

Effect of Crocin and Losartan on Insulin Resistance and Protecting Pancreatic Tissue in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Yaser Mohammadi¹,
Mahmoud Zardast²,
Shadi Behshad³,
Azam Rezaei Farimani⁴

¹ Instructor, Qaen School of Nursing and Midwifery, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² Associate Professor, School of Medicine, Medical Toxicology and Drug Abuse Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ MSc in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Cardiovascular Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received June 27, 2022 ; Accepted September 17, 2022)

Abstract

Background and purpose: Crocin as a carotenoid exert anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-diabetic effects. There is an increasing prevalence of diabetes mellitus and its complications and patients are more interested in natural product treatments. This study aimed at investigating the efficacy of crocin and losartan alone and combination of the two drugs on insulin resistance and protecting pancreatic tissue in an animal model of diabetes.

Materials and methods: In this experimental study, diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg) in 40 rats. Four weeks after induction of diabetes, the treatment groups received crocin (50 mg/kg) and losartan (25 mg/kg) daily or combination of these drugs for 4 weeks via gavage. Then, FBS, weight, insulin, and lipid profiles were investigated and histopathology of pancreatic tissues were evaluated.

Results: Findings showed that crocin and losartan can be effective in improving the symptoms of diabetes (hyperglycemia, increase in body weight, increased HOMA-IR, QUICKI reduction, hyperlipidemia, and pancreatic tissue damage). Also, combination of crocin and losartan increased its effectiveness in improving the symptoms of diabetes.

Conclusion: According to this study, crocin could contribute to development of phytotherapeutic techniques in treatment of diabetes and its complications. Also, this study showed that crocin in combination with losartan increases the effectiveness of losartan against diabetes. However, more human studies are needed to confirm these benefits.

Keywords: diabetes, crocin, losartan, insulin resistance, pancreas

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 11-23 (Persian).

Corresponding Author: Azam Rezaei Farimani - School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.
(E-mail: azam_rezaei1@yahoo.com)

بررسی اثر کروسین و لوزارتان بر مقاومت به انسولین و محافظت از بافت پانکراس در رت‌های دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین

یاسر محمدی¹
محمود زردست²
شادی بهشاد³
اعظم رضائی فریمانی⁴

چکیده

سابقه و هدف: کروسین به عنوان یک کاروتنوئید اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی دارد. علاوه بر این، شیوع روزافزون دیابت و عوارض ناشی از آن و نیز تمایل بیماران به استفاده از محصولات طبیعی برای درمان بیماری‌های خود، منجر به طراحی این مطالعه، با هدف بررسی اثربخشی کروسین، لوزارتان و مصرف همزمان آن‌ها بر مقاومت به انسولین و محافظت از بافت پانکراس در مدل حیوانی دیابت شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که القا دیابت با تزریق تک دوز استرپتوزوسین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت درون صفاقی روی 40 موش صحرایی انجام شد. چهار هفته پس از القای دیابت، گروه‌های درمانی، کروسین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و لوزارتان (25 میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به مدت چهار هفته از طریق گاوآژ دریافت کردند. FBS، وزن، انسولین، پروفایل لیپیدی و آسیب‌شناسی بافت پانکراس در پایان مطالعه (8 هفته) بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌های این مطالعه نشان داد که کروسین و لوزارتان می‌توانند در بهبود علائم دیابت (افزایش قندخون، افزایش وزن بدن، افزایش HOMA-IR، کاهش QUICKI، افزایش چربی و آسیب‌های بافت پانکراس) موثر باشند. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که کروسین در ترکیب با لوزارتان، اثر بخشی آن را در بهبود علائم دیابت افزایش می‌دهد.

استنتاج: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، کروسین این پتانسیل را دارد که به توسعه تکنیک‌های گیاه درمانی برای درمان دیابت و عوارض ناشی از آن کمک کند. هم‌چنین این مطالعه نشان داد که کروسین در ترکیب با لوزارتان، اثربخشی لوزارتان را در برابر دیابت افزایش می‌دهد. با این حال، برای تأیید این موضوع مطالعات انسانی بیش‌تری مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، کروسین، لوزارتان، مقاومت به انسولین، پانکراس

مقدمه

زده می‌شود که شیوع آن در سال 2030 به حدود 21 درصد در جمعیت بزرگسال ایالات متحده افزایش یابد (3). با این حال، اگر روند فعلی ادامه یابد، شیوع کلی دیابت ممکن است تا سال 2050 به حدود 33 درصد افزایش

دیابت ملیتوس یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیک است. این بیماری مزمن منجر به طیف گسترده‌ای از اختلالات و در نتیجه بروز انواع بیماری‌ها می‌گردد (1). شیوع دیابت در سراسر جهان در حال افزایش است (2). تخمین

E-mail: azam_rezaei@yahoo.com

مؤلف مسئول: اعظم رضائی فریمانی - خراسان جنوبی: بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

1. مری، دانشکده پرستاری و مامایی قاین، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
 2. دانشیار، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سم‌شناسی پزشکی و سوء مصرف مواد، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
 3. کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
 4. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
- ☞ تاریخ دریافت: 1401/4/6 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/4/26 تاریخ تصویب: 1401/6/26

