

УДК: 616.211-002-053.2-085  
DOI: 10.24061/2413-4260.XIII.4.50.2023.6

*Т. О. Крючко, В. В. Щербак,  
Л. М. Бубир, О. В. Ізмайлова,  
О. Я. Ткаченко*

Полтавський державний медичний університет  
(м. Полтава, Україна)

## ВИВЧЕННЯ ЦИРКАДІАННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ГОДИННИКА У ПЕДІАТРИЧНИХ ПАЦІЄНТІВ ІЗ СЕЗОННИМ АЛЕРГІЧНИМ РИНИТОМ: ПОТЕНЦІЙНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ

### Резюме

Розуміння взаємозв'язку між циркадіанним молекулярним годинником та алергічними захворюваннями продовжує вивчатися й може мати практичне значення для подальшого підбору оптимального лікування.

**Метою роботи** була оцінка ступеня експресії мРНК генів *bmal1* та *per1* циркадіанного молекулярного годинника в клітинах букального епітелію та вивчення ефективності протокольного лікування у дітей із сезонним алергічним ринітом в залежності від часу доби застосування терапії.

**Матеріал та методи дослідження.** У дослідження було включено 20 пацієнтів віком від 6 до 17 років з верифікованим діагнозом сезонного алергічного риніту (САР). До групи контролю були залучені 7 здорових дітей відповідного віку без будь-яких алергічних та хронічних захворювань в анамнезі. Всі пацієнти з САР були розподілені на 2 групи по 10 чоловік, які отримували протокольну терапію протягом 4 тижнів зранку (1-ша група) та ввечері (2-га група). Експресію генів циркадіанного молекулярного годинника досліджували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу шляхом забору букального епітелію ротової порожнини дітей у ранковий (8:00) та вечірній (20:00) час з повторним дослідженням зразків через 1 місяць після проведеного лікування.

Дизайн дослідження був обговорений та схвалений на засіданні медико-етичної комісії Української медичної стоматологічної академії, протокол № 188 від 25.11.2020 р., де було видано дозвіл на проведення медико-біологічних досліджень.

Статистичний аналіз проводився за допомогою комп'ютерної програми GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Дослідження проведено відповідно до плану науково-дослідної роботи кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету «Оптимізація ранньої діагностики, лікування та визначення прогнозу найбільш поширених захворювань дитячого віку», номер державної реєстрації 0122U001876 (2021-2026 роки виконання) та науково-дослідної роботи науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ПДМУ «Розробка методики лікування та профілактики розвитку фіброзу легень шляхом активації PPAR-gamma рецепторів», номер державної реєстрації 0122U201686 (2023-2025 роки виконання).

**Результати дослідження.** Ранкова експресія генів у здорових дітей продемонструвала статистично вищі рівні *per1* ( $0,780 \pm 0,070$ ) порівняно з показниками *bmal1* ( $0,293 \pm 0,074$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як ввечері рівень останнього ( $0,697 \pm 0,130$ ) навпаки був достовірно вищим за значення *per1* ( $0,370 \pm 0,044$ ;  $p < 0,05$ ). Порівнюючи рівні показників *per1*, в даній групі, можна сказати, що ранкова експресія даного гену ( $0,780 \pm 0,070$ ) була вищою ніж у вечірній час ( $0,370 \pm 0,044$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як експресія *bmal1* була більшою о 20:00 ( $0,697 \pm 0,130$  проти  $0,293 \pm 0,074$ ;  $p < 0,05$ ). На противагу цього у пацієнтів із САР відрізняв достовірно вищий рівень експресії мРНК гена *bmal1* ( $1,036 \pm 0,161$  проти  $0,293 \pm 0,074$  у здорових дітей ( $p < 0,05$ ). При дослідженні експресії генів дітей з САР у вечірні години з'ясовано, що значення *bmal1* в усіх учасників продемонстрували подібні рівні експресії ( $0,775 \pm 0,163$  проти  $0,697 \pm 0,130$ ;  $p > 0,05$ ), тоді як рівень мРНК гена *per1* був статистично вищий у хворих з ринітом ( $1,293 \pm 0,186$ ;  $p < 0,01$ ).

**Висновки.** Отримані