

ХІРУРГІЧНА СТОМАТОЛОГІЯ

УДК 616.315-007.254: 575.174

DOI <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2023.4.5>**С.В. Іванченко,**

асистент кафедри хірургічної стоматології,
Одеський національний медичний університет,
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,
індекс 65082

Т.Г. Вербицька,

кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник,
завідувач сектору молекулярно-генетичних досліджень,
Державна установа «Інститут стоматології
та щелепно-лицьової хірургії Національної академії
медичних наук України»,
вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна, індекс 65026

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ГЕНІВ TNFRSF11B, MTHFR ТА TNFSF11 У ВИНИКНЕННІ ЩІЛИНИ ГУБИ ТА ПІДНЕБІННЯ

Вроджені розщілини верхньої губи та/або піднебіння (РГ/П) – найпоширеніші щелепно-лицьові дефекти в людей, із частотою зустрічальності в середньому 1 на 700 народжень у всьому світі.

Поширеність РГ/П залежить від географічного положення, етнічної приналежності, раси, статі та соціально-економічного статусу. Найвищий рівень спостерігається в азіатів (1:500), середній рівень – у європейців (1:1000) і найнижчий – серед населення Африки (1:2500), з найвищим показником 19,05:10000 для Японії та найнижчим 3,13:10000 для Південно-Африканської республіки. Поширеність РГ/П в Україні становить у середньому 1:1000 новонароджених, як і в європейських країнах, з явною тенденцією до збільшення впродовж останнього десятиліття.

Мета дослідження. Ідентифікація генетичних факторів, що визначають схильність до формування розщілин.

Матеріал та методи дослідження. В дослідженні приймали участь 20 пацієнтів віку 16–25 років. Основна група нараховувала 10 пацієнтів з повною або частковою, одно- та двобічною розщілиною верхньої губи та дефектом верхньої щелепи; до контрольної групи було залучено 10 здорових індивідумів.

Проведено генотипизацію поліморфізмів rs2073618 TNFRSF11B (OPG) 1181G>C, rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val) та rs2277438 TNFSF11 (RANKL) -438 A>G у пацієнтів із повною або частковою, одно- та двосторонньою розщілиною верхньої губи та дефектом верхньої щелепи та в контрольній групі. Виявлено асоціацію алеля G поліморфізму rs2277438 гена TNFSF11, що кодує фактор диференціювання та активації остеокластів RANKL, із формуванням ущелин. Гомозиготний гено-

тип GG також асоціювався з підвищеним ризиком формування ущелин у рецесивній моделі успадкування. Дослідна і контрольна групи не різнилися достовірно за розподілом частот генотипів і алелів поліморфізмів генів TNFRSF11B (остеопротегерин) і MTHFR (метилентетрагідрофолатредуктаза).

Висновки. Поліморфізм rs2277438-438 A>G гена TNFSF11, який кодує фактор диференціювання й активації остеокластів, що відіграє роль у регенерації та ремоделюванні кісткової тканини, може бути пов'язаний із ризиком формування розщілин. Це спостереження потребує подальшої верифікації в групах із більшою кількістю пацієнтів.

Ключові слова: розщілини губи та піднебіння, поліморфізм, полімеразна ланцюгова реакція, стоматологія, генотипизація

S.V. Ivanchenko,

Assistant of the Department of Surgical Stomatology,
Odesa National Medical University,
2, Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

T.G. Verbitska,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher,
Head of the Sector of Molecular Genetic Research,
State Institution "Institute of Stomatology and Maxillofacial
Surgery of the National Academy of Medical Sciences
of Ukraine",
S 11 Richelievskaya street, Odesa, Ukraine,
postal code 65026

RESEARCH OF THE ROLE OF TNFRSF11B, MTHFR AND TNFSF11 GENES IN CLEFT LIP AND PALATE

Congenital cleft upper lip and / or palate are the most common maxillofacial defects in humans, with an average incidence of 1 in 700 births worldwide. The prevalence of cleft upper lip and/or palate depends on geographical location, ethnicity, race, gender, and socio-economic status. The highest rate is observed among Asians (1:500), the average among Europeans (1:1000) and the lowest among the African population (1:2500), with the highest rate of 19.05:10000 for Japan and the lowest of 3.13:10000 for the Republic of South Africa. The prevalence of RG / P in Ukraine averages 1:1000 newborns, as in European countries, with a clear tendency to increase over the past decade. **Purpose of the study.** Identification of genetic factors that determine the tendency to form splits.