سلولی، تولید ماتریکس و پیشبرد فیروز را به راه می‌اندازد و در اثر اتصال به گیرنده AT2 منجر به اعمالی چون فعال شدن سیستم RAAS، کاهش بازجذب سدیم، اثرات ضد میتوزی و گشاد شدن عروقی می‌شود (14). آلدوسترون که توسط ناحیه‌ای گلوکوکورتیکوئیدی آدرنال سنتز می‌شود، با مهار بیوسنتز و میل ترکیبی گیرنده انسولین (IR) مقاومت به انسولین را القا می‌کند. آلدوسترون هم‌چنین ترانسپورترهای گلوکز را کاهش می‌دهد. تولید بیش از حد آلدوسترون منجر به هیپوکالمی می‌شود که خود نیز ترشح انسولین را مهار می‌کند (15). بنابراین مهار RAAS می‌تواند مقاومت به انسولین را کاهش دهد. در حال حاضر از جمله درمان‌های رایج استفاده از بلاک‌های RAAS می‌باشد. یکی از این داروها لوزارتان می‌باشد. Pan و همکاران (16) در یک مطالعه کارآزمایی بالینی نشان دادند که شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) در گروه تحت درمان با لوزارتان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. استفاده طولانی مدت از داروهای شیمیایی برای درمان دیابت و عوارض ناخواسته این داروها باعث شده است تا توجه محققان به سمت داروهای گیاهی که طبیعی بوده و عوارض جانبی کم‌تری دارند معطوف گردد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که گیاهان با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب بافتی باشند (17) که یکی از این گیاهان دارویی کروسین می‌باشد.

کروسین یک رنگدانه کاروتنوئیدی محلول در آب می‌باشد که در کلاله زعفران یافت می‌شود (18). اکنون مشخص شده است که کروسین می‌تواند حساسیت به انسولین را افزایش داده و سطح گلوکز سرم را کاهش دهد (19). کروسین هم‌چنین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی (20)، ضد دیابتی (21) و ضد التهابی (22) است. در مطالعه‌ای که توسط حسینی و همکاران انجام شد، نشان دادند که کروسین می‌تواند با بهبود سطح سرمی گلوکز و پروفایل لیپیدی مقاومت به انسولین و آسیب‌های بافتی را کاهش دهد (23). در مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی که به‌روز و

یابد (4). دیابت کنترل نشده می‌تواند عملکرد بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها را با فعال کردن برخی مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک مختل کند که این امر با طیف وسیعی از بیماری‌ها همراه می‌باشد از جمله نوروپاتی دیابتی، نوروپاتی دیابتی، رتینوپاتی دیابتی، زوال عقلی، تصلب شرایین و اختلالات قلبی عروقی (5،6). در حال حاضر، یکی از علل اصلی همودیالیز، نوروپاتی دیابتی می‌باشد، هم‌چنین مهم‌ترین علت مرگ و میر در بیماران دیابتی مشکلات قلبی عروقی ناشی از دیابت مطرح گردیده است (7،8) و علت اصلی نابینایی، رتینوپاتی ناشی از دیابت ذکر گردیده است (9). بنابراین نیاز روزافزونی به بهینه‌سازی و مدیریت دیابت وجود دارد. دیابت نوع 1، یک بیماری خودایمنی مزمن است که به دلیل نفوذ لنفوسیت‌ها و تخریب سلول‌های β در جزایر لانگرهانس پانکراس ایجاد می‌شود (10). از بین رفتن تعداد و حجم سلول‌های بتای پانکراس منجر به کمبود شدید و دائمی انسولین و هیپرگلیسمی مزمن می‌گردد (11). هیپرگلیسمی سبب القای عوامل اثرگذار بیوشیمیایی و مولکولی متعددی از جمله استرس اکسیداتیو، افزایش غلظت سرمی محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون، التهاب و فعالیت پروتئین کیناز C می‌گردد که این عوامل باعث آسیب به بافت‌های مختلف بدن، به ویژه سلول‌های بتای پانکراس می‌شوند (12). به دلیل فرآیندهای پیچیده و عوامل مختلف در پاتوژنز دیابت، اقدامات پیشگیری و کنترل‌کننده موثری متأسفانه در حال حاضر در دسترس نمی‌باشد. بنابراین، بررسی مکانیسم‌های دقیق در رابطه با وقوع و پیشرفت دیابت بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هیپرگلیسمی ناشی از دیابت می‌تواند باعث افزایش فعالیت سیستم رنین آنژیوتانسین آلدوسترون (RAAS) گردد. آنژیوتانسین II بر گیرنده‌های خود واقع بر سلول‌های مختلف کلیوی تاثیر گذاشته و منجر به القا و ساخت کمو کاین‌های متفاوت می‌شود (13). به‌طور کلی آنژیوتانسین II دارای دو نوع گیرنده AT1 و AT2 می‌باشد که در اثر اتصال آنژیوتانسین II به گیرنده AT1 یک سری مکانیسم‌ها از جمله افزایش تکثیر

به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. تمامی پروتکل‌های حیوانی در این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (IR.BUMS.REC.1399.402) که از دستورالعمل‌های NIH برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی پیروی می‌کند، تایید شده است.

طراحی مطالعه

در شروع مطالعه، حیوانات به طور تصادفی (با روش بلوک‌بندی چهارتایی) به پنج گروه (در هر گروه 8 موش صحرایی) تقسیم شدند:

- 1) گروه نرمال (N؛ موش‌های صحرایی سالم، بدون درمان) - گروه کنترل سالم
- 2) گروه دیابت ملیتوس (DM)؛ موش‌های صحرایی دیابتی، درمان نشده - گروه کنترل دیابتی
- 3) گروه دیابت ملیتوس + کروسین (DM + C)؛ موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با کروسین
- 4) گروه دیابت ملیتوس + لوزارتان (DM + L)؛ موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با لوزارتان
- 5) گروه دیابت ملیتوس + لوزارتان + کروسین (DM + LC)؛ موش‌های دیابتی تحت درمان با لوزارتان و کروسین.

