницкий, Украина

**Цель исследования** — изучить содержание фибронектина в сыворотке крови (как маркера эндотелиальной дисфункции) при синдроме поликистозных яичников (СПКЯ) у женщин с разной массой тела, а также взаимосвязь уровня фибронектина с эндотелийзависимой дилатацией и другими факторами риска сердечно-сосудистой патологии.

**Материал и методы.** Обследованы 62 женщины: 45 — с СПКЯ (23 женщины с ожирением, 22 — с нормальной массой тела) и 20 — контрольная группа. Уровень фибронектина определяли иммуноферментным методом. Эндотелийзависимую дилатацию измеряли по стандартной технологии Целмеймайера.

**Результаты.** При СПКЯ независимо от массы тела пациенток содержание фибронектина в сыворотке крови оказалось выше, чем у женщин контрольной группы. Уровень фибронектина у пациенток с СПКЯ и ожирением был выше, чем у женщин с СПКЯ и нормальной массой тела. Выявлена прямая корреляция между содержанием фибронектина и индексом массы тела, индексом НОМА, показателями липидного обмена, уровнем андрогенов и обратная — с эндотелийзависимой дилатацией.

**Заключение.** СПКЯ как в сочетании с ожирением, так и без него, сопровождается повышением уровня фибронектина в сыворотке крови. Гиперандрогения, дислипидемия, инсулинорезистентность, ожирение могут играть роль в повышении этого уровня. Повышение содержания фибронектина может быть одним из проявлений эндотелиальной дисфункции при СПКЯ.

**Ключевые слова:** фибронектин, синдром поликистозных яичников, инсулинорезистентность, эндотелиальная дисфункция.

## Serum levels of fibronectin in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome

L.A. MOGYLNYTSKA

Khmelnysky regional hospital, Khmelnytsky, Ukraine

**Aim** — to investigate serum level of fibronectin in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS) as a marker of endothelial dysfunction, and the relationship of that factor to the endothelium-dependent dilatation and other risk factors for cardiovascular disease.

**Material and methods.** We study 62 women: 45 — with PCOS (23 obese women, 22 — non-obese) and 20 — a control group. Serum level of fibronectin was determined by ELISA. Endothelium-dependent dilatation was measured by test of Celermajer. Data was presented as mean  $\pm$  SD.

**Results.** We found an elevation of serum level of fibronectin in obese women with PCOS compared to control ( $258,12 \pm 48,47$  and  $196,34 \pm 46,68$  pmol/ml respectively;  $p < 0,05$ ), in non-obese women compared to control ( $227,62 \pm 35,36$  and  $196,34 \pm 46,68$  pmol/ml respectively,  $p < 0,05$ ). Serum level of fibronectin in obese was higher than non-obese women ( $258,12 \pm 48,47$  и  $227,62 \pm 35,36$  pmol/ml respectively,  $p < 0,05$ ). Also, there are a correlation between the serum levels of fibronectin and BMI, HOMA index, lipid metabolism, androgens in PCOS women obese and non-obese ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion.** Serum level of fibronectin is elevated in obese and non-obese women with PCOS. Hyperandrogenemia, dyslipidemia, insulin resistance, obesity appears to be significant factor to contributing elevation of fibronectin. The revealed change of fibronectin could reflect an endothelial dysfunction in PCOS.

**Keywords:** fibronectin, polycystic ovary syndrome, insulin resistance, endothelial dysfunction.

doi: 10.14341/probl201662427-31

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) наблюдается у 5–10% женщин репродуктивного возраста [1] и характеризуется гиперандрогемией, нарушением менструального цикла, ановуляцией, бесплодием [2]. При СПКЯ возрастает также число факторов сердечно-сосудистого риска [3] и раннего атеросклероза [4]. Инсулинорезистентность и гиперинсулинизм, которые часто выявляются у пациенток с СПКЯ, связаны с хроническим воспалением [5] и увеличением сердечно-сосудистого риска [6].

