ISSN 2545 – 4439
ISSN 1857 - 923X

INTERNATIONAL JOURNAL

Institute of Knowledge Management

KNOWLEDGE

Vol. 48. 3.
Scientific Papers

MEDICAL SCIENCES AND HEALTH

KIJ Vol. 48 No. 3 pp. 369 - 602 Skopje 2021

CORRELATION BETWEEN COLLAGEN INDUCATED ARTHRITIS AND ANA IN THE WHITE LABORATORY RAT 541
Mire Spasov 541
Icko Gjorgoski 541
Verica Spasova 541
COSMETIC CARE FOR ADULTS 547
Gergana Pavlova 547
Maria Becheva 547
HYGIENE AS A BASIS FOR ADAPTATION OF ADOLESCENTS TO THE FACTORS OF THE WORKING ENVIRONMENT 553
Emilian Radev 553
Jeni Staykova 553
THE LEVEL OF QUALITY OF CARE IN ELDERLY NURSING HOMES: THE CASE OF NORTH MACEDONIA 559
Sanja Risteska 559
MENTAL HEALTH - SELF-ASSESSMENT AND PUBLIC TOLERANCE 565
Ivanka Stambolova 565
Mariana Pilaeva 565
APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES AND CYTOGENETIC METHODS IN HUMAN BIOMONITORING 571
Mileva Dragana 571
Velickova Nevenka 571
THE IMPORTANCE OF ACCREDITATION AND IMPLEMENTATION OF THE STUDY PROGRAM - PHYSICAL MEDICINE FOR THE LOCAL COMMUNITY 577
Tatjana Novaković 577
Zdravko Vitošević 577
Nenad Milošević 577
Jovana Milošević 577
Emilija Novaković 577
THE DIGITAL TRANSFORMATION OF HEALTHCARE IN THE CONDITIONS OF COVID-19 583
Kristina Kilova 583
ATTITUDES TOWARDS THE IMPLEMENTATION OF E-HEALTH IN BULGARIA AMONG MEDICAL SPECIALISTS FROM THE EMERGENCY MEDICAL CARE CENTERS IN THE CONDITIONS OF A PANDEMIC 589
Kristina Kilova 589
IMPACT OF DIGITALISATION ON THE ORGANISATION AND MANAGEMENT OF HEALTHCARE IN HEALTH FACILITIES 595
Antoniya Yaneva 595
Desislava Bakova 595
REFLECTION OF THE MANAGEMENT PRINCIPLES OF THE BUSINESS PROCESS IN THE HOSPITAL PROCESS 599
Darina Mineva 599

CORRELATION BETWEEN COLLAGEN INDUCATED ARTHRITIS AND ANA IN THE WHITE LABORATORY RAT

Mire Spasov
Faculty of Medical Science, University „Goce Delcev"- Stip, Republic of North Macedonia, mire.spasov@ugd.edu.mk
Icko Gjorgoski
Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University „St. Cyril and Methodius"- Skopje, Republic of North Macedonia, icko.gjorgoski@gmail.com
Verica Spasova
Clinical Hospital - Stip, Republic of North Macedonia, verica.spasova@yahoo.com