STZ در بافر سیترات سدیم 0/01 مولار (pH=4/5) حل شد و القا دیابت با تک دوز STZ (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت درون صفاقی (IP) انجام شد (26). هم‌چنین گروه N، یک میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم به صورت IP دریافت کرد. 72 ساعت پس از تزریق STZ، سطح گلوکز خون همه گروه‌ها با گلوکومتر Accu-Check Active (ROCHE-آلمان) از ناحیه ورید دمی اندازه‌گیری شد. موش‌های صحرایی با $FBS > 250$ میلی‌گرم در دسی‌لیتر دیابتی در نظر گرفته شدند. چهار هفته پس از القا دیابت، درمان با کروسین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) (27) و لوزارتان (25 میلی‌گرم بر کیلوگرم) (28،29) در گروه‌های تحت درمان آغاز شد.

همکاران انجام دادند، مشخص شد که دریافت 15 میلی‌گرم کروسین به صورت دو بار در روز می‌تواند منجر به کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به دیابت گردد (24).

در مطالعه دیگری که توسط Margaritis و همکاران انجام شد، نتایج نشان داد که تجویز 50 میلی‌گرم کروسین به موش‌های دیابتی، می‌تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه بهبود علائم دیابت گردد (25). تاکنون مطالعات متعددی در مورد اثر کروسین بر دیابت انجام شده است اما مطالعات انجام شده در ارتباط با ترکیب کروسین به عنوان یک مکمل همراه با سایر داروهای شیمیایی اندک می‌باشد، بنابراین انجام چنین مطالعاتی ضروری به نظر می‌رسد. به همین منظور مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر کروسین به صورت جداگانه و همراه با داروی لوزارتان بر مقاومت به انسولین و هیستوپاتولوژی بافت پانکراس در موش‌های صحرایی دیابتی القا شده با استریتوزوسین انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

استریتوزوسین (STZ) (شماره محصول: S0130) و کروسین (شماره محصول: 17304) از شرکت سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich) خریداری شدند. پودر لوزارتان از کارخانه داروسازی ACTOVERCO (کرج-ایران) تهیه شد.

حیوانات

در این مطالعه، 40 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (200-250 گرم) از مرکز طب تجربی و حیوانات آزمایشگاهی علوم پزشکی بیرجند خریداری شدند. به منظور سازش با محیط به مدت یک هفته در قفس‌های استاندارد پلی‌استر (4 رت در هر قفس) در اتاقی با دمای استاندارد (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (55 ± 5 درصد) با چرخه نور/تاریکی 12 ساعت و دسترسی آزاد

همچنین گروه‌های N و DM همزمان با آغاز مداخله، نرمال سالیان را دریافت کردند. تمامی مداخلات با گاوآژ روزانه در ساعتی مشخص و به مدت چهار هفته انجام شد.

نمونه برداری

در پایان مطالعه (8 هفته)، موش‌های صحرایی با تزریق IP کتامین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. نمونه خون از قلب هر موش صحرایی گرفته شد. جهت جداسازی سرم، لوله‌های حاوی خون، فاقد ضد انعقاد با سرعت 3000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها تا زمان انجام آزمایشات در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد حفظ و ذخیره شدند. بافت‌های پانکراس به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژی ابتدا با نرمال سالیان سرد شستشو داده شدند و سپس به منظور تهیه نمونه بافتی در فرمالین 10 درصد فیکس شدند.

تست‌های بیوشیمیایی

قندخون ناشتا (FBS) از ناحیه ورید دم با دستگاه گلوکومتر در روزهای 0، 28 و 56 مطالعه اندازه‌گیری شد. سطح سرمی پارامترهای بیوشیمیایی تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول توتال (TC)، لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL-C) و لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL-C) با کیت‌های استاندارد پارس آزمون (ساخت کشور ایران) و دستگاه اتوآنالایزر (Prestige 24i، ژاپن) اندازه‌گیری شد (کد کیت‌ها: TG: 18918, TC: 18911, HDL-C: 18912, LDL-C: 18913). هم‌چنین سطح سرمی انسولین با استفاده از کیت انسولین موش صحرایی (Mercodia)، سوئد، کد کیت: ELR-Insulin-1) با روش الایزا (ELISA) اندازه‌گیری شد. ارزیابی مقاومت به انسولین (HOMA-IR) و حساسیت به انسولین (QUICKI) بر اساس انسولین و FBS با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (30):

$$HOMA-IR = \frac{[insulin] (mU/l) \times [FBS] (mg/dL)}{405}$$

$$QUICKI = \frac{1}{[\log (insulin \text{ in } mU/L) + \log (FBS \text{ in } mg/dL)]}$$

بررسی هیستوپاتولوژی بافت پانکراس به منظور تهیه لام‌های پاتولوژی، بافت پانکراس به کمک الکل‌های صعودی آنگیری شدند، سپس با زایلن خالص شدند و با پارافین جدا سازی انجام شد. سپس بلوک‌های پارافینی تهیه و از بافت پانکراس مقاطع 5 میکرونی تهیه شد. در مرحله آخر رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین (H&E) انجام شد. اسلایدهای مربوطه با استفاده از میکروسکوپ (Olympus CX33)، ژاپن) و توسط یک متخصص پاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت و سپس عکس برداری با بزرگنمایی 400X از هر نمونه انجام شد.