Эндотелиальная дисфункция играет важную роль в развитии атеросклеротического процесса. С нарушения функций клеток эндотелия, возможно, и начинается процесс формирования атероскле-

ротического поражения. Функциональное состояние эндотелия характеризуется с одной стороны эндотелийзависимой дилатацией, а с другой — содержанием эндотелиальных вазоактивных факторов.

Гликопротеин фибронектин присутствует в плазме, экстрацеллюлярном матриксе и на поверхности клеток. Он способствует межклеточным взаимодействиям и взаимодействию клеток с экстрацеллюлярным матриксом, принимая участие в формировании и реконструкции тканей [7].

Фибронектин способен прикрепляться к разнообразным клеткам и присоединять различные моле-

### Сведения об авторе:

Могильницкая Лилия Анатольевна — к.м.н., врач-эндокринолог, Хмельницкая областная больница, Хмельницкий, Украина, e-mail: moglntska@mail.ua

© Л.А. Могильницкая, 2016

Таблица 1. Гормональный статус обследованных лиц

| Показатель                             | Контрольная группа | СПКЯ с ожирением | СПКЯ с нормальной массой тела |
|----------------------------------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| Число обследованных лиц                | 20                 | 23               | 22                            |
| Оценка по шкале Ферриман—Галвея, баллы | 5,25               | 10,04            | 9,68                          |
| ЛГ, МЕ/л                               | 4,83±1,64          | 7,26±1,65        | 7,54±2,3                      |
| ФСГ, МЕ/л                              | 6,7±1,68           | 5,51±1,12        | 4,78±1,78                     |
| ЛГ/ФСГ                                 | 0,7±0,125          | 1,3±0,21         | 1,84±0,44                     |
| Общий тестостерон, нмоль/л             | 3,15±0,54          | 5,37±1,36        | 5,13±1,39                     |
| Свободный тестостерон, нмоль/л         | 2,98±0,81          | 5,18±1,71        | 4,99±1,41                     |
| ДГЭА-С, нмоль/л                        | 264,22±107,11      | 518,43±118,39    | 506,28±94,75                  |
| ССГ, нмоль/л                           | 48,23±8,13         | 42,51±4,8        | 41,96±5,15                    |
| ИсвТ                                   | 6,74±1,77          | 12,53±2,74       | 12,24±2,83                    |

кулы — коллаген, гликозаминогликаны, фибрин, интегрин и др. [8].

Содержание фибронектина в сыворотке может быть одним из маркеров эндотелиальной активации, отображающих изменения экстрацеллюлярного матрикса и сосудистой стенки при патологических состояниях.

Цель исследования — изучить содержание фибронектина в сыворотке крови при СПКЯ у женщин с разной массой тела, а также связь уровня фибронектина с эндотелийзависимой дилатацией и другими факторами сердечно-сосудистой риска.

## Материал и методы

Обследованы 62 женщины: 45 — с СПКЯ и 20 — контрольная группа. Женщины с СПКЯ были разделены на две группы: с ожирением ( $n=23$ ) и с нормальной массой тела ( $n=22$ ). Все женщины добровольно подписали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен на заседании локального этического комитета Хмельницкой областной больницы (протокол №3 от 8.02.12).

Диагноз СПКЯ устанавливали при наличии двух из трех ниже перечисленных признаков: олиго- и/или аменорея (6 менструальных циклов за текущий год), гиперандрогенизм, структурно измененные полициклические яичники [9]. Андрогенизм определяли по совокупности клинически проявлений, таких как гирсутизм (8 баллов и более по шкале Ферриман—Галвея) [10], акне, алоpecia по мужскому типу, а также лабораторных признаков, таких как повышение уровня общего и свободного тестостерона (Т), дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-С), сексвязывающего глобулина (ССГ), индекса свободного тестостерона (ИсвТ).

