

Предикторы перехода ремиттирующего рассеянного склероза во вторично-прогрессирующий

М. А. Урбан, Н. В. Комиссарова, И. И. Хазиева, И. И. Шамсутдинова

ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск

РЕЗЮМЕ

В настоящее время рассеянный склероз (РС) является второй по частоте причиной инвалидизации лиц молодого возраста после травмы [1]. Примерно 85% пациентов с РС имеют ремиттирующее течение, которое в половине случаев в течение 15–20 лет переходит в неуклонное прогрессирующее с сохранением активности или без нее в виде обострений или новых активных очагов. Диагностика вторично-прогрессирующего РС (ВПРС) затруднена, и диагноз ВПРС ставится ретроспективно. Поэтому мы в нашей статье рассматриваем варианты надежных и объективных биомаркеров, которые служат предикторами конверсии и являются источниками для перспективного прогнозирования заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ремиттирующий рассеянный склероз, вторично-прогрессирующий рассеянный склероз, предикторы, расширенная шкала инвалидности, функциональный комплекс рассеянного склероза, биомаркер.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Predictors of transition from relapsing-remitting multiple sclerosis to secondary progressive

M. A. Urban, N. V. Komissarova, I. I. Khazieva, I. I. Shamsutdinova

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

SUMMARY

Currently, the multiple sclerosis (MS) is the second most common cause of disability in young people after injury [1]. Approximately 85% of patients with MS have a relapsing course, which in a half of cases occurs within 15–20 years, culminating in steady progression with or without activity remaining in the form of an exacerbation or new active foci. Diagnosis of secondary progressive MS (SPMS) is difficult and the diagnosis of SPMS is made retrospectively. Therefore, in our article, we considered options for reliable and objective biomarkers that are natural predictors of conversion and are sources for long-term prediction of diseases.

KEYWORDS: relapsing multiple sclerosis, secondary progressive multiple sclerosis, predictors, expanded disability status scale, multiple sclerosis functional complex, biomarker.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Несмотря на быстрые темпы развития современной медицины, обширные всесторонние исследования, изучение различных аспектов рассеянного склероза остается актуальной проблемой, медицинская и социальная значимость которой обусловлена высокой частотой встречаемости, заболеваемостью лиц молодого трудоспособного возраста, возможностью быстрого развития стойкой инвалидизации при недостаточной эффективности в ряде случаев существующих терапевтических средств.

Ремиттирующая форма рассеянного склероза имеет волнообразное течение с четко выделяющимися периодами обострений, после которых следует полное или частичное восстановление функций организма. Поэтому отсрочка перехода ремиттирующего рассеянного склероза во вторично-прогрессирующий является основной терапевтической целью.

На прогрессирующее течение рассеянного склероза указывают прогрессирующее ухудшение двигательные и (или) когнитивные функции, а также ключевые гистопатологические характеристики: наличие эктопических лимфоидных фолликулов в мозговых оболочках (примерно в 40% случаев ВПРС пациентов), демиелинизация серого вещества и атрофия головного мозга, диффузное повреждение белого вещества.

На сегодняшний день было исследовано несколько потенциальных клинических и параклинических биомаркеров для определения и прогнозирования конверсии из ремиттирующего рассеянного склероза во вторично-прогрессирующий: EDSS (расширенная шкала инвалидности), MSFS (функциональный комплекс рассеянного склероза), зрительная функция, обонятельная функция, биомаркеры в крови и спинномозговой жидкости.

Основные клинические характеристики перехода РС в ВПРС

Расширенная шкала инвалидности (EDSS)

В клинических исследованиях EDSS применяется для оценки прогрессирования инвалидности. Он состоит из 20 шагов в диапазоне от 0 до 10, которые оценивают нарушения при рассеянном склерозе на основе неврологического обследования (баллы менее 4,0), способности ходить (баллы 4,0–6,0) или других функциональных нарушений (баллы более 6,5) [4–7]. EDSS используется для оценки эффективности проводимой терапии. Ключевой момент в течении и диагностике вторично-

прогрессирующего типа рассеянного склероза – нарастание неврологической симптоматики в период между обострениями. Главным критерием прогрессирования является нарастание балла по шкале EDSS за 6 месяцев. Шкала EDSS позволяет очень четко и эффективно оценить степень инвалидизации пациента и отследить ухудшение неврологического статуса.