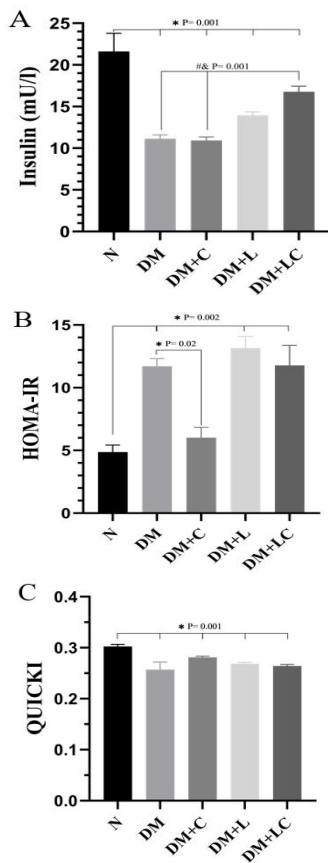
روش آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 انجام شد. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون شاپیروویلک مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه‌های چندگانه با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) انجام شد. سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها برابر با $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. همه نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین (Means \pm SEM) ارائه شدند.

یافته‌ها

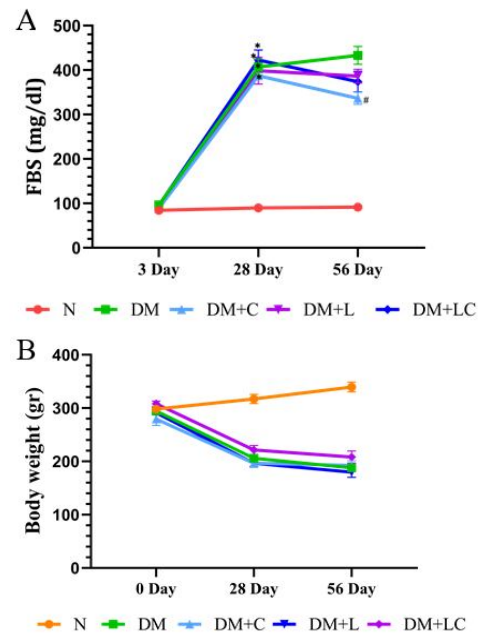
نمودار شماره 1 نشان دهنده تغییرات FBS و وزن بدن در گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. همان‌طور که در نمودار شماره A-1 نشان داده شده است، سطح FBS در روز 28 (قبل از شروع مداخله) در همه گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری ($P=0/001$) افزایش یافته است. در روز 56 (بعد از مداخله) سطح FBS در گروه تحت درمان با کروسین به‌طور معنی‌داری ($P=0/001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش یافت. همان‌طور که مشاهده می‌شود، لوزارتان - کروسین در مقایسه با لوزارتان تاثیر بیش‌تری در کاهش FBS از خود نشان داد (اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود).

کروسین افزایش یافت ($P=0/001$). هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که HOMA-IR در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری افزایش و QUICKI به‌طور معنای داری کاهش یافت (به ترتیب: $P=0/002$ و $P=0/001$). اما در گروه کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی سطح HOMA-IR به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P=0/02$). از طرفی QUICKI در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی افزایش یافت هر چند از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.



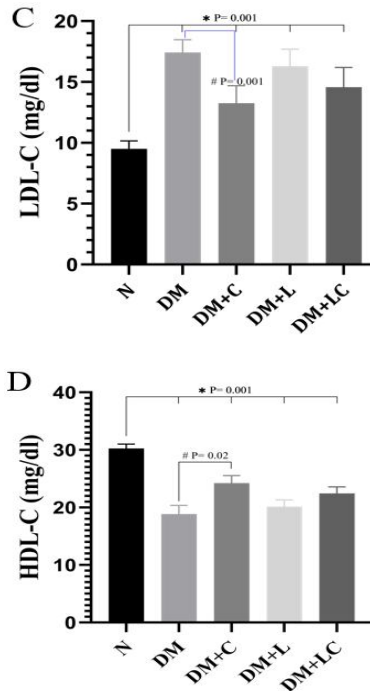
نمودار شماره 2: نشان دهنده تغییرات انسولین، HOMA-IR و QUICKI در گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. گروه‌ها: N (عادی، کنترل سالم)، DM (دیابت شیرین)، DM + C (DM + کروسین)، DM + L (DM + لوزارتان)، DM + LC (DM + لوزارتان + کروسین). داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند. $n=8$.
 *: تفاوت معناداری با گروه N، $P<0/05$ ؛
 #: تفاوت معنی‌داری با گروه DM، $P<0/05$ ؛
 &: تفاوت معنی‌داری با گروه DM+C، $P<0/05$

با توجه به نمودار شماره 1-B، در روز 28 (قبل از شروع مداخله)، وزن بدن در تمام گروه‌های دیابتی به‌طور قابل توجهی ($P=0/001$) پایین‌تر از گروه کنترل سالم بود. در روز 56 (چهار هفته بعد از درمان)، وزن بدن موش‌های صحرایی در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی افزایش یافت، هر چند این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود.



نمودار شماره 1: تغییرات FBS و وزن بدن را در تمام گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. گروه‌ها: N (عادی، کنترل سالم)، DM (دیابت شیرین)، DM + C (DM + کروسین)، DM + L (DM + لوزارتان)، DM + LC (DM + لوزارتان + کروسین). داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند. $n=8$.
 *: تفاوت معناداری با گروه N، $P<0/05$ ؛
 #: تفاوت معنی‌داری با گروه DM، $P<0/05$