С целью исключения других причин нарушения менструального цикла определяли уровни ТТГ, ПРЛ, 17-оксипрогестерона в сыворотке и кортизола в суточной моче. У всех обследованных женщин эти

показатели были в норме. ИсвТ рассчитывали по формуле:  $\text{Общий Т} \times 100 / \text{ССГ}$  [11].

Яичники считали поликистозно измененными при наличии 12 фолликулов и более диаметром 2—9 мм и/или при размерах яичников более 10 см<sup>3</sup>.

У всех женщин определяли индекс массы тела (ИМТ). ИМТ женщин с СПКЯ и нормальной массой тела составлял 18—25 кг/м<sup>2</sup>, а женщин с СПКЯ и ожирением — 30—40 кг/м<sup>2</sup>. Для оценки типа ожирения измеряли отношение окружности талии и бедер (ОТ/ОБ). Окружность талии у женщин с ожирением превышала 80 см, а ОТ/ОБ было больше 0,8, что позволило диагностировать центральный тип ожирения. Гормональный статус обследованных женщин приведен в табл. 1.

У женщин с ожирением с целью исключения сахарного диабета и нарушения толерантности к глюкозе проводили стандартный тест толерантности к глюкозе.

Женщины контрольной группы соответствовали по возрасту женщинам с СПКЯ. По данным УЗИ, структура яичников у них была нормальной, менструальный цикл длительностью от 21 до 35 дней — регулярным, клинические и лабораторные признаки гиперандрогенизма отсутствовали.

Среди обследованных не было беременных, курящих и женщин, страдающих артериальной гипертензией. В исследование не включались женщины, употреблявшие в течение последних 6 мес противозачаточные средства, антиандрогены, глюкокортикоиды, а также препараты, способные влиять на состояние эндотелия (нитраты, статины, антагонисты кальция, ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина).

Инсулинорезистентность оценивали по индексу НОМА [12]. Дополнительно рассчитывали глюкозо-инсулиновое соотношение (GIR) [13]. Клинико-лабораторная характеристика обследованных лиц приведена в табл. 2.

Эндотелийзависимую дилатацию измеряли по стандартной методике [22]. Уровень фибронектина

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика обследованных женщин

| Показатель                      | Контрольная группа | СПКЯ с ожирением | СПКЯ с нормальной массой тела |
|---------------------------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| Возраст, годы                   | 20,15±2,15         | 22,82±3,03       | 22,81±2,03                    |
| ИМТ, кг/м <sup>2</sup>          | 20,79±2,31         | 36,41±6,42       | 22,71±2,37                    |
| ОТ, см                          | 67,7±4,31          | 85,86±6,43       | 82,18±5,55                    |
| Глюкоза крови натощак, ммоль/л  | 4,8±0,53           | 5,05±0,8         | 4,73±0,92                     |
| Гликозилированный гемоглобин, % | 5,33±0,43          | 5,5±0,5          | 5,57±0,51                     |
| Общий холестерин, ммоль/л       | 3,79±0,52          | 5,55±1,75        | 4,66±0,74                     |
| ЛПВП, ммоль/л                   | 1,4±0,17           | 1,12±0,24        | 1,23±0,2                      |
| ЛПНП, ммоль/л                   | 2,38±0,53          | 3,49±0,76        | 3,02±0,62                     |
| Триглицериды, ммоль/л           | 1,47±0,28          | 2,51±0,64        | 1,99±0,55                     |
| Инсулин, пмоль/л                | 43,45±10,46        | 113,55±16,08     | 61,68±16,67                   |
| Индекс НОМА                     | 9,19±2,09          | 25,49±5,61       | 13,3±5,4                      |
| GIR                             | 11,77±3,44         | 4,53±0,97        | 7,98±2,03                     |
| Эндотелийзависимая дилатация, % | 9,01±4,2           | 3,47±1,2         | 4,26±1,71                     |

определяли иммуноферментным методом с использованием сорбционных колонок Amprer (Amersham Lifesilence) и тест-систем Amersham pharmacia biotech. Исследования проводили на ELISA-анализаторе Stat Fax-303 Plus.