Abstract: Rheumatoid arthritis, autoimmune diseases and autoimmune syndromes belong to a special group of diseases in human pathology that manifest clinical, serological and pathohistological signs of activation of autoreactive lymphocyte clones. Activation of the immune system in these diseases is seen in the appearance of autoantibodies to one or more autoantigens. This usually happens when the immune system loses control of part of the lymphocytes that are specifically autoreactive with the cells of their own organism of functional and tissue antigens, or receptors. Antinuclear antibodies are antibodies that are directed against the structural components of the cell nucleus. The research aimed to determine whether treatment with type II collagen will have an effect on the immune system, haematological and biochemical parameters, including ANA in white laboratory rats of the Wistar strain, from both sexes on the 30th and 60th day after immunization. It turned out that induced rheumatoid arthritis leads to different effects on the individual parameters examined, but has no effect on either antinuclear antibodies. Collagen-induced arthritis caused a reaction in 100% of immunized rats with collagen type-II. As an experimental model was used a Wistar breed white laboratory rats, healthy animals of both sexes at seven weeks of age, bred according to standards for breeding experimental animals. They were divided into four groups; control group (n = 20) male animals, control group (n = 20) female animals, experimental group (n = 30) male animals treated with collagen type-II and experimental group (n = 30) female animals who were also treated with collagen type-II. The analyzes were performed on the 30th and 60th day after the immunization. The strictly prepared and highly purified collagen type-II we apply with syringes and small needles with a defined protocol in the knee joint on the back right foot. We took blood for analysis on the 30th and 60th day after the immunization. To determine ANA we used indirect immunofluorescence technique, which is a screening method. From the trials which were made for the effect of collagen induced arthritis on values of ANA in males and females, on the 30th and 60th day of treatment it can be concluded that there is negative ANA values in all groups and in both sexes of experimental animals. From the obtained ANA results in the female group also shows that there is no presence of ANA, as in male rats, but in the female control group there were two individuals where the presence of RNPC antibodies. It's generally concluded that autoimmunity tests in animal models and paralleling the clinical picture of rheumatoid arthritis in patients has a large contribution to clarifying many issues related to the disease.
Keywords: rheumatoid arthritis, CIA, ANA, immune system, rat.

КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ КОЛАГЕН ИНДУЦИРАНИОТ АРТРИТИС И ANA КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ

Мире Спасов
Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев"- Штип, Република Северна Македонија, mire.spasov@ugd.edu.mk
Ицко Ѓоргоски
Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј"- Скопје, Република Северна Македонија, icko.gjorgoski@gmail.com
Верица Спасова
Ј.З.У. Клиничка Болница - Штип, Република Северна Македонија, verica.spasova@yahoo.com

Резиме: Ревматоидните воспаленија, автоимуните болести и автоимуните синдроми припаѓаат на посебна група на болести во хуманата патологија кои манифестираат клинички, серолошки и патохистолошки знаци

за активација на автореактивните клонови на лимфоцитите. Активирањето на имунолошкиот систем кај овие болести се гледа во појавата на автоантитела на еден или повеќе автоантигени. Најчесто тоа се случува кога имунолошкиот систем ќе ја изгуби контролата над делот од лимфоцитите кои се специфично автореактивни со клетките на сопствениот организам на функциските и ткивните антигени, односно рецептори. Антинуклеарните антитела се антитела кои се насочени против структурните компоненти на клеточното јадро. Истражувањето имаше за цел да се утврди дали третманот со колаген тип II ќе предизвика ефект врз имунолошкиот систем, хематолошките и биохемиските параметри, меѓудругото и на ANA кај белите лабораториски стаорци од сојот Wistar, од двата пола на 30-иот и 60-иот ден после имунизацијата. Се покажа дека индуцираниот ревматоиден артритис доведува до различно влијание врз пооделните испитувани параметри, но нема влијание и врз антинуклеарните антитела. Колаген-индуцираниот артритис предизвика реакција кај скоро 100% од имунизираните стаорци со колаген тип-II. Како експериментален модел беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar, здрави животни од двата пола на возраст од седум недели, одгледувани по стандарди за одгледување на експериментални животни. Истите беа поделени во четири групи; контролна група (n=20) машки животни, контролна група (n=20) женски животни, експериментална група (n=30) машки животни кои се третираа со колаген тип-II и експериментална група (n=30) женски животни кои, исто така, се третираа со колаген тип-II. Анализите беа направени на 30-иот и на 60-иот ден после имунизацијата. Припреманиот високо прочистен колаген тип-II по строго дефиниран протокол го аплицираме со шприцови и мали игли во колeновиот зглоб на задната десна нога. Крв за анализи земавме на 30-иот и на 60-иот ден после имунизацијата. За одредување на ANA ја користевме техниката на индиректна имунофлуоресценција, која е screening метода. Од испитувањата кои беа направени за влијанието на колаген индуцираниот артритис врз вредностите на ANA кај машките и женските единки, на 30-иот и на 60-иот ден од третманот може да се заклучи дека има негативни вредности за ANA кај сите групи и кај двата пола на експериментални животни. Од добиените резултати за ANA кај женската група исто така се констатира дека нема присуство на ANA, како и кај машките стаорци, но кај женската контролна група имаше две единки каде е забележано присуство на RNPC антитела. Генерално се заклучува дека испитувањата на автоимунитетот кај животинските модели и поставувањето на паралела со клиничката слика на ревматоидниот артритис кај пациентите има голем придонес за разјаснување на многу прашања поврзани со болеста.
Клучни зборови: ревматоиден артритис, CIA, ANA, имунолошки систем, стаорец.

