Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

The Effect of Statins in Combination with Chemotherapy on Colon Cancer Cell Lines

A. Hedayatizadeh-Omran (MD, PhD)[1], F. Hasani (MD)[1], M. Saeedi (PhD)[2,3], R. Shekarriz (MD)[1], M. Ahmadi (MSc)[1], P. Ebrahimnejad (PhD)[2,3], R. Alizadeh-Navaei (MD, PhD)[*1]

1.Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-Communicable Diseases Research Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
2.Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
3.Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.

Article Type
Research Paper

Received:
Mar 3rd 2021
Revised:
May 2nd 2021
Accepted:
Aug 23rd 2021

ABSTRACT

Background and Objective: Considering the anti-cancer effects of statins on colon cancer previously reported in epidemiological studies and uncertainty about the mechanisms of action, this study was performed to investigate the effect of statins in combination with chemotherapy on colon cancer cell lines.
Methods: The present study, which is a laboratory study, was performed on HT-29 cell line as colon cancer cell line and normal HFF cell line. After cell culture, atorvastatin at doses of 15 and 30 µM, rosuvastatin at doses of 30 and 60 µM, simvastatin at doses of 10 and 20 µM and 5-fluorouracil (5-FU) at 20 µg/ml were used for interventions in this study. Interventions were performed alone and in combination. Finally, MTT test was performed to evaluate cell viability.
Findings: Mean cell viability in simvastatin (20 µM) and simvastatin (20 µM)+5-FU (20 µg/ml) on colorectal cancer cell lines was 58.46±7.58 and 55.73±15.33 (p=0.999), respectively, in rosuvastatin (30 µM) and rosuvastatin (30 µM)+5-FU (20 µg/ml) was 91.63±10.3 and 56.2±10.27 (p=0.026), respectively, and in atorvastatin (30 µM) and atorvastatin (30 µM)+5-FU (20 µg/ml) was 82.3±26.9 and 52.16±9.49 (p=0.24), respectively.
Conclusion: The evaluation of cell proliferation showed that the addition of rosuvastatin to standard chemotherapy, unlike atorvastatin and simvastatin, had an increasing effect on cytotoxicity.
Keywords: *Statins, Cancer, Colon.*

Cite this article: Hedayatizadeh-Omran A, Hasani F, Saeedi M, Shekarriz R, Ahmadi M, Ebrahimnejad P, et al. The Effect of Statins in Combination with Chemotherapy on Colon Cancer Cell Lines. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 50-5.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[*]Corresponding Author: R. Alizadeh-Navaei (MD, PhD)
Address: Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-Communicable Diseases Research Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
Tel: +98 (11) 33257230. **E-mail:** reza_nava@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

بررسی اثر استاتین ها همراه با داروی شیمی درمانی بر روی رده سلولی سرطان کولون

اکبر هدایتی زاده عمران (MD, PhD)[1]، فاطمه حسنی (MD)[1]، مجید سعیدی (PhD)[2,3]، رامین شکرریز (MD)[1]، محدثه احمدی (MSc)[1]، پدرام ابراهیم نژاد (PhD)[2,3]، رضا علیزاده نوائی (MD, PhD)[1*]

۱. مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۳۹۹/۱۲/۱۳
اصلاح:
۱۴۰۰/۲/۱۲
پذیرش:
۱۴۰۰/۶/۱

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اثرات ضد سرطانی گزارش شده از استاتین ها در مطالعات اپیدمیولوژیک برای سرطان کولون و مشخص نبودن مکانیسم های تاثیر آن، این مطالعه با هدف بررسی اثر استاتین ها همراه با داروی شیمی درمانی بر روی رده های سلولی سرطان کولون انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر که یک مطالعه آزمایشگاهی می باشد بر روی رده سلولی HT-29 به عنوان رده سلولی سرطان کولون و رده سلولی نرمال HFF انجام شده است. در این مطالعه پس از کشت سلول برای مداخلات از آتورواستاتین در دوزهای ۱۵ و ۳۰، رزواستاتین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکرومولار و سیمواستاتین در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکرومولار و داروی 5-FU در دوز ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. مداخلات به صورت تنهایی و ترکیبی انجام شد. در نهایت تست MTT برای بررسی حیات سلولی انجام شد.