Но он не дает полную оценку всех клинически значимых факторов, которые могут привести прогрессированию инвалидности у пациентов с рассеянным склерозом, особенно нарушения функции верхних конечностей и когнитивной дисфункции [8].

Функциональный комплекс рассеянного склероза (MSFC)

Функциональный комплекс рассеянного склероза (MSFC) включает в себя два функциональных теста: функции нижних конечностей – 25-футовый тест ходьбы (Timed 25-Foot Walk Test, T25FW), функции верхних конечностей – тест с девятью колышками (9-Hole Peg Test, 9HPT).

T25FW и 9HPT измеряют время, которое необходимо для того, чтобы пройти 25 футов и вставить девять колышков в коробку с отверстиями и обратно достать из нее. Они способны выявлять прогрессирование инвалидности у пациентов с ВПРС чаще, чем EDSS [9–12]. 9HPT не является надежным клиническим тестом, так как участники учатся выполнять тест и с каждым повторением улучшают свои результаты. В таком случае T25FW является наиболее достоверным тестом [16–18]. В свою очередь, комплексный тест EDSS Plus (EDSS, T25FW, 9HPT) оказался в два раза чувствительнее, чем EDSS в выявлении прогрессирования инвалидности (59,5 % против 24,7%). Не проведя оценку по шкале MSFC, нельзя установить степень инвалидизации по EDSS [18].

Тест символьно-цифрового кодирования (SDMT)

У 40–65 % пациентов с прогрессирующим рассеянным склерозом имеются когнитивные нарушения. Корреляция когнитивной функции по сравнению с показателями физических нарушений с качеством жизни еще больше, но часто недооценивается.

Со специфичностью 60 % и чувствительностью 91 % тест символьно-цифрового кодирования (Symbol Digit Modalities Test, SDMT) представляет собой сторожевой тест для оценки когнитивных нарушений у пациентов с рассеянным склерозом [19–22]. Тест символьно-цифрового кодирования используется для оценки внимания, визуального сканирования, отслеживания и скорости движения. У испытуемого есть 90 секунд, чтобы соединить определенные числа с заданными геометрическими фигурами. Поскольку экзаменуемые могут давать как письменные, так и устные ответы, тест хорошо подходит для проведения с людьми, у которых есть двигательная инвалидность или нарушения речи. Прохождение всего теста занимает около 5 минут.

Однако, несмотря на такую сильную чувствительность и специфичность SDMT, последние исследования доказали, что показатели на протяжении наблюдения улучшаются и не отражают устойчивого снижения когнитивной функции,

которое имеется у пациентов с ВПРС. При повторном проведении теста отмечается улучшение результатов по сравнению с предыдущими на 6 баллов больше по письменному тесту и на 10 баллов – по устному [23, 24].

Еще одним препятствием в использовании существующих норм является тот факт, что с момента разработки SDMT исследователи выявили как гендерные различия, так и влияние уровня образования на показатели теста. Причем более высокие баллы по скорости обработки наблюдаются среди женщин и лиц с высшим образованием. В частности, были показаны значительные гендерные эффекты среди людей во втором, третьем и четвертом десятилетиях жизни. У женщин в третьем десятилетии жизни, когда обычно диагностируется рассеянный склероз, показатели оказались на 6 баллов выше, чем у мужчин в письменной версии, и на 7 баллов выше в устной версии [25].