1. ВОВЕД

Ревматоидниот артритис (RA), е една од најтешките форми на ревматоидните болести која покрај болки и ограничени движења, предизвикува и деформитети на зглобовите и траен инвалидитет. Деструктивниот потенцијал на RA, текот, знаците и симптомите на болеста можат да варираат, да се појавуват и да се изгубат во текот на животот, но болеста во континуитет притаено перзистира. Болеста најверојатно е генетска и мултифакторијална, а отсуството на контролата е последица на подолго време нарушената регулација на фид-бек контролираните функции на нервно-хуморалниот и микро-васкуларниот систем кај генетски предиспонираните индивидуи. При воспалителните процеси, невроендокрината регулација на имуноста ја подразбира хомеостазата помеѓу централниот и периферниот нервен систем, хормоналниот циклус, клеточните и хуморалните интеракции со цитокините и невропептидите. Во ваквата контрола клучно место зазема постојаната поврзаност на функциите од нервниот и ендокриниот систем, каде ослободувањето на невротрансмитерите и на некои пептиди во CNS, доведува до стимулирање или инхибирање на една или повеќе од хипоталамус-хипофиза оските. Совршеноста на ваквата контрола што ја има нервно ендокрината функција во организмот ја одржува хомеостазата, независно од големиот број на надворешни влијанија. Меѓутоа, во ваквите физиолошки, нормално контролирани процеси, најразновидните стресогени фактори, од различни агенси, значително ја менуваат концентрацијата на споменатите пептиди, па и на повеќето хормони од хипоталамусот, хипофизата и останатите ендокрини жлезди. Повеќето испитувања го констатираат тератогеното дејство на одредени агенси со епизодни фебрилни состојби и различна инцидентност, а видот и острината на дефектите ќе зависат како од зафатеноста на зглобовите, така и од времетраењето на болеста. Животинските модели на RA се корисни за изучување на патогенезата на болеста и за процена на потенцијалните антиартритични лекови за клиничка употреба. Ова го овозможуваат морфолошките сличности со човечката болест и капацитетот на моделите да се предвидат и споредат резултатите со оние кај луѓето, бидејќи резултатите од животинските студии можат да бидат причински интерпретирани во компарација со хуманата ревматиодна болест. CIA тип II кај стаорецот, како животински модел за RA, е со докажана ефикасност и предвидливост во споредба со луѓето и акцентирана сличност со човечкиот RA, бидејќи, прво има капацитет да се предвиди и спореди ефикасноста на третманот

и кај луѓе, второ, лесно изведување на експериментите врз стаорците со разумно времетраење на тест периодот и трето, сличноста во патологијата и патогенезата со болеста кај човекот, но со многу побрз развој. Нашето истражување беше насочено кон утврдување на тоа дали третманот со колаген тип II ќе предизвика ефект, и каков, врз имунолошкиот систем, хематолошките и биохемиските параметри кај белите лабораториски стаорци од сојот Wistar, од машки и женски пол на 30-иот и 60-иот ден од постимунизацијата. Со нашите испитувања и добиените резултати после третманот со колаген тип II, се покажа дека индуцираниот RA доведува до различно влијание врз поеделните испитувани параметри и сумирано се гледа дека има влијание врз промената како на хематолошките, така и на биохемиските параметри во серумот кај испитуваните животни.

2. МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ

Како експериментален модел беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar. Избиравме здрави животни од двата пола, на возраст од седум недели, кои се чуваа во стандардни услови за експериментални животни. Истите беа хранети со стандардна храна за лабораториски животни по желба - ad libitum, а престојуваа на собна температура од 20 °C (± 2 °C), со светлосен режим 12:12 часа под постојана контрола.
Животните беа поделени во четири групи и тоа:
- контролна група (n=20) машки животни. Истата не беше третирана, туку само се испитуваа дадените серумски параметри за компарација со истите кај животните кои беа третирани со колаген тип II, односно артрозната група.
- контролната група (n=20) женски животни, која исто така не беше третирана, само се испитуваа дадените серумски параметри за споредување со истите кај животните кои беа третирани.
- експериментална група (n=30) машки животни кои се третираа со колаген тип-II. Анализите беа извршени на 30-иот и 60-иот ден од после имунизацијата.
- експериментална група (n=30) женски животни, кои се третираа со колаген тип-II. Анализите исто така, беа на 30-иот и на 60-иот ден после имунизацијата.

Припреманиот колаген по строго дефиниран протокол го аплицираме со мали, тенки-инсулински игли и шприцови во коленовиот зглоб на задната десна нога. Од стаорците се земаше крв на 30-иот и на 60-иот ден од пост-имунизацијата со колаген тип-II. Секое животно, кое ќе покажеше знаци на стрес, како неактивност, тимарење, коњуктивитис, губење на тежината, беше отстранувано од експериментот. За експериментот се употребуваше високо прочистен колаген тип-II, бидејќи квалитетот на колагенот и квалитетот на емулзијата има влијание врз поголема фрекфенција на артритоогенезата. Количината што се инјектираше беше точно 0,1 ml од емулзијата на колагенот, и 0,02 ml физиолошки раствор, при што посебно внимававме при боцкањето да не истече течноста. Земањето на крвта го вршевме од опашката во количина од околу 1 ml во специјални-ependorf епрувети. На крајот од експериментот, односно на 60-иот ден животните беа жртвувани. После земањето на крвта, ретракцијата на коагулумот и издвојувањето на серумот, означените епруветите се центрифугираа, а серумот го одделувавме со декантирање во посебни епрувети, без крвен коагулум.

3. РЕЗУЛТАТИ

Добиените резултати за антинуклеарните антитела кај машката група на стаорци се прикажани во табелата бр. 1. Од истата се гледа дека сите бележат негативни вредности, независно дали се тоа контролни или третирани групи на животни.

Табела бр. 1. Резултати од одредувањето антинуклеарни антитела кај машка група на животни

Резултати за присуство на антинуклеарни антитела (ANA) кај машки стаорци:		
Контолна група	Артрозна група 30 ден	Артрозна група 60 ден
Негативна вредност	Негативна вредност	Негативна вредност

Од добиените резултати за ANA кај женската група, кои што се прикажани во табелата бр. 2, исто така се констатира дека нема присуство на ANA, односно дека сите се со негативна вредност, исто како и кај машките стаорци. Кај женската контролна група имаше само два примерока, каде е забележано присуство на RNPC антитела.

Табела бр. 2. Резултати од одредувањето антинуклеарни антитела кај женска група на животни

Резултати за присуство на антинуклеарни антитела (ANA) кај женски стаорци		
Контолна група	Артрозна група 30 ден	Артрозна група 60 ден
Негативна вредност	Негативна вредност	Негативна вредност