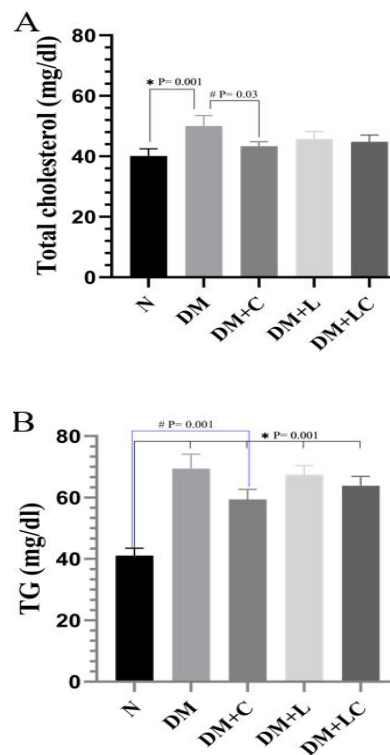
سطح سرمی انسولین، HOMA-IR و QUICKI در نمودار شماره 2 نشان شده است. نتایج نشان داد که سطح سرمی انسولین در گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری ($P=0/001$) نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت. اما سطح سرمی انسولین به‌طور معناداری در گروه لوزارتان-کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و



نمودار شماره 3: تغییرات سطح سرمی پروفایل لیپیدی را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. گروه‌ها: N (عادی، کنترل سالم)، DM (دیابت شیرین)، DM+C (دیابت + کروسین)، DM+L (دیابت + لوزارتان)، DM+LC (دیابت + لوزارتان - کروسین). داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند. n=8. *: P<0/05 تفاوت معناداری با گروه N، #: P<0/05 تفاوت معنی‌داری با گروه DM

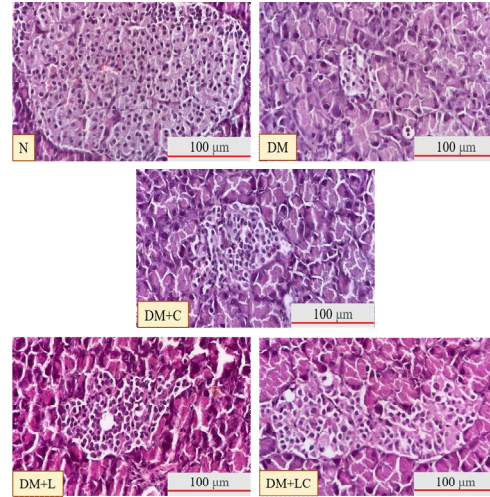
تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت پانکراس در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد که در گروه کنترل سالم، بافت پانکراس و جزایر لانگرهانس نرمال و در گروه کنترل دیابتی جزایر لانگرهانس آتروفی شدید داشتند. در حالی که آتروفی جزایر لانگرهانس در همه گروه‌های تحت درمان (C, L, LC) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش یافت. همان‌طور که در تصویر شماره 1 مشاهده می‌شود، درمان ترکیبی لوزارتان - کروسین توانست در بهبود آتروفی جزایر لانگرهانس نسبت به لوزارتان و کروسین (به صورت جداگانه) عملکرد بهتری داشته باشد.

نمودار شماره 3 نشان دهنده تغییرات پروفایل لیپیدی می‌باشد. نتایج ما نشان داد که سطوح سرمی TC، TG و LDL-C در گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری (P=0/001) نسبت به گروه N افزایش یافت. چهار هفته پس از مداخله، سطوح سرمی TC، TG و LDL-C در گروه کروسین به‌طور معنی‌داری (به ترتیب P= 0/03، P= 0/001 و P=0/001) نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش یافت. همان‌طور که در نمودار شماره 3-D نشان داده شده است، سطح سرمی HDL-C در گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری (P=0/001) نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت. در حالی که سطح سرمی HDL-C در گروه کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P= 0/02). نکته قابل توجه این می‌باشد که با توجه به نمودارها لوزارتان - کروسین توانست در بهبود پروفایل لیپیدی نسبت به گروه لوزارتان عملکرد بهتری را نشان دهد اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود.



لوزارتان - کروسین در موش‌های صحرایی دیابتی می‌پردازد. نتایج ما به‌طور کلی نشان داد که ترکیب لوزارتان - کروسین در مقایسه با لوزارتان نقش موثرتری در بهبود دیابت از خود نشان داد. احتمالاً با افزایش دوز کروسین و یا مدت زمان مداخله این تاثیر به‌طور معنی‌داری مشاهده می‌گردد.

نتایج ما نشان داد که FBS در گروه تحت درمان با کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت که هیپوگلیسمی مشاهده شده در این مطالعه با مطالعات قبلی مطابقت داشت (31). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کروسین منجر به کاهش HOMA-IR و افزایش QUICKI می‌شود، اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود. مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که کروسین با فعال کردن دو مسیر سیگنالینگ وابسته به انسولین (phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B) و مستقل از انسولین (5-AMP-activated protein kinase/acetyl-CoA carboxylase (AMPK/ACC)) حساسیت به انسولین را افزایش می‌دهد (31، 32). داده‌های حاضر با مطالعه Hazman و همکاران هم راستا بود (33)، که مشخص کردند کروسین دارای اثرات ضد دیابتی و کاهش قندخون است. همچنین، نتایج ما نشان داد که FBS در گروه تحت درمان با لوزارتان - کروسین اندکی بهتر از گروه تحت درمان با لوزارتان کاهش یافت اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود. یکی از شایع‌ترین علائم دیابت کاهش وزن بدن می‌باشد (34). نتایج ما نشان داد که پس از القای دیابت، وزن بدن موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت شروع به کاهش کرد. در دیابت، به‌دلیل کاهش یا کمبود انسولین، گلوکز نمی‌تواند از جریان خون به‌عنوان منبع انرژی وارد سلول‌ها شود. بنابراین، بدن شروع به تجزیه چربی‌های ذخیره شده در عضلات چربی (لیپولیز) و پروتئین‌های ذخیره شده در عضلات (پروتئولیز) می‌کند و از آن‌ها به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند. این فرآیند در نهایت منجر به کاهش میزان چربی