یافته‌ها: میانگین حیات سلولی در سیمواستاتین ۲۰ و سیمواستاتین ۲۰+۵ فلوروراسیل ۲۰ بر رده سلوی سرطان کولون به ترتیب ۵۸/۴۶±۷/۵۸ و ۵۵/۷۳±۱۵/۳۳ (p=۰/۹۹۹)، در رزواستاتین ۳۰ و رزواستاتین ۳۰+۵ فلوروراسیل ۲۰ به ترتیب ۹۱/۶۳±۱۰/۳ و ۵۶/۲±۱۰/۲۷ (p=۰/۰۲۶) و در آتورواستاتین ۳۰ و آتروواستاتین ۳۰+۵ فلوروراسیل ۲۰ به ترتیب ۸۲/۳±۲۶/۹ و ۵۲/۱۶±۹/۴۹ (p=۰/۲۴) بود.

نتیجه‌گیری: بررسی پرولیفراسیون سلولی نشان داد که اضافه کردن رزواستاتین برخلاف آرتورواستاتین و سیمواستاتین در کنار داروی شیمی درمانی تاثیر افزاینده ای بر روی سمیت سلولی داشته است.

واژه‌های کلیدی: استاتین، سرطان، کولون.

استناد: اکبر هدایتی زاده عمران، فاطمه حسنی، مجید سعیدی، رامین شکرریز، محدثه احمدی، پدرام ابراهیم نژاد و دیگران. بررسی اثر استاتین ها همراه با داروی شیمی درمانی بر روی رده سلولی سرطان کولون. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۵-۵۰.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه فاطمه حسنی دانشجوی رشته پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۴۹۶۵ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر رضا علیزاده نوائی
آدرس: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، پژوهشکده بیماری های غیرواگیر، مرکز تحقیقات سرطان گوارش. تلفن: ۳۳۲۵۷۲۳۰-۰۱۱ رایانامه: reza_nava@yahoo.com

مقدمه

در میان سرطان ها، سرطان کولورکتـال شایعترین سرطان دستگاه گوارش بوده و ۳۸٪ سرطان های دستگاه گوارش را به خود اختصاص می دهد. این بیماری از نظر شیوع سومین سرطان شایع در مردان و چهارمین سرطان شایع در زنان (به جز سرطان پوست) بوده و میزان شیوع آن نسبت به سال های قبل در حال افزایش می باشد (۱). سرطان کولورکتال یک بیماری چند عاملی است. بیماری التهابی روده، فعالیت بدنی پایین، BMI بالا، مصرف گوشت قرمز، مصرف کم سبزیجات و میوه ها، سیگار کشیدن، سابقه خانوادگی از عوامل خطر برای این سرطان هستند (۲).

استاتین ها (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A[HMG-CoA]reductase inhibitors) یک عامل بالقوه کاهنده لیپید با بیشترین میزان تجویزند که نقش سمیتی آنها تا حدودی شناخته شده است (۴و۳). هدف اصلی استاتین، مسیر موالونات است که یک مسیر متابولیکی مهم است. استاتین ها سنتز موالونات (یک مرحله ابتدایی در بیوسنتز کلسترول) را مهار کرده و در نتیجه محصولات متابولیک پایین دست را در این مسیر مهار می کنند (۶و۵). مسیر موالونات نه تنها منجر به تولید کلسترول می شود بلکه ایزوپرنوئیدهایی که در پروسه های مختلف سلولی حیاتی هستند مثل رشد و تمایز سلولی را نیز تولید می کند (۷).