Material and research methods. The study involved 20 patients aged 16–25 years. The main group consisted of 10 patients with complete or partial, unilateral and bilateral cleft upper lip and upper jaw defect; the control group included 10 healthy people. Genotyping of polymorphisms rs2073618 TNFRSF11B (OPG) 1181g>C, rs1801133 MTHFR 677c>T (Ala222Val) and rs2277438 TNFSF11 (RANKL) -438 A>G was performed

in patients with complete or partial, one – and two-sided cleft upper lip and upper jaw defect and in the control group. The G allele of the rs2277438 polymorphism of the TNFSF11 gene encoding the osteoclast differentiation and activation factor RANKL was found to be associated with cleft formation. The homozygous GG genotype was also associated with an increased risk of cleft formation in the recessive inheritance model. The experimental and control groups did not significantly differ in the frequency distribution of genotypes and alleles of polymorphisms of the TNFRSF11B (osteoprotegerin) and MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) genes.

Conclusions. The rs2277438-438 A>G polymorphism of the TNFSF11 gene, which encodes an osteoclast differentiation and activation factor that plays a role in bone regeneration and remodeling, may be associated with the risk of cleft formation. This observation requires further verification in groups with a large number of patients.

Key words: cleft lip and palate, polymorphism, polymerase chain reaction, dentistry, genotyping.

Вроджені розщілини верхньої губи та/або піднебіння (РГ/П) – найпоширеніші щелепно-лицьові дефекти в людей, із частотою зустрічальності в середньому 1 на 700 народжень у всьому світі [1]. Крім того, РГ/П як група дефектів є другою за поширеністю вродженою вадою розвитку після клишоногості [2]. Поширеність РГ/П залежить від географічного положення, етнічної приналежності, раси, статі та соціально-економічного статусу [3]. Найвищий рівень спостерігається в азіатів (1:500), середній рівень – у європейців (1:1000) і найнижчий – серед населення Африки (1:2500), з найвищим показником 19,05:10000 для Японії та найнижчим 3,13:10000 для Південно-Африканської республіки [4]. Поширеність РГ/П в Україні становить у середньому 1:1000 новонароджених, як і в європейських країнах, з явною тенденцією до збільшення впродовж останнього десятиліття. Загалом етнічні відмінності зберігаються навіть після міграції, що дає змогу припустити їхню опосередкованість більшою мірою генетичними факторами, порівняно з факторами навколишнього середовища.

Мета дослідження. Ідентифікація генетичних факторів, що визначають схильність до формування розщілин. У рамках цього дослідження нами проведено генотипування та порівняння частот генотипів і алелів поліморфізмів rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C, rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val) і rs2277438 TNFSF11 -438 A>G у пацієнтів із розщілинами та в контрольній групі.

Матеріал та методи дослідження. В дослідженнях приймали участь 20 пацієнтів віку 16–25 років. Основна група нараховувала 10 пацієнтів з повною або частковою, одно та двобічною

розщілиною верхньої губи та дефектом верхньої щелепи; до контрольної групи було залучено 10 здорових індивідуумів. Стоматологічний огляд проведено в умовах стоматологічного кабінету у відділенні хірургічної реабілітації хворих із захворюваннями щелепно-лицьової ділянки та реконструктивної стоматології ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицьової хірургії Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІСЦЛХ НАМН»).