Статистическую обработку данных проводили методами вариационной и описательной статистики с помощью стандартного пакета статистического расчета данных программы Microsoft Excel 2007. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Значимость различий средних оценивали по критерию *t*-Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для оценки корреляций между показателями рассчитывали коэффициент Пирсона.

## Результаты

Содержание фибронектина в сыворотке крови у женщин с СПКЯ и ожирением составило  $258,12 \pm 48,47$  пмоль/мл, у женщин с СПКЯ и нормальной массой тела —  $227,62 \pm 35,36$  пмоль/мл и у женщин контрольной группы —  $196,34 \pm 46,68$  пмоль/мл. Содержание фибронектина в сыворотке у женщин с СПКЯ и ожирением превышало показатель в контроле на 31,63% ( $p < 0,05$ ), а у женщин с СПКЯ и нормальной массой тела — на 15,81% ( $p < 0,05$ ). Различия между этими группами (13,65%) также были статистически незначимыми ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок).

Нами выявлена статистически значимая обратная корреляция ( $p < 0,05$ ) между уровнем фибронектина и эндотелийзависимой дилатацией при СПКЯ независимо от наличия ожирения, а также прямая его корреляция с ИМТ в группе пациенток с СПКЯ и ожирением (табл. 3).

У пациенток с СПКЯ, судя по индексу НОМА и GIR, независимо от наличия ожирения имела место инсулинорезистентность (см. табл. 2). При этом мы выявили статистически значимую ( $p < 0,05$ ) прямую

связь содержания фибронектина с уровнем инсулина и индексом НОМА, а также обратную связь этого показателя с GIR (см. табл. 3).

У женщин с СПКЯ независимо от наличия ожирения наблюдалась дислипидемия (повышение уровня общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП и снижение уровня ЛПВП). Поэтому следовало оценить возможное влияние этих сдвигов на уровень фибронектина. В группе пациенток с СПКЯ как при наличии ожирения, так и без него имела статистически значимая ( $p < 0,05$ ) прямая корреляция уровня фибронектина с содержанием общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП, а также, обратная корреляция этого показателя с содержанием ЛПВП (см. табл. 3).

У пациенток с СПКЯ независимо от наличия ожирения выявлена также статистически значимая ( $p < 0,05$ ) прямая корреляция содержания фибронектина с уровнями общего и свободного Т и ИсвТ (см. табл. 3).

## Обсуждение

Выявленное нами повышение уровня фибронектина при СПКЯ у женщин, независимо от их массы тела, может указывать на развитие эндотелиальной дисфункции при данной патологии. Нарушение функции эндотелия — одно из первых проявлений атеросклероза. Метаболические нарушения при СПКЯ появляются в подростковом возрасте и могут привести к преждевременному развитию атеросклероза. Это подтверждается обнаруженной нами обратной корреляцией уровня фибронектина с эндотелийзависимой дилатацией у обследованных пациенток. Более значительное повышение уровня фибронектина у женщин с СПКЯ и ожирением может отражать роль избыточной массы тела в развитии данных нарушений. На это указывает корреляция уровня фибронектина в сыворотке с ИМТ у пациенток данной группы.

Таблица 3. Коэффициенты корреляций уровня фибронектина с другими показателями

| Показатель                   | СПКЯ с ожирением | СПКЯ с нормальной массой тела |
|------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Эндотелийзависимая дилатация | −0,57            | −0,5                          |
| Инсулин                      | 0,8              | 0,97                          |
| НОМА                         | 0,47             | 0,87                          |
| GIR                          | −0,62            | −0,72                         |
| ИМТ                          | 0,69             | 0,02                          |
| Общий холестерин             | 0,69             | 0,79                          |
| Триглицериды                 | 0,61             | 0,66                          |
| ЛПНП                         | 0,74             | 0,82                          |
| ЛПВП                         | −0,76            | −0,88                         |
| Общий тестостерон            | 0,83             | 0,92                          |
| Свободный тестостерон        | 0,85             | 0,91                          |
| ИсвТ                         | 0,75             | 0,79                          |