تصویر شماره 1: نشان‌دهنده تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت پانکراس می‌باشد، رنگ آمیزی H&E انجام شده است. بزرگنمایی 400X می‌باشد. گروه‌ها: N (عادی، کنترل سالم)، DM (دیابت شیرین)، DM+C (DM + کروسین)، DM+L (DM + لوزارتان)، DM+LC (DM + لوزارتان - کروسین). همان‌طور که مشاهده می‌شود در گروه N سلول‌های لانگرهانس نرمال و طبیعی می‌باشند و در گروه DM شاهد آتروفی شدید سلول‌های لانگرهانس می‌باشیم، این در حالی است که در گروه‌های تحت درمان آتروفی سلول‌های لانگرهانس کاهش یافته و رو به بهبودی می‌باشد که بیش‌ترین تاثیر بهبودی را در گروه DM+LC مشاهده می‌کنیم.

بحث

دیابت یک بیماری متابولیک مزمن و پیچیده می‌باشد که با کاهش عملکرد یا سطح انسولین مشخص می‌شود. کمبود انسولین منجر به افزایش قندخون و در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود که می‌تواند به عروق و بافت‌های هدف دیابت از جمله پانکراس آسیب بزند. نتایج مطالعه ما نشان داد که 4 هفته درمان با کروسین می‌تواند به‌طور قابل توجهی سطح سرمی پارامترهای FBS، TG، LDL-C را کاهش دهد و سطح سرمی HDL-C را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد. همچنین، درمان با کروسین، لوزارتان و لوزارتان - کروسین توانست سطوح سرمی انسولین، HOMA-IR و QUICKI را بهبود بخشد. با توجه به دانش ما، مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به بررسی اثر ترکیبی

ذخیره شده در بدن و کاهش وزن بدن می‌شود (35). هم‌چنین نتایج ما نشان داد که پس از مداخله موش‌های دیابتی تحت درمان با کروسین و لوزارتان - کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کمترین میزان کاهش وزن بدن را تجربه کردند، این ممکن است به دلیل توانایی کروسین و لوزارتان در بهبود HOMA-IR، QUICKI و کاهش قندخون باشد. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که کروسین در ترکیب با لوزارتان اثر بخشی لوزارتان را در جبران کاهش وزن بدن، افزایش داد.

نتایج ما نشان داد که سطح سرمی انسولین و HOMA-IR در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم به ترتیب به‌طور معنی‌داری کاهش و افزایش یافت. تحقیقات نشان داده است که STZ باعث عدم تعادل وضعیت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی در پلاسما می‌گردد و در نتیجه دیابت ملیتوس و عوارض آن ایجاد می‌شود (36). از طرفی STZ با میل کم و از طریق GLUT2 وارد سلول β شده و باعث تخریب انتخابی سلول‌های β جزایر لانگرهانس شده، به‌طور کلی STZ به دو صورت مستقیم (از طریق سمیت سلولی و آزادسازی ROS و NO) و غیرمستقیم (از طریق تشکیل پراکسی نیتريت) منجر به تخریب سلول‌های β جزایر لانگرهانس در نتیجه کاهش شدید سطح سرمی انسولین و افزایش HOMA-IR می‌گردد (37,38). کاهش QUICKI و افزایش HOMA-IR در بافت‌های محیطی از ویژگی‌های اصلی دیابت است (30). بنابراین سلول‌های محیطی وابسته به انسولین (آدیپوسیت‌ها، کاردیومیوسیت‌ها و بافت‌های عضلانی) قادر به جذب گلوکز در گردش نیستند، در نتیجه مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود (19). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز کروسین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و لوزارتان (25 میلی‌گرم بر کیلوگرم) توانست به‌طور معناداری HOMA-IR را کاهش و به‌طور غیر معناداری QUICKI را افزایش دهد. سفیدگر و همکاران گزارش کردند که کروسین با فسفوریلاسیون AMPK/ACC و MAPK (پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن) QUICKI را

افزایش می‌دهد (32). علاوه بر این، شیرعلی و همکاران نشان دادند که کروسین با جلوگیری از استرس اکسیداتیو و بهبود پروفایل لیپیدی، منجر به کاهش HOMA-IR می‌شود (39). مکانیسم‌های احتمالی لوزارتان برای بهبود وضعیت QUICKI و HOMA-IR، کاهش فعالیت RAAS و در نتیجه کاهش ROS (گونه‌های فعال اکسیژن)، NADPH اکسیداز و PK-C (پروتئین کیناز C) در سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس می‌باشد (40,41). هم‌چنین نتایج ما نشان داد که کروسین توانست در ترکیب با لوزارتان، اثر بخشی لوزارتان را در افزایش سطح سرمی انسولین، QUICKI و کاهش HOMA-IR بهبود بخشد. مقایسه پروفایل لیپیدی در گروه‌های دیابتی با گروه کنترل سالم، افزایش قابل توجه سطوح سرمی TC، TG، LDL-C و کاهش قابل توجه HDL-C را نشان داد. در طی دیابت، غیرفعال شدن لیپوپروتئین لیپاز به دلیل کمبود انسولین منجر به دیس لیپیدی می‌شود (42). هم‌چنین مقاومت به انسولین منجر به اختلال در عملکرد سلول‌های چربی می‌شود، بنابراین افزایش اسیدهای چرب آزاد در گردش (FFA) به افزایش TC، TG، LDL-C و کاهش HDL-C کمک می‌کند (36). نتایج ما نشان می‌دهد که کروسین به‌طور قابل توجهی TC، TG، LDL-C را کاهش و HDL-C را افزایش داد. نتایج ما هم‌راستا با مطالعه سمرقندیان و همکاران می‌باشد که کروسین را دارای اثرات کاهنده قندخون و کاهنده لیپید می‌دانند (43). کروسین احتمالاً با اثر بر بهبود QUICKI و HOMA-IR و در نتیجه کاهش لیپولیز و سطوح سرمی FFA نقش موثری در بهبود وضعیت دیس لیپیدی اعمال می‌نماید (42). علاوه بر این نتایج مطالعه حاضر نشان داد که، کروسین در ترکیب با لوزارتان توانست اثر لوزارتان را در بهبود وضعیت دیس لیپیدی به‌طور غیر معناداری مقداری افزایش دهد ممکن است با افزایش مدت زمان مداخله شاهد اثرات معناداری از ترکیب لوزارتان - کروسین در بهبود پروفایل لیپیدی باشیم.