اخیراً اثرات مطلوب استاتین در کاهش وقوع سرطان کولون و خواص متاستاتیک توجه خاصی را به خود جلب کرده است. یک مطالعه کوهورت بزرگ بر پایه جمعیت، نشان داد که استفاده طولانی مدت از استاتین، منجر به کاهش نسبی ۴۷٪ در خطر ابتلا به سرطان کولورکتال بعد از تطبیق دیگر فاکتورهای خطر شناخته شده است. استاتین به همراه 5-FU بر پایه رادیوتراپی قبل از عمل، میزان پاسخ های پاتولوژیکی را در برابر سرطان رکتال بهبود می بخشد، در صورتیکه استفاده از استاتین در درمان بعد از جراحی، باعث بهبود نتایج بقا (بقای کلی و بقای عاری از بیماری بیماران مرحله III سرطان کولورکتال) نمی شود (۸). با توجه به نقش موثر استاتین در درمان سرطان که در مطالعات مشاهده ای گزارش شده است، در این پژوهش یک بررسی In Vitro و در راستای بررسی اثرات ضد پرولیفراسیون استاتین ها با هدف تعیین نقش استاتین های مختلف به همراه داروهای شیمی درمانی بر روی رده سلولی سرطان کولون انجام گردید.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر که یک مطالعه آزمایشگاهی در محیط invitro می باشد با کد اخلاق IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1398.019 بر روی رده های سلولی سرطان کولون HT-29 با کد C466 که از انستیو پاستور و HFF با کد C10721 که از مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی تهیه شده بود، انجام شد. سلول ها در فلاسک کشت سلولی و محیط RPMI 1640 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور CO2 ۵٪ و ۹۷٪ رطوبت کشت داده شدند. برای مداخلات از استاتین ها (آرتورواستاتین، رزواستاتین و سیمواستاتین) در غلظت های مختلف و از داروی 5-FU در دوز ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. مداخلات به صورت تنهایی و ترکیبی انجام شد. برای آترواستاتین از دوزهای ۱۵ و ۳۰ میکرومولار و برای رزواستاتین از دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکرومولار و برای سیموااستاتین از دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکرومولار استفاده شد. برای بررسی تاثیر ۱۲ نوع مداخله در این مطالعه از روش MTT برای سنجش میزان حیات سلولی استفاده شد و ۴۸ ساعت بعد از بعد از مداخله، محیط کشت حذف شد و سلول ها ۳ بار با PBS شستشو داده شدند. پودر MTT (به غلظت ۵ mg/ml که در PBS حل شده) به میزان ۲۵ µl به هر چاهک اضافه شد. پلیت مذکور با فویل آلومنیومی پوشانده شده و به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط رویی تخلیه شده و ۱۰۰ µl DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از آن پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و سپس به کمک دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ خوانش صورت گرفت. optimal density هر دوز نسبت به گروه کنترل ضرب در ۱۰۰ به عنوان میزان زنده بودن سلول ها گزارش گردید. تمام مداخلات ۳ بار تکرار گردید. اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS و آزمون های Anova و post hoc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