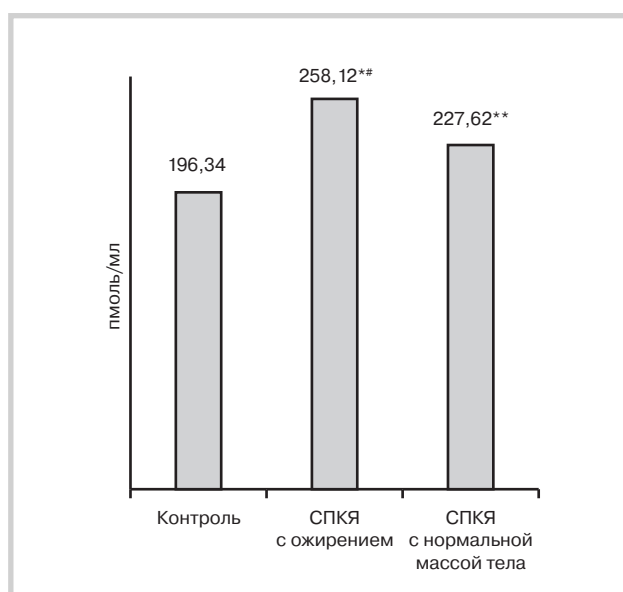
СПКЯ — это состояние, связанное с нарушением не только репродуктивной функции, но и обмена веществ [14]. Даже в молодом возрасте, высокий ИМТ ассоциируется с риском многих заболеваний [15]. Имеются данные о связи гиперандрогении и/или кист яичников связаны с избыточной массой тела [13]. Абдоминальное ожирение наблюдается у 50 % женщин с СПКЯ [17]. Отложения висцерального жира сами по себе способствуют гормональным сдвигам [16].

Важная роль в развитии СПКЯ и сахарного диабета 2-го типа у женщин с ожирением принадлежит инсулинорезистентности [17]. Недавно показано, что у женщин с СПКЯ, даже при нормальном уровне глюкозы в крови, периферическая чувствительность к инсулину такая же, как при предиабете [18]. Мы выявили инсулинорезистентность у пациенток с СПКЯ независимо от массы их тела. По-видимому, это играет роль в повышении уровня фибронектина при СПКЯ, так как нами обнаружена прямая корреляция содержания фибронектина с уровнем инсулина и индексом НОМА, а также обратная корреляция — с коэффициентом GIR.

Многочисленными исследованиями установлено связь между инсулинорезистентностью и эндотелиальной дисфункцией. Имеются данные, что повышение уровня свободных жирных кислот и воспалительных цитокинов (ФНО, лептин) индуцирует окислительный стресс, который и есть причина эндотелиальной дисфункции [19, 20].

У женщин с СПКЯ независимо от массы тела наблюдалась дислипидемия (повышение уровня общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП и снижение уровня ЛПВП), что могло играть роль в повышении содержания фибронектина. Это подтверждается выявленной нами корреляционной связью между уровнем фибронектина и перечисленными сдвигами.

Повышенный при СПКЯ уровень андрогенов может способствовать развитию инсулинорезистент-



#### Содержание фибронектина в сыворотке крови.

Примечание.\* —  $p < 0,01$  между группой лиц с СПКЯ и ожирением и контрольной группой; \*\* —  $p < 0,05$  между группой лиц с СПКЯ и нормальной массой тела и контрольной группой; # —  $p < 0,01$  между группой лиц с СПКЯ и ожирением и лиц с СПКЯ и нормальной массой тела.

ности посредством активации андрогенных рецепторов в адипоцитах [5]. С другой стороны, обнаружена обратная корреляция между уровнем андрогенов и сердечно-сосудистым риском у пре- и постменопаузальных женщин [21]. У пациенток с СПКЯ независимо от массы тела нами выявлено повышение содержания общего и свободного Т, ДГЭА-С, ИсвТ и снижение уровня ССГ. Роль этих сдвигов в повышении уровня фибронектина при СПКЯ подтверждается результатами корреляционного анализа.