Виділення ДНК з клітин букального епітелію проводили за модифікованою методикою з використанням Chelex [5]. У пробірку (Eppendorf), в якій знаходився аплікатор з зіскрібком епітеліальних клітин, вносили 200 мкл 5%-го розчину Chelex 100 в дистильованій стерильній воді (Chelex в натрієвій формі, 100–200 меш, Bio-Rad). Перед додаванням смоли перемішували до гомогенного стану піпеткою з широким отвором та відбирали аліквоту безпосередньо під час перемішування. Інкубували при 56° 30 хвилин з постійним перемішуванням на термошейкері. Потім інкубували при 96°С протягом 8 хвилин, періодично струшуючи. Після інкубації центрифугували 3 хвилини при 12000 g (Eppendorf Centrifuge 5424). Концентрацію та чистоту препарату ДНК визначали спектрофотометрично (Nanophotometr, Implen, Німеччина), відібравши аліквоту 5 мкл безпосередньо із пробірки з розчином ДНК. Для ПЛР відбирали 5 мкл супернатанту.

Для дослідження поліморфізму rs2277438 TNFSF11 -438 A>G застосовували трипраймерну полімеразну ланцюгову реакцію (ARMS-ПЛР). Використовували два прямі праймери на 5'-кінці, один з яких специфічний для мутантного алеля, інший – для нормального алеля, і загальний зворотний праймер на 3'-кінці. Праймери синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Інкубаційну суміш готували в стерильних умовах у ПЛР-боксі з використанням ПЛР-буфера фірми Fermentas (Литва).

Алельні варіанти поліморфізмів rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C і rs1801133 MTHFR 677 C>T (Ala222Val) оцінювали методом алель-специфічної ПЛР. Ампліфікацію промоторних ділянок генів, що досліджувались, проводили паралельно у двох пробірках (Eppendorf) для нормального і мутантного алелю кожного гена в 20 мкл буферного розчину з додаванням 100 нм кожного з пари алель-специфічних олігонуклеотидних праймерів (Metabion, Німеччина)

Ампліфікацію проводили на термоциклері “Analytik Jena” (Flex Cycler, Німеччина). Умови реакції були такими: початкова денатурація впро-

довж 5 хв за 94°C, 35 циклів (20 сек 94°C, відпал 30 сек 53°C для TNFSF11 та 30 сек 55°C для TNFRSF11B та MTHFR 677, елонгація 30 сек 72°C).

Фракціонування продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу у горизонтальному 2% агарозному гелі, приготуваному на одноразовому трис-ацетатному буфері (1xTAE), при напрузі 100В протягом 45 хвилин. Як маркер молекулярної ваги використовували ДНК рUC19: Msp1. Агарозний гель фарбували бромистим етидієм і візуалізували в ультрафіолетовому світлі.

Статистичну обробку отриманих результатів, що включала тест на відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга (РХВ) та оцінку асоціації генотипів та алелів з ризиком пародонтиту методом Пірсона χ^2 проводили з використанням програми генетичної статистики DeFinetti на сайті Інституту генетики (Мюнхен, Німеччина). Асоціації характеризувалися відношенням шансів (ВШ) з 95 % довірчим інтервалом та методом критерію згоди Пірсона χ^2 . Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущими.

Результати та їх обговорення. Проведено генотипування групи пацієнтів із розщілинами (n=10) і контрольної групи (n=10) за такими поліморфізмами: rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C, rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val) і rs2277438 TNFSF11 -438 A>G. У досліджуваних групах проаналізовано розподіл частот генотипів, відповід-

ність їхнього розподілу рівновазі Харді-Вайнберга (РХВ), а також відмінності між групами за розподілом частот генотипів і алелів. За всіма поліморфізмами частоти розподілу генотипів відповідали теоретично розрахованим за РХВ в обох групах ($p > 0,05$; табл. 1).