Оценка зрительной функции

У 90 % пациентов с рассеянным склерозом поражается вторая пара черепных нервов. Перспективным методом оценки зрительной функции при РС является оценка низкоконтрастной четкости письма (Low-Contrast Letter Acuity, LCLA). LCLA показывает хорошую корреляцию как с атрофией сетчатки, так и с поражениями зрительного тракта [26–29]. Среди множества доступных показателей зрительной функции наиболее перспективным при РС является порог визуального контраста, определяемый как минимальное количество контраста, необходимое человеку для различения объекта на его фоне. Визуальный контраст оценивается с помощью диаграмм LCLA, которые основаны на диаграммах раннего лечения диабетической ретинопатии – высококонтрастная четкость зрения (High-Contrast Visual Acuity, HCLA), но используют серые буквы с уровнем контрастности 2,50 и 1,25 %, в отличие от черных букв (уровень контрастности 100%) [30–31]. Диаграммы представляют собой непрерывный показатель с семью буквами потери LCLA, которые считаются значимыми и превышают порог вариабельности при первом и повторном тестировании [32].

Было обнаружено, что LCLA изменяется у пациентов с рассеянным склерозом, даже когда HCLA кажется нормальным. Он показывает хорошую структурно-функциональную корреляцию как с атрофией сетчатки, так и с поражениями заднего зрительного пути. Поэтому были высказаны призывы к включению LCLA в MSFC для отражения зрительной функции [33–35]. Прогрессирующее нарушение зрения было предложено в качестве дополнительного способа определения конверсии ВПРС в клиническом отчете.

Оценка обонятельной функции

Способность правильно идентифицировать запахи (идентификация) и различать их (дискриминация) преимущественно поражается при прогрессирующем рассеянном склерозе [36].

Было показано, что суммарная оценка дискриминации и идентификации (DI score) коррелирует с длительностью заболевания, физической инвалидностью, снижением когнитивных функций. Поочередно проверяется проходимость носовых ходов, для чего врач зажимает одну

ноздрю и просит вдохнуть и выдохнуть воздух другой. Контролем служит движение бумажки струей воздуха. Также поочередно предлагается определить запах одной и другой ноздрей нерезко пахнущего ароматического вещества (резко пахнущее вещество, помимо обонятельного нерва, воспринимается V и VII парами ЧН). При проверке обоняния глаза и рот испытуемого должны быть закрыты. Для количественного исследования обоняния и установления порога восприятия используются специальные приборы ольфактометры [37].

Для ранних стадий заболевания и обострений (при активизации иммунного воспаления) характерна гипосмия с общим повышением порога восприятия запахов, в то время как для более поздних – нарушение идентификации запахов. Доказано, что степень выраженности нарушения идентификации запахов коррелирует с количеством и размерами очагов демиелинизации в белом веществе лобных и височных долей мозга (по данным МРТ) [38–40].

Характер обонятельного расстройства позволяет предположить вариант клинического течения и скорость прогрессирования РС. Идентификация запахов нарушена значительно чаще у пациентов со вторично-прогрессирующей формой РС, чем у пациентов с ремиттирующей и другими формами.

Магнитно-резонансная томография

Еще один маркер нейродегенерации при РС – объем таламуса. В норме объем таламуса составляет 3 см³. Последние исследования показали, что у пациентов с ВПРС, в отличие от пациентов с РРС, атрофия ядер таламуса выражена сильнее. Степень атрофии левого переднего вентрального ядра выше на 25,6% при ВПРС, левого центрального медиального ядра – на 16,9%, левого медиального коленчатого ядра – на 16,8%, левого латерального коленчатого ядра – на 30,9%, левого латерального дорзального ядра – на 41,9%. Таламическая атрофия предсказывает более высокий риск повышения EDSS в течение 5 лет [47].

Оптическая когерентная томография (ОКТ) – это метод, который позволяет измерить толщину нервных волокон перипапиллярного слоя сетчатки (pRNFL) и внутреннего плексиформного слоя ганглиозных клеток (GCIPL), которые служат индикаторами нейроаксональной дегенерации. Доказано, что pRNFL и GCIPL снижаются у пациентов с рассеянным склерозом, вне зависимости от неврита зрительного нерва [49–51]. Ежегодная скорость истончения pRNFL более 1,5 мкм способна отличить ремиттирующий и прогрессирующий РС; риск увеличивается в 15 раз. Потеря GCIPL выше среза более 1 мкм в год является весомым предиктором клинического прогрессирования.