4. ДИСКУСИЈА

Антителата во крвта имаат заштитна улога против надворешните агенси. Автоантителата се специфични протеини присутни во крвта, кои се производ на пореметената реакција во имунолошкиот систем на организмот. ANA се присутни од 30 до 40% од случаите, и се необични антитела откриени во крвта, кои исто така, се производ на пореметен имунолошки одговор и имаат способност да се врзуваат со одредени структури во јадрото на клетките, кое содржи DNA. ANA се пронајдени кај пациентите и експерименталните животни чии имунолошки систем е со предиспозиција да предизвика воспаление на сопствените телесни ткива. Антителата кои се насочени против сопствените ткива се автоантитела, а склоноста на имунолошкиот систем да се насочи против сопственото тело е автоимунитет. Во основа има голема веројатност од можното присуство на автоимуно заболување и при негативен резултат за овој параметар но, сепак, најчесто се негативни и останатите автоантитела. Концентрацијата на ANA во крвта како дијагностички параметар се користи при дијагностика на системските заболувања на сврзното ткиво како, колагенази, SLE, RA, склеродермија, дерматомиозит, полимиозит, васкулит и други. Испитувањата на ANA се изведува истовремено со други испитувања за да може да се потврди дијагнозата за автоимуно заболување и диференцијално да се дијагностицираат некои од заболувањата како RA, SLE, полимиозит или склеродермија. Голем проблем е тоа што со текот на времето, инфламаторните болести, како што се RA, полимиозитис, реактивниот артритис еволуираат една во друга или се појавуваат истовремено кај еден пациент со синдром на преклопување, мешање на клиничките слики на болестите, со што уште повеќе се комплицира состојбата за дијагностицирањето и третманот на болеста. Студии со CIA сугерираат дека декомплементацијата околу очекуваното време на болеста понекогаш го одложува артритисот до комплементарно ниво, кое се враќа на нормалното, но не го намалува специфичното влијание на CIA врз третираната група. Ова подразбира рефлектирање на најважниот допринос на имуно-комплексно-медијативната активација на комплементот во воспалителниот процес на болеста.
Нашите добиени резултати за ANA се прикажани во табелите бр. 1 и 2, соодветно за машката и женската популација на испитувани примероци. Истите покажаа дека кај сите животни, без разлика на групата (контролна или артрозна) или возраста (на 30-иот или 60-иот ден), но и на полот (дали се машки или женски), има негативни вредности за ANA. Карактеристично е да се нагласи дека кај женската контролна група имаше два примерока каде е забележано присуство на RNPC антитела. Слични резултати се добиени и кај други автори, како Million и Kirwan, кои нагласуваат дека во првите неколку месеци од третманот при CIA, овие имунолошки тестови можат да бидат негативни, а кај некои примероци и во текот на целиот период после третманот и перзистирањето на болеста. Некои литературни податоци наведуваат дека специфично за болести со имунолошка подлога, како што е RA е наод на ANA, но ако има висок титар над 95%. Други литературните податоци сугерираат дека кај околу 20% од третираните животни при индукција на RA има позитивни вредности за ANA.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Од испитувањата кои беа направени за влијанието на колаген индуцираниот артритис врз вредностите на ANA кај машките и женските единки на белиот лабораториски стаорец од сојот Wistar, може да се заклучи дека има негативни вредности за ANA кај сите групи и кај двата пола на експериментални животни. Како

главен заклучок од нашето истражување, но и од литературните податоци, е дека испитувањата на автоимунитетот кај животинските модели и поставувањето на паралела со клиничката слика на ревматоидниот артритис кај пациентите има голем придонес за разјаснување на многу прашања поврзани со оваа болест. Сите литературни податоци наведуваат дека RA како болест бара интердисциплинарен дијагностички пристап, вклучувајќи и континуирано интегрирање на новите достигнувања во науката, како и на базичната медицина.

ЛИТЕРАТУРА

Abd-Allah, S., Shahzad, M., Shabbir, A., & Yousaf, M. Z. (2019). Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF-α, IL-1, and NFκB expression levels. *Biomed. Pharmacother.* 111, 958–963. doi:10.1016/j.biopha.2019.01.006

Anthony, S.F., Dennis, L.K., Dan, L.L., Eugene, B., Stephen, L.H., Jameson, J.L., & Joseph, L. (2008). Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^{th} edition, 2083-2092.

Arnett, F.C. (1988). The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis Rheum 31:315.

Banham, A.H., Powrie, F.M., & Suri-Payer, E. (2006). FOXP(3) regulatory T cells: Current controversies and future perspectives (Review). European J. Immunol. 36(11): 2832- 2836.