#### Заключение

СПКЯ как в сочетании с ожирением, так и без него характеризуется повышенным содержанием

фибронектина в сыворотке крови. Последнее может быть связано с гиперандрогенией, дислипидемией, инсулинорезистентностью и (в определенной мере) с ожирением. Повышение содержания фибронектина в сыворотке при СПКЯ может отражать развитие

эндотелиальной дисфункции при данной патологии.

**Информация о финансировании и конфликте интересов.**  
Исследование выполнено на личные средства автора.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007;370(9588):685-697. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61345-2
2. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006;113(10):1148-1159. doi: 10.1111/j.1471-0528.2006.00990.x
3. Orio FJR, Palomba S, Spinelli L, et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3696-3701. doi: 10.1210/jc.2003-032049
4. Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, et al. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):742-746. doi: 10.1210/jcem.87.2.8199
5. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2005;26(2):251-282. doi: 10.1210/er.2004-0004
6. Tzeng CR, Chang YC, Chang YC, et al. Cluster analysis of cardiovascular and metabolic risk factors in women of reproductive age. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1404-1410. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.023
7. Hynes RO. Fibronectins. *Sci. Am*. 1986;254(6):42-51.
8. Tomasini-Johansson BR, Annis DS, Mosher DF. The N-terminal 70-kDa fragment of fibronectin binds to cell surface fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin. *Matrix Biol*. 2006;25(5):282-293. doi: 10.1016/j.matbio.2006.02.002
9. Rotterdam EA-SPcwg. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-47.
10. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961;21:1440-1447. doi: 10.1210/jcem-21-11-1440
11. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3666-3672. doi: 10.1210/jcem.84.10.6079
12. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419. doi: 10.1007/BF00280883
13. Muolokwu E, Sanchez J, Bercaw JL, et al. Paratubal cysts, obesity, and hyperandrogenism. *J Pediatr Surg*. 2011;46(11):2164-2167. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.07.011
14. Yildiz BO, Azziz R, Androgen E. Androgen excess and PCOS Society. Ovarian and adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome: report of the 4th special scientific meeting of the androgen excess and PCOS Society. *Fertil Steril*. 2010;94(2):690-693. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.058
15. Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, et al. Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. *N Engl J Med*. 2011;365(20):1876-1885. doi: 10.1056/nejmoa1010112
16. Rossi B, Sukalich S, Droz J, et al. Prevalence of metabolic syndrome and related characteristics in obese adolescents with and without polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocr Metab*. 2008;93(12):4780-4786. doi: 10.1210/jc.2008-1198
17. Toscani MK, Mario FM, Radavelli-Bagatini S, Spritzer PM. Insulin resistance is not strictly associated with energy intake or dietary macronutrient composition in women with polycystic ovary syndrome. *Nutr Res*. 2011;31(2):97-103. doi: 10.1016/j.nutres.2011.01.009
18. Amato MC, Vesco R, Vigneri E, et al. Hyperinsulinism and polycystic ovary syndrome (PCOS): role of insulin clearance. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(12):1319-1326. doi: 10.1007/s40618-015-0372-x
19. Wojciechowski P, Lipowska A, Rys P, et al. Impact of FTO genotypes on BMI and weight in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Diabetologia*. 2012;55(10):2636-2645. doi: 10.1007/s00125-012-2638-6
20. Xu N, Kwon S, Abbott DH, et al. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes on prenatally androgenized rhesus monkeys. *PLoS One*. 2011;6(11):e27286. doi: 10.1371/journal.pone.0027286
21. Corbould A. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol*. 2007;192(3):585-594. doi: 10.1677/joe.1.07070
22. Celmaj DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *The Lancet*. 1992;340(8828):1111-1115. doi: 10.1016/0140-6736(92)93147-f