МРТ: лептоменингеальное контрастное усиление (КУ)

Феномен лептоменингеального КУ заключается в том, что контрастное вещество накапливается фолликулами и происходит усиление МР-сигнала в области субарахноидального пространства. Возможности МРТ дают визуализацию лептоменингеальных фолликулов размером более 1 мм.

У пациентов со вторично-прогрессирующим РС (ВПРС) был отмечен градиент корковой демиелинизации, активации микроглии, гибели нейронов коры и олигодендро-

глиоцитов, достигающий максимума в поверхностных слоях и уменьшающийся в более глубоких слоях коры. Тем не менее очаги демиелинизации в сером веществе коры больших полушарий не всегда сопровождаются наличием лептоменингеального КУ, а также нередко не визуализируются при МРТ вообще. В некоторых исследованиях связь между лептоменингеальным КУ и корковыми очагами демиелинизации не обнаруживается, однако сообщается о корреляции между выраженностью лептоменингеального КУ и количеством гиппокампальных очагов демиелинизации.

На МР-томографе лептоменингеальное КУ было разделено на узловое и распространенное; при этом узловое КУ наблюдается чаще у здоровых и у больных РС более молодого возраста на ранних стадиях заболевания, в то время как распространенное – на поздних стадиях РС.

Несмотря на отсутствие доказательств частоты распространения феномена лептоменингеального КУ у пациентов с различными типами течения, последние исследования сообщают о преобладании феномена лептоменингеального КУ у пациентов с прогрессирующими формами заболевания, особенно при ВПРС. Предполагается, что возникновение и рост новых эктопических В-клеточных фолликулов в мозговых оболочках продолжают в том числе на поздних стадиях заболевания, характеризующихся редкостью появления активных очагов демиелинизации в белом веществе.

Однако корреляция между выраженностью лептоменингеального КУ и числом очагов демиелинизации в белом веществе не обнаружена. Напротив, при выполнении МРТ в динамике выраженность лептоменингеального КУ остается стабильной [69].

Биомаркеры в крови и спинномозговой жидкости

Нейрофиламенты

В последнее время большое внимание в качестве биомаркера аксонального повреждения уделяется нейрофиламентам. Уровень нейрофиламентов в ликворе при постановке диагноза является ранним маркером перехода ремиттирующего рассеянного склероза во вторично-прогрессирующий. Наиболее чувствительным маркером нейродегенерации на ранних стадиях рассеянного склероза является уровень фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости. Повышение уровня фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости в периоды ремиссии и обострения отражает непрерывность нейродегенерации при ремиттирующем течении рассеянного склероза. Уровень легких цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости отражает нейродегенеративный процесс при боковом амиотрофическом склерозе, при рассеянном склерозе уровень данного маркера на ранних стадиях заболевания не меняется.

Но так как люмбальная пункция травматична и для ее проведения нужны строгие показания, сейчас используется новая технология Simoa – определение легких цепей нейрофиламентов в периферической крови. К сожалению, данный маркер не обладает специфичностью и не готов к внедрению в клиническую практику: в крови нейрофи-

ламенты увеличиваются и во время воспаления. Уровень нейрофиламентов в крови также зависит от индивидуальных особенностей человека: ИМТ оказывает влияние на уровень нейрофиламентов в крови, где при каждом увеличении индекса массы тела на 1 кг нейрофиламенты уменьшаются на 0,02 пг/мл [52–55].