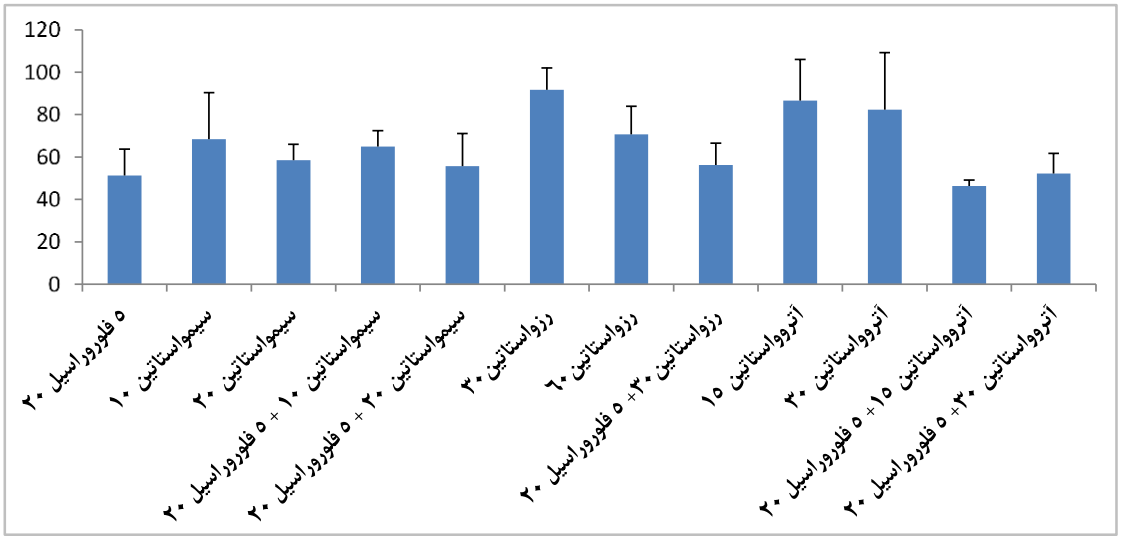
یافته ها

میانگین و انحراف معیار حیات سلولی در غلظت های مختلف استاتین ها و داوری شیمی درمانی بر رده سلوی HT-29 در نمودار ۱ نشان داده شده است. آزمون Anova اختلاف معنی داری بین دوزهای مختلف سیمواستاتین به تنهایی و در ترکیب با داروی شیمی درمانی و داروی شیمی درمانی به تنهایی نشان نداد. همچنین آزمون Tukey نیز حاکی از عدم اختلاف معنی داری بین مقایسه دو به دو گروه ها بود. در خصوص داروی رزواستاتین آزمون Anova

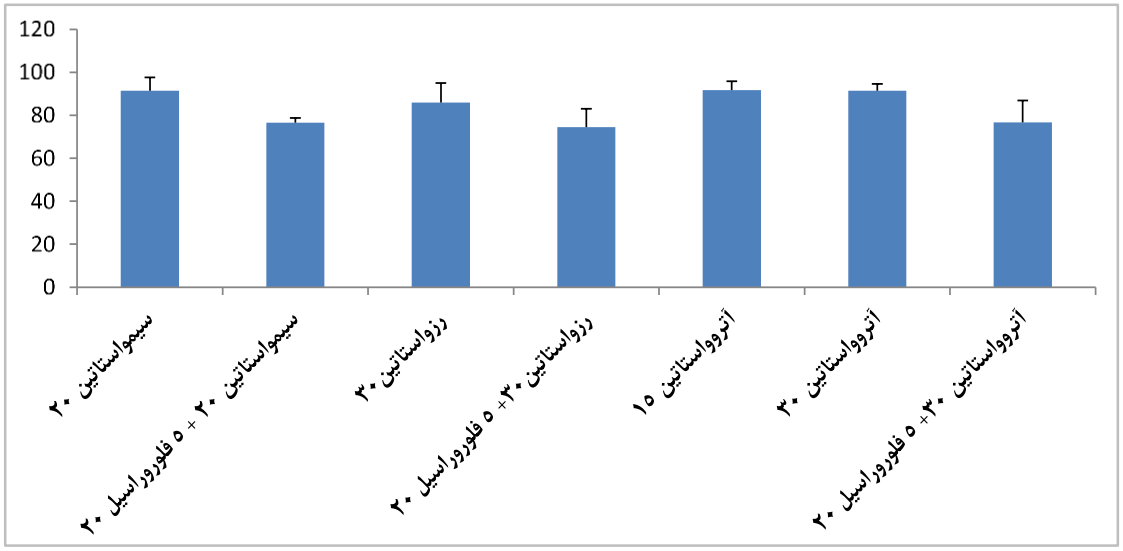
[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]

اختلاف معنی داری بین گروه ها نشان داد (p=۰/۰۱۱) و آزمون Tukey نیز حاکی از اختلاف معنی دار بین گروه رزواستاتین و رزواستاتین همراه با داروی شیمی درمانی بود (p=۰/۰۲۶). همچنین آزمون Anova حاکی از اختلاف معنی داری بین گروه های مختلف مرتبط با آتروواستاتین بود (p=۰/۰۳۳) که آزمون Tukey اختلاف معنی داری را بین مقایسه دو به دو گروه ها نشان نداد.

میانگین و انحراف معیار حیات سلولی در غلظت های مختلف استاتین ها و داوری شیمی درمانی بر رده سلوی HFF در نمودار ۲ نشان داده شده است. آزمون آماری نشان داد اختلاف معنی داری بین دوزهای مختلف اساتین ها به تنهایی در مقایسه با مداخلات ترکیبی استاتین ها همراه با داروی شیمی درمانی وجود ندارد.