Виявлено відмінності між групами за розподілом генотипів і алелів однонуклеотидного поліморфізму гена TNFSF11 rs2277438 -438 A>G. Частота мутантного алеля G цього поліморфізму була вищою в дослідній групі порівняно з контролем: 0,70 і 0,35 відповідно (таблиця 1). Цей алель асоціювався з підвищеним ризиком формування розщілин: ВШ=4,333 (95% ДІ 1,150-16,323), достовірність значення $\chi^2 p = 0,026$ (табл. 1). Гомозиготний генотип GG також асоціювався з підвищеним ризиком формування розщілин у рецесивній моделі: достовірність значення величини $\chi^2 p = 0,008$ (табл. 1). Дослідна і контрольна групи не різнилися достовірно за розподілом частот генотипів і алелів поліморфізмів генів TNFRSF11B і MTHFR. Частота мутантного алеля C поліморфізму rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C була 0,500 і 0,450 у досліді та контролі, ВШ=1,222 (95 % ДІ 0,353–4,235), достовірність значення величини $\chi^2 p = 0,751$; частота мінорного алеля T поліморфізму rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val) – 0,100 і 0,050 відповідно, ВШ=2,111 (95% ДІ 0,176-25,349), $p = 1,000$ (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл та порівняння частот генотипів та алелей поліморфізму rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C та rs2277438 TNFSF11-438 A>G у групах пацієнтів

Поліморфізм	rs2073618 TNFRSF11B 1181G>C						
	Генотип, алель	GG	GC	CC	Алель G	Алель C	РХВ р-значення
Випадок, частота		0,400	0,200	0,400	0,500	0,500	0,057
Контроль, частота		0,300	0,500	0,200	0,550	0,450	0,974
Порівняння частот	C<>G	GC<>GG	GC+CC<>GG ДМ	CC<>GG+GC РМ	–	–	–
ВШ (95 % ДІ)	1,222 (0,353-4,235)	0,300 (0,033-2,763)	0,643 (0,101-4,097)	1,500 (0,156-14,420)	–	–	–
χ^2 , р-значення	0,751	0,280	0,639	0,724	–	–	–
Поліморфізм	rs2277438 TNFSF11-438 A>G						
	Генотип, алель	AA	AG	GG	Алель A	Алель G	РХВ р-значення
Випадок, частота		0,000	0,600	0,400	0,300	0,700	0,175
Контроль, частота		0,300	0,700	0,000	0,650	0,350	0,088
Порівняння частот	G<>A	AG<>AA	AG+GG<>AA ДМ	GG<>AA+AG РМ	–	–	–
ВШ (95 % ДІ)	4,333 (1,150-16,323)	6,067 (0,262-140,701)	9,800 (0,438-219,247)	63,000 (0,982-4042,065)	–	–	–
χ^2 , р-значення	0,026	0,136	0,060	0,008	–	–	–

Примітка: ДІ – довірчий інтервал; ДМ – домінантна модель; РМ – рецесивна модель; РХВ – рівновага Харді-Вайнберга. Достовірні значення відношення шансів (95 % ДІ) та значення $p < 0,05$ виділені жирним шрифтом.

Розподіл та порівняння частот генотипів та алелей поліморфізму rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val) у групах пацієнтів

Поліморфізм	rs1801133 MTHFR 677C>T (Ala222Val)						
	Генотип, алель	GG	GC	CC	Алель G	Алель C	PXB р-значення
Випадок, частота		0,400	0,200	0,400	0,500	0,500	0,057
Контроль, частота		0,300	0,500	0,200	0,550	0,450	0,974
Порівняння частот	C<>G	GC<>GG	GC+CC<>GG ДМ	CC<>GG+GC РМ	–	–	–
ВШ (95% ДІ)		1,222 (0,353-4,235)	0,300 (0,033-2,763)	0,643 (0,101-4,097)	1,500 (0,156-14,420)	–	–
χ^2 , р-значення		0,751	0,280	0,639	0,724	–	–