Уровень бета-амилоида

Снижение уровня бета-амилоидов 1–40 и 1–42 в цереброспинальной жидкости в стадии обострения при РС подтверждает специфичность мембрано-ассоциированных метаболических процессов для активной фазы заболевания. Уровень исследованных маркеров не связан с проницаемостью гематоэнцефалического барьера, определенной по альбуминовому индексу. При рассеянном склерозе снижение соотношения уровня бета-амилоида 1–42 к уровню фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов может служить маркером начальной стадии нейродегенерации со специфичностью 83% и чувствительностью 70% [56–60].

Глиальный фибриллярный кислый белок

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является одним из главных белков астроцитов. У пациентов с прогрессирующим рассеянным склерозом наблюдаются более высокие уровни GFAP в ликворе по сравнению с пациентами ремиттирующим РС [61–63].

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является одним из основных промежуточных цитоскелетных белков астроцитов и представляет собой хорошо зарекомендовавший себя маркер реактивного астроглиоза. Повышение GFAP критически важно для формирования расширенных и утолщенных астроцитарных процессов, наблюдаемых при реактивном астроглиозе в месте повреждения. Последний не обязательно связан с формированием глиального рубца, и его ре- или демиелинизирующий потенциал зависит от ряда факторов, включая сроки после травмы, микроокружение поражения и его взаимодействие с другими типами клеток и факторами, влияющими на их активацию [64–66]. Однако обширный астроцитоз приводит к образованию астроглиального рубца, который играет роль в прогрессировании РС [67].

Пациенты с прогрессирующим рассеянным склерозом имеют значительно более высокие уровни GFAP в ликворе по сравнению с пациентами с клинически изолированным синдромом или ранним РС. Уровень GFAP в ликворе и сыворотке крови коррелирует с неврологической инвалидизацией (EDSS) и прогрессированием заболевания; среднегодовое увеличение GFAP значительно выше у пациентов с ВПРС по сравнению с РС и коррелирует с уровнем нейрофиламентов и количеством поражений МРТ, особенно у пациентов с прогрессирующим рассеянным склерозом [68, 69]. Фибриллярный кислый протеин в крови в норме не определяется, то есть его сывороточная концентрация находится в пределах 0 нг/мл. При процессах нейродегенерации белки поступают во внеклеточный матрикс и в дальнейшем через ГЭБ попадают в кровь.

Заключение

Наиболее перспективными клиническими биомаркерами для определения перехода РС в ВПРС являются

T25FW и SDMT, которые оценивают как функцию нижних конечностей, так и когнитивные способности, показывают хорошую корреляцию с другими биомаркерами РС-ассоциированной нейродегенерации. Среди параклинических биомаркеров атрофия таламуса, оценка уровня нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости, ОКТ и снижение DI score представляют собой легкодоступный биомаркер в определении прогрессирования заболевания.

В связи с тем, что некоторые из этих исследований слишком дорогие, а другие не везде проводятся, определение биомаркеров перехода рассеянного склероза вызывает значительные трудности. Но самым доступным и недорогостоящим методом определения предикторов перехода РС в ВПРС является измерение объема таламуса, что можно внедрить в любые лечебные учреждения. Он представляет наиболее чувствительный инструмент для оценки прогрессирования заболевания.

Объективное и надежное определение ВПРС и оценка риска перехода РС в ВПРС позволили бы использовать новый подход к ведению пациентов с рассеянным склерозом: дозу препаратов можно было бы адаптировать или увеличить в более сжатые сроки, чтобы задержать или даже предотвратить конверсию ВПРС, а симптоматическое лечение могло бы быть усилено.