نمودار ۱. مقایسه میانگین حیات سلولی در غلظت های مختلف سیمواستاتین و داوری شیمی درمانی بر رده سلوی HT-29



نمودار ۲. مقایسه میانگین حیات سلولی در غلظت های مختلف سیمواستاتین و داوری شیمی درمانی بر رده سلوی HFF

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن رزواستاتین برخلاف آرتورواستاتین و سیمواستاتین تاثیر افزاینده ای بر روی پرولیفراسیون سلولی داروهای شیمی درمانی داشته است. در اکثر مطالعات سلولی انجام شده استاتین ها تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی سایر فعالیت های سلولی مرتبط با سرطان داشته است. در مطالعه ای اثر لواستاتین بر سلول های سرطانی تیروئید مشاهده شده است؛ لواستاتین باعث القای فعالیت های پرو آپوپتوتیک در این سلول ها می گردد (۹). Yang و همکارانش نشان دادند که فعال شدن AMPK القا شده به وسیله آترواستاتین می تواند بیان P21 که ارتباط مثبتی با بیان beclin-1 در بیماران CRC دارد را القا کند. به طور خلاصه، فعال شدن AMPK به وسیله آترواستاتین باعث افزایش بیان P21 و پاسخ ER استرس و در نهایت اتوفاژی می شود (۱۰). Warita و همکاران با مطالعه بر روی سل لاین های مربوط به سرطان های کولون، تخمدان، پستان، ریه، پروستات، ملانوم و مغز نشان دادند که کاهش سطح کلسترول داخل سلولی ناشی از تیمار با آتروواستاتین با مهار رشد رده های سلول سرطانی ارتباط دارد. بیان اگزوژن سطح سلولی E-cadherin سلول های حساس به استاتین را به حالت مقاوم نسبی تبدیل می کند و این بدان معناست که مقاومت استاتین تا حدی به دست یافتن سلول‌های توموری به فنوتیپ اپیتلیال وابسته است. لذا همانطور که سلول های تومور متاستاز دهنده در طی شروع آبشار متاستاتیک تحت انتقال اپیتلیال به مزانشیمی قرار می گیرند، استاتین درمانی ممکن است یک روش موثر برای هدف قرار دادن سلول هایی با توان زیاد انتشار باشد (۱۱). عملکرد استاتین ها در برابر سرطان، مهار تشکیل کلسترول و تغییر ترکیب غشاء است که باعث فعال شدن فاکتورهای پروآپوپتوتیک همچون کاسپاز ۳ و القاء مرگ سلولی می شود (۱۲و۷). در مطالعه Qi و همکاران نشان دادند که سیمواستاتین مرگ سلول های سرطانی کولون را حداقل در بخشی به وسیله استرس اکسیداتیو داخل سلولی و القای آپوپتوز القا می کند (۱۳). مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که استاتین نقش مهاری بر روی سرطان را از طریق تاثیر در فرآیند آپوپتوز اعمال کرده و به نظر می رسد برخی از آنها از جمله رزواستاتین در فرآیند پرولیفراسیون سلول های سرطانی نقش داشته باشند.

با این حال این تناقض در سطح مطالعات سولولی، در مطالعات اپیدمیولوزیک در مورد استاتین ها نیز مشاهده شده است به طوریکه در مطالعه Clancy و همکاران میزان مورتالیتی تطبیق نشده برای گروه استاتین نسبت به گروه کنترل به ازای هر ۱۰۰ هزار نفر در سال، میزان کمتری داشت. بعد از تطبیق چند متغیره، مصرف کنندگان استاتین میزان وقوع کمتری از CRC در مقایسه با مصرف کنندگان از داروهای گلاکوما را داشتند. در آنالیزهای طبقه بندی شده بر اساس جنس، آنها ارتباط حفاظتی در مردان را مشاهده کردند، اما این نتایج در زنان صادق نبوده است (۱۴). با این حال در یک مطالعه در فنلاند تمام کاربران استاتین که از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۵ حداقل ۱ نسخه تجویز شده داشتند و در زمان خرید اول تشخیص سرطان نداشتند و برای میانگین ۸/۸ سال پیگیری شدند، به طور کلی، هیچ ارتباطی بین استفاده از استاتین ها و سرطان قابل تشخیص نبود (۱۵) و یا در بررسی دیگری در کانادا خطر CRC در میان مصرف کنندگان منظم استاتین در دراز مدت مشابه با خطر در افرادی بود که هرگز استاتین مصرف نمی کردند (۱۶).