Bennett, G.A., Waine, H., & Bauer, W., (1942). Changes in the knee joint at various ages with particular reference to the nature and development of degenerative joint disease, New York, The Commonwealth Fund. 146-162.

Bendele, A., Chlipala, L., Sennello, R., Frazier, J., Edwards, C., (2000). Combination benefit of treatment with soluble TNFRI and IL-1ra in rat models of arthritis. Arthritis Rheum. 43:2648-2659.

Bethesda, M.D. (1999). Rheumatoid Arthritis. National Institutes of Health, National Institute and Musculoskeletal and Skin Diseases.

Bouwman, L.H., Roep, B.O., Roos, A., (2016). Mannose-binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation and autoimmunity. Human Immunology. 67(4-5): 247-256.

Bran, M., Grossin, M., Weber, A., Chopin, M., Elbim, C., Pla, M., Gougerot-Pocidalo, M., & Gaudry, M. (2000). Suppression of arthritis and protection from bone destruction by treatment with TNP-470/AGM-1470 in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 43:2056-2063.

Cooke, A., Zaccone, P., Raine, T., Phillips, J.M., Dunne, D.W., (2018). Infection and autoimmunity: Are we winning the war, only to lose the peace? Trends in parasitology. 20(7): 316-321.

Costenbader, K.H. (2006). Smoking intensity, duration and cessation, and risc of rheumatoid arthritis in women. Am. J. Med. 119(6): 503.

Edwards, C.K., Chlipala, E.C., Dinarello, C.A., Reznikov, L., Moldawer, L.L., & Bendele, A.M. (1999). Clinical and histopathologic characterization of arthritis in male and female tumor necrosis factor knockout mice and membrane bound TNF-a transgenic mice injected with M. pulmonis or M. arthritidis. Arthritis Rheum. Abstract 296. Suppl. S120.

Hom, J., Bendele, A.M., & Carlsson, D. (1988). In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collageninduced arthritis in mice. J. Immunol. 141:834-841.

Hom, J., Gliszcznski, V.L., Cole, H.W., & Bendele, A.M. (1991). lnterleukin-1 mediated acceleration of type II collageninduced arthritis: Effects of anti-inflammatory or antiarthritic drugs. Agents Actions. 33:300-309.

Honda, K., & Littman, D.R. (2018). “The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 75–84.

Ishii, K.J., Uematsu, S., Akira, S., (2006). Toll gates for future immunotherapy (Review). Current Pharmaceutical Design. 12(32): 4135-4142.

Kamradt, T., Rolf. G., & Klaus, E.J. (2005). Induction, exaverbation and inhibiton of Allergic and autoimmune diseases by infection. 5 (26): 260-267.

Kim, E.Y., Sudini, K., Singh, A.K., Haque, M., Leaman, D., & Khuder, S. (2018). Ursolic acid facilitates apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by inducing SP1-mediated Noxa expression and proteasomal degradation of Mcl-1. *Feaeb. J.* 32, 6174–6185. doi:10.1096/fj.201800425r.

Kirwan, J.R., (1995). The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoids Study Group. Nejm; 333: 142-146.

Maeda, Y., & Takeda, K. (2019). “Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis,” *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 51, no. 12, pp. 1–6.

Million, R., Kellgren, J.H., Poole, P., Jayson. M.I., (1984). Long-term study of management of rheumatoid artritis. Lancet 1: 812-816.

Oldstone, M.B., (2017). Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. Current Topics in Microbiology & Immunology, 296:1-17.

Verhoeven, F., Totoson, P., Maguin-Gaté, K., Prigent-Tessier, A., & Marie, C., Wendling, D., et al. (2017). Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. Clin Exp Immunol. 2017; 188: 208–18. pmid:28152574.

Vinay, K., Abul, K.A., Nelson, F., Richard, N.M., (2007). Robbins Basic Pathology, 8th edition, 145-147.

Yang, F., Qian, E., & Zhang, M. (2020): "ishen Tongluo formula ameliorates collagen-induced arthritis in mice by modulation of Th17/Treg balance," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 250, p. 112428.