Список литературы / References

1. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* (2014) 13: 700–9. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70041-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70041-9)
2. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol.* (2015) 14: 263–73. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70267-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70267-4)
3. Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* (2015) 28: 193–205. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000206>
4. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* (1983) 33: 1444–52. <https://doi.org/10.1212/WNL.33.11.1444>
5. Cadavid D, Tang Y, O'Neill G. Responsiveness of the expanded disability status scale (EDSS) to disease progression and therapeutic intervention in progressive forms of multiple sclerosis. *Rev Neurol.* (2010) 51: 321–9. <https://doi.org/10.33588/rn.5106.2010390>
6. Hyland M, Rudick RA. Challenges to clinical trials in multiple sclerosis: Outcome measures in the era of disease-modifying drugs. *Curr Opin Neurol.* (2011) 24: 255–61. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283460542>
7. Rudick RA, Polman CH, Cohen JA, Walton MK, Miller AE, Confavreux C, et al. Assessing disability progression with the multiple sclerosis functional composite. *Mult Scler.* (2009) 15: 984–97. <https://doi.org/10.1177/1352458509106212>
8. Amato MP, Fratiglioni L, Groppi C, Siracusa G, Amaducci L. Interrater reliability in assessing functional systems and disability on the Kurtzke scale in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* (1988) 45: 746–8. <https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520310052017>
9. Demir S. Multiple Sclerosis Functional Composite. *Noro Psikiyatr Ars.* (2018) 55 (Suppl. 1): S66–S8. <https://doi.org/10.29399/npa.23349>
10. Bin Sawad A, Seoane-Vazquez E, Rodriguez-Monguio R, Turkistani F. Evaluation of the expanded disability status scale and the multiple sclerosis functional composite as clinical endpoints in multiple sclerosis clinical trials: Quantitative meta-analyses. *Curr Med Res Opin.* (2016) 32: 1969–74. <https://doi.org/10.1080/03007995.2016.1222516>
11. Cadavid D, Cohen JA, Freedman MS, Goldman MD, Hartung HP, Havrdova E, et al. The EDSS-Plus, an improved endpoint for disability progression in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* (2017) 23: 94–105. <https://doi.org/10.1177/1352458516638941>
12. Kragt JJ, van der Linden FA, Nielsen JM, Uitdehaag BM, Polman CH. Clinical impact of 20% worsening on timed 25-foot walk and 9-hole peg test in multiple sclerosis. *Mult Scler.* (2006) 12: 594–8. <https://doi.org/10.1177/1352458506070768>
13. Bosma LV, Kragt JJ, Brieve L, Khaleeli Z, Montalban X, Polman CH, et al. Progression on the multiple sclerosis functional composite in multiple sclerosis: what is the optimal cut-off for the three components? *Mult Scler.* (2010) 16: 862–7. <https://doi.org/10.1177/1352458510370464>
14. Rudick RA, Cutter G, Reingold S. The multiple sclerosis functional composite: A new clinical outcome measure for multiple sclerosis trials. *Mult Scler.* (2002) 8: 359–65. <https://doi.org/10.1191/1352458502ms8450a>
15. Orbach R, Zhao Z, Wang YC, O'Neill G, Cadavid D. Comparison of disease activity in SPMS and PPMS in the context of multicenter clinical trials. *PLoS ONE.* (2012) 7: e45409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045409>
16. Rosti-Ohtajarvi E, Hamalainen P, Koivisto K, Hakkanen L. The reliability of the MSFC and its components. *Acta Neurol Scand.* (2008) 117: 421–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00972>
17. Solari A, Radice D, Manneschi L, Motti L, Montanari E. The multiple sclerosis functional composite: different practice effects in the three test components. *J Neurol Sci.* (2005) 228: 71–4. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.09.033>
18. Cohen JA, Cutter GR, Fischer JS, Goodman AD, Heidenreich FR, Kooijmans MF, et al. Benefit of interferon beta-1a on MSFC progression in secondary progressive MS. *Neurology.* (2002) 59: 679–87. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.5.679>
19. Kaib R, Beier M, Benedict RH, Charvet L, Costello K, Feinstein A, et al. Recommendations for cognitive screening and management in multiple sclerosis care. *Mult Scler.* (2018) 24: 1665–80. <https://doi.org/10.1177/1352458518803785>
20. Messinis L, Kosmidis MH, Lyros E, Papatathanopoulos P. Assessment and rehabilitation of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Int Rev Psychiatry.* (2010) 22: 22–34. <https://doi.org/10.3109/09540261003589372>