از نقاط قوت مطالعه حاضر بررسی تاثیر استاتین ها بر روی پرولیفراسیون سلولی بوده است که مطالعات در این زمینه محدود می باشد و از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به عدم بررسی سایر مکانیسم های موثر در فرآیند سرطان از قبیل آپوپتوز اشاره کرد.

در نهایت می توان نتیجه گیری کرد که اضافه کردن رزواستاتین برخلاف آرتورواستاتین و سیمواستاتین در کنار داروی شیمی درمانی تاثیر افزاینده ای بر روی سمیت سلولی داروهای شیمی درمانی داشته است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به جهت حمایت از این تحقیق قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]

References

1.Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. Arch Iran Med. 2009;12(2):161-9.

2.Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. Cancer Causes Control. 2013;24(6):1207-22.

3.Athyros VG, Katsiki N, Tziomalos K, Gossios TD, Theocharidou E, Gkaliagkousi E, et al. Statins and cardiovascular outcomes in elderly and younger patients with coronary artery disease: a post hoc analysis of the GREACE study. Arch Med Sci. 2013;9(3):418-26.

4.Ahmadi M, Amiri S, Pecic S, Machaj F, Rosik J, Łos MJ, et al. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020;1866(12):165968.

5.Corcos L, Jossic-Corcos CL. Statins: perspectives in cancer therapeutics. Dig Liver Dis. 2013;45(10):795-802.

6.Livingstone E, Hollestein LM, Herk-Sukel MP, van de Poll-Franse L, Joosse A, Schilling B, et al. Statin use and its effect on all-cause mortality of melanoma patients: a population-based Dutch cohort study. Cancer Med. 2014;3(5):1284-93.

7.Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 1990;343(6257):425-30.

8.Ng K, Ogino S, Meyerhardt JA, Chan JA, Chan AT, Niedzwiecki D, et al. Relationship between statin use and colon cancer recurrence and survival: results from CALGB 89803. J Natl Cancer Inst. 2011;103(20):1540-51.

9.Di Matola T, D'Ascoli F, Luongo C, Bifulco M, Rossi G, Fenzi G, et al. Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome c and lamin B. Eur J Endocrinol. 2001;145(5):645-50.

10.Yang P-M, Liu Y-L, Lin Y-C, Shun C-T, Wu M-S, Chen C-C. Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. Cancer Res. 2010;70(19):7699-709.

11.Warita K, Warita T, Beckwitt CH, Schurdak ME, Vazquez A, Wells A, et al. Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. Sci Rep. 2014;4:7593.

12.Hayashida K, Stahl PD, Park PW. Syndecan-1 ectodomain shedding is regulated by the small GTPase Rab5. J Biol Chem. 2008;283(51):35435-44.

13.Qi X-F, Kim D-H, Yoon Y-S, Kim S-K, Cai D-Q, Teng Y-C, et al. Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. Toxicol Lett. 2010;199(3):277-87.

14.Clancy Z, Keith SW, Rabinowitz C, Ceccarelli M, Gagne JJ, Maio V. Statins and colorectal cancer risk: a longitudinal study. Cancer Causes Control. 2013;24(4):777-82.

15.Haukka J, Sankila R, Klaukka T, Lonnqvist J, Niskanen L, Tanskanen A, et al. Incidence of cancer and statin usage--record linkage study. Int J Cancer. 2010;126(1):279-84.

16.Singh H, Mahmud SM, Turner D, Xue L, Demers AA, Bernstein CN. Long-term use of statins and risk of colorectal cancer: a population-based study. Am J Gastroenterol. 2009;104(12):3015-23.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.7.3]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.50]