مقایسه با سایر گروه‌های درمانی کاهش دهد و به گروه کنترل سالم نزدیک کند که این نشان‌دهنده اثرات مثبت کروسین در کنار داروی شیمیایی لوزارتان می‌باشد. به‌طور کلی نتایج مطالعه ما نشان داد که کروسین با کاهش مقاومت به انسولین، باعث بهبود وضعیت هیپرگلیسمی و دیس لیپیدی می‌گردد. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که کروسین در ترکیب با لوزارتان، عملکرد لوزارتان را در برابر دیابت و عوارض آن موثرتر می‌کند و اثر بخشی آن را افزایش می‌دهد. در نتیجه، ما پیشنهاد می‌کنیم که ترکیب کروسین با داروهای شیمیایی می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی امیدوارکننده در درمان دیابت و عوارض ناشی از آن باشد. با این حال، برای تأیید این موضوع، مطالعات انسانی بیش تری مورد نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر مستخرج از کار تحقیقاتی با کد رهگیری 5473 می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از مرکز مطالعات تجربی و حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (BUMS) و تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr* 2010;8(1):29.
- Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, Divers J, Isom S, Dolan L, et al. Incidence trends of type 1 and type 2 diabetes among youths, 2002–2012. *N Engl J Med* 2017; 376(15): 1419-1429.
- Carstensen B, Rønn PF, Jørgensen ME. Components of diabetes prevalence in Denmark 1996-2016 and future trends until 2030. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2020; 8(1): e001064.
- Awad SF, Huangfu P, Dargham SR, Ajlouni K, Batieha A, Khader YS, et al. Characterizing the type 2 diabetes mellitus epidemic in Jordan up to 2050. *Sci Rep* 2020; 10(1): 21001.
- Moradzadeh M, Sadeghnia HR, Tabarraei A, Sahebkar A. Anti-tumor effects of crocetin and related molecular targets. *J Cell Physiol* 2018; 233(3): 2170-2182.
- Domingueti CP, Dusse LMSA, Carvalho Md, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability

- and vascular complications. *J Diabetes Complications* 2016; 30(4): 738-745.
7. Yaribeygi H, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. Antioxidative potential of antidiabetic agents: A possible protective mechanism against vascular complications in diabetic patients. *J Cell Physiol* 2019; 234(3): 2436-2446.
 8. Yaribeygi H, Taghipour H, Taghipour H. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients undergoing CABG: brief report. *Tehran Univ Med J* 2014; 72(8): 570-574.
 9. Yaribeygi H, Atkin SL, Sahebkar A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J Cell Physiol* 2019; 234(2): 1300-1312.
 10. Rathod S. Novel Insights into the Immunotherapy-Based Treatment Strategy for Autoimmune Type 1 Diabetes. *Diabetology* 2022; 3(1): 79-96.
 11. Mariadoss AVA, Sivakumar AS, Lee CH, Kim SJ. Diabetes mellitus and diabetic foot ulcer: Etiology, biochemical and molecular based treatment strategies via gene and nanotherapy. *Biomed Pharmacother* 2022; 151: 113134.
 12. Amirshahrokhi K, Zohouri A. Carvedilol prevents pancreatic β -cell damage and the development of type 1 diabetes in mice by the inhibition of proinflammatory cytokines, NF- κ B, COX-2, iNOS and oxidative stress. *Cytokine* 2021; 138: 155394.
 13. Kiani B, Alizadeh-Fanalou S, Khomari F, Babaei M, Alipourfard I, Kalantari Hesari A, et al. The Effect of Hydroalcoholic Seed Extract of *Securigera Securidaca* on the Hepatic Renin-Angiotensin System in the Streptozotocin-Induced Diabetic Animal Model. *Clinical Diabetology* 2022; 11(2): 97-106.
 14. Friederich-Persson M, Persson P. Mitochondrial angiotensin II receptors regulate oxygen consumption in kidney mitochondria from healthy and type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020; 318(3): F683-F688.
 15. Luther JM, Brown NJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(12): 734-739.
 16. Pan Y, Qiao QY, Pan LH, Zhou DC, Hu C, Gu HF, et al. Losartan reduces insulin resistance by inhibiting oxidative stress and enhancing insulin signaling transduction. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015; 123(3): 170-177.
 17. Tang Y, Sun M, Liu Z. Phytochemicals with protective effects against acute pancreatitis: a review of recent literature. *Pharm Biol*. 2022;60(1):479-490.
 18. Song YN, Wang Y, Zheng YH, Liu TL, Zhang C. Crocins: A comprehensive review of structural characteristics, pharmacokinetics and therapeutic effects. *Fitoterapia* 2021; 153: 104969.
 19. Yaribeygi H, Katsiki N, Behnam B, Iranpanah H, Sahebkar A. MicroRNAs and type 2 diabetes mellitus: Molecular mechanisms and the effect of antidiabetic drug treatment. *Metabolism* 2018; 87: 48-55.
 20. Cerda-Bernad D, Valero-Cases E, Pastor JJ, Frutos MJ. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022; 62(12): 3232-3249.
 21. Sepahi S, Golfakhrabadi M, Bonakdaran S, Lotfi H, Mohajeri SA. Effect of crocin on diabetic patients: A placebo-controlled, triple-blinded clinical trial. *Clin Nutr ESPEN* 2022; 50: 255-226.
 22. Hussain MA, Abogresha NM, AbdelKader G, Hassan R, Abdelaziz EZ, Greish SM.

- Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Crocin Ameliorate Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 8841726.
23. Hosseini SA, Nik bakht H, Azarbayjani MA. The effect of aqua extract of saffron with resistance training on glycemic indexes of streptozotocin induced diabetic rats. *Armaghane Danesh* 2013; 18(4): 284-294.
 24. Behrouz V, Sohrab G, Hedayati M, Sedaghat M. Inflammatory markers response to crocin supplementation in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Phytother Res* 2021; 35(7): 4022-4031.
 25. Margaritis I, Angelopoulou K, Lavrentiadou S, Mavrovouniotis IC, Tsantarliotou M, Taitzoglou I et al. Effect of crocin on antioxidant gene expression, fibrinolytic parameters, redox status and blood biochemistry in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Res* 2020; 27(1): 4.
 26. Farshid AA, Tamaddonfard E, Moradi-Arzeloo M, Mirzakhani N. The effects of crocin, insulin and their co-administration on the heart function and pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed* 2016; 6(6): 658-670.
 27. Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Dariushnejad H, Chodari L, Mohaddes G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 2016; 39(10): 1179-1186.
 28. Alotaibi MR, Fatani AJ, Almnazel AT, et al. In vivo Assessment of Combined Effects of Glibenclamide and Losartan in Diabetic Rats. *Med Princ Pract.* 2019;28(2):178-85.
 29. Anbar HS, Shehatou GS, Suddek GM, Gameil NM. Comparison of the effects of levocetirizine and losartan on diabetic nephropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2016; 780: 82-92.
 30. Kotha P, Badri KR, Nagalapuram R, Allagadda R, Chippada AR. Anti-Diabetic Potential of the Leaves of *Anisomeles malabarica* in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(4): 1689-1702.
 31. Yaribeygi H, Atkin SL, Barreto GE, Sahebkar A. Crocin Improves Oxidative Stress in Testicular Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1308: 273-281.
 32. Sefidgar SM, Ahmadi-Hamedani M, Jebelli Javan A, Narenji Sani R, Javaheri Vayghan A. Effect of crocin on biochemical parameters, oxidative/antioxidative profiles, sperm characteristics and testicular histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed* 2019; 9(4): 347-361.
 33. Hazman Ö, Aksoy L, Büyükben A. Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes. *Turk J Med Sci* 2016; 46(5): 1593-1602.
 34. Taheri S, Zaghoul H, Chagoury O, Elhadad S, Ahmed SH, El Khatib N, et al. Effect of intensive lifestyle intervention on bodyweight and glycaemia in early type 2 diabetes (DIADEM-I): an open-label, parallel-group, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020; 8(6): 477-489.
 35. Cornejo MA, Dhillon J, Nishiyama A, Nakano D, Ortiz R M. Mass Recovery following Caloric Restriction Reverses Lipolysis and Proteolysis, but not Gluconeogenesis, in Insulin Resistant OLETF Rats. *PLoS One* 2021; 16(11): e0252360.
 36. Samarghandian S, Borji A, Delkosh MB, Samini F. Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative

- stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharm Sci* 2013; 16(2): 352-362.
37. Samaha MM, Said E, Salem HA. A comparative study of the role of crocin and sitagliptin in attenuation of STZ-induced diabetes mellitus and the associated inflammatory and apoptotic changes in pancreatic β -islets. *Environ Toxicol Pharmacol* 2019; 72: 103238.
38. Samarghandian S, Afshari R, Sadati A. Evaluation of Lung and Bronchoalveolar Lavage Fluid Oxidative Stress Indices for Assessing the Preventing Effects of Safranal on Respiratory Distress in Diabetic Rats. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 251378.
39. Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2013; 27(7): 1042-1047.
40. Shad M, Zaheer Z, Kausar S, Chiragh S. Comparative effects of losartan and pioglitazone on insulin resistance in rats. *Biomedica* 2014; 30(3): 1-5.
41. Shad MN, Aslam H, Shamim MO, Chiragh S, Ahmad Z. Comparison of Effect of Losartan with Pioglitazone on β -Cell Function in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Islamabad Medical Dental College* 2017; 6(3): 157-161.
42. Bayatpoor ME, Mirzaee S, Karami Abd M, Mohammadi MT, Shahyad S, Bahari Z. Crocin treatment decreased pancreatic atrophy, LOX-1 and RAGE mRNA expression of pancreas tissue in cholesterol-fed and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Complement Integr Med* 2019; 17(2).
43. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Crocin attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Cytokine* 2016; 88: 20-28.
44. Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic beta Cell Dysfunction in Diabetes. *Int J Mol Sci* 2021; 22(4): 1509.
45. El-Kordy EA, Alshahrani AM. Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohistochemical study. *J Microsc Ultrastruct* 2015; 3(3): 108-119.
46. Shree J, Choudhary R, Bodakhe SH. Losartan delays the progression of streptozotocin-induced diabetic cataracts in albino rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2019; 33(8): e22342.