Примітка: ДІ – довірчий інтервал; ДМ – домінуюча модель; РМ – рецесивна модель; РХВ – рівновага Харді-Вайнберга. Достовірні значення відношення шансів (95 % ДІ) та значення $p < 0,05$ виділені жирним шрифтом

Гени TNFSF11 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11, також відомий як RANKL, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) та TNFRSF11B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B, також відомий як OPG, остеопротегерин), є компонентами осі TNFRSF11A/TNFRSF11/TNFRSF11B, що відіграє важливу роль у підтримці рівноваги між процесами резорбції кістки остеокластами та утворення кістки остеобластами, у регуляції ремоделювання кістки, диференціювання остеокластів та остеолізу. Фактор диференціювання та активації остеокластів TNFSF11 (RANKL), що забезпечують резорбцію кістки, або втрату кісткової маси, кодується однойменним геном, що входить до численого сімейства генів факторів некрозу пухлини (TNF). Зв'язування TNFSF11 з TNFRSF11A на преостеокластах та зрілих остеокластах сприяє утворенню, активації та виживанню багатоядерних остеокластів під час нормального ремоделювання кістки та різних патологічних станів [6]. TNFRSF11B, рецептор-пастка для TNFSF11, захищає кістку від надмірної резорбції за рахунок зв'язування з TNFSF11 і тим самим запобігає його зв'язуванню з TNFRSF11A [6]. Гени, що кодують білки цієї осі, добре відомі як гени-кандидати, що впливають на підтримання здоров'я кісток [7]. За результатами нашого дослідження однонуклеотидний поліморфізм одного з цих генів TNFSF11 може бути фактором генетичної схильності до утворення розщипин. Ці дані потребують подальшого експериментального підтвердження з використанням більш репрезентативної вибірки пацієнтів. У літературі показано асоціацію поліморфізму rs2277438 TNFSF11 з кістковими патологіями. Зокрема, G-алель асоціювалася

з підвищеним ризиком ревматоїдного артрити [8], радіографічною прогресією ревматоїдного артрити і ризиком анкілозівного спондиліту [9]. Виявлено асоціацію GG-генотипу поліморфізму rs2277438 TNFSF11 з остеопенією [10], а генотип AG асоціювався зі зниженим рівнем 25-ОН вітаміну D у сироватці хворих на остеопороз [11]. У цьому ж дослідженні поліморфізм rs2073618 1181G>C гена остеопротегерину TNFRSF11B визнано фактором ризику розвитку остеопорозу в жінок після менопаузи. Наш аналіз не виявив будь-якого впливу цього поліморфізму на формування розщипин.

Нарешті, ген MTHFR кодує фермент метилентетрагідрофолатредуктазу, який відіграє ключову роль у метаболізмі фолату та метіоніну. Фолієва кислота, або вітамін B9, запобігає дефектам формування нервової трубки; нещодавній метааналіз досліджень асоціації фолієвої кислоти та несиндромних РГ/П, опублікованих до 2020 року включно, виявив зниження ризику РГ/П у потомства жінок, що приймали до та під час вагітності добавки, які містять фолієву кислоту, на 40% та 12%, відповідно [12]. Мінорний T-алель поліморфізму rs1801133 MTHFR 677C>T, що призводить до заміни аланіну на валін у позиції 222, пов'язують зі зниженою активністю метилентетрагідрофолатредуктази. У базі даних PubMed перераховано понад 3000 досліджень, що пов'язують поліморфізм rs1801133 з різними захворюваннями, включно з онкологічними, серцево-судинними, шизофренією, дефектами нервової трубки та іншими, хоча подібні асоціації далеко не завжди підтверджені повторними дослідженнями. За даними мета-аналізу поліморфізм rs1801133 C677T асоціюється з несиндромними

РГ/П [13]; гомозиготність за С- або Т-алелем у жінок є фактором ризику утворення розщілин [14], хоча цей ефект залежить від популяції. Наше дослідження не виявило жодних відмінностей між дослідною та контрольною групою за розподілом алелей і генотипів цього поліморфізму, що може свідчити про відсутність зв'язку між rs1801133 і ризиком формування розщілин в українській популяції (табл. 2).

Висновки. Поліморфізм rs2277438-438 А>G гена TNFSF11, який кодує фактор диференціювання й активації остеокластів, що відіграє роль у регенерації та ремоделюванні кісткової тканини, може бути пов'язаний із ризиком формування розщілин. Це спостереження потребує подальшої верифікації в групах із більшою кількістю пацієнтів.

Література:

- Massenburg, B.B., Jenny, H.E., Saluja, S., Meara, J.G., Shrimel, M.G., & Alonso, N. (2016). Barriers to Cleft Lip and Palate Repair Around the World. *J Craniofac Surg*, 27(7), 1741–1745 doi: 10.1097/SCS.00000000000003038.
- Peter, E., & Larsen, D. (2004). Reconstruction of the Alveolar Cleft. *Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. Peterson's second ed. m. Miloro*, 2, 859–870.
- Yang, J., Carmichael, S.L., Canfield, M., Song, J., & Shaw, G.M. (2008). National Birth Defects Prevention Study. Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study. *Am J Epidemiol*, 167(2), 145–54. doi: 10.1093/aje/kwm283
- Martín-Del-Campo, M., Rosales-Ibañez, R., & Rojo, L. (2019). Biomaterials for Cleft Lip and Palate Regeneration. *Int J Mol Sci*, 20(9), 2176 doi: 10.3390/ijms20092176
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., & Higushi, R. (2013). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 54(3), 134–9.
- Xiong, J., & O'Brien, C.A. (2012). Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 27(3), 499–505.
- Dougall, W.C. (2012). Molecular pathways: osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clin Cancer Res*, 18(2), 326–335.
- Assmann, G., Koenig, J., Pfreundschuh, M., Eppelen, J.T., Kekow, J., Roemer, K., & Wiczorek, S. (2010). Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *J Rheumatol*, 37(5), 900–4. doi: 10.3899/jrheum.091110.
- Qian, B.P., Wang, X.Q., Qiu, Y., Jiang, J., Ji, M.L., & Feng, F. (2014). Association of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene polymorphisms with the susceptibility to ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Orthop Sci*, 19(2), 207–212. doi: 10.1007/s00776-013-0528-5
- Abdi, S., Bukhari, I., Ansari, M.G.A., BinBaz, R.A., Mohammed, A.K., Hussain, S.D., Aljohani, N., & Al-Daghri, N.M. (2020). Association of Polymorphisms in RANK and RANKL Genes with Osteopenia in Arab Postmenopausal Women. *Dis Markers*, 2020, 1285216. doi: 10.1155/2020/1285216
- Abdi, S., Binbaz, R.A., Mohammed, A.K., Ansari, M.G.A., Wani, K., Amer, O.E., Alnaami, A.M., Aljohani, N., & Al-Daghri, N.M. (2021). Association of RANKL and OPG Gene Polymorphism in Arab Women with and without Osteoporosis. *Genes (Basel)*, 12(2), 200. doi: 10.3390/genes12020200
- Zhou, Y., Sinnathamby, V., Yu, Y., Sikora, L., Johnson, C.Y., Mossey, P., & Little, J. (2020). Folate intake, markers of folate status and oral clefts: An updated set of systematic reviews and meta-analyses. *Birth Defects Res*, 112(19), 1699–1719. doi: 10.1002/bdr2.1827
- de Aguiar, P.K., Coletta, R.D., de Oliveira, A.M., Machado, R.A., Furtado, P.G., de Oliveira, L.A., & et al. (2015). rs1801133C>T polymorphism in MTHFR is a risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 103(4), 292–8. doi: 10.1002/bdra.23365
- Saleem, K., Zaib, T., Sun, W., & Fu, S. (2019). Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon*, 5(12), e03019. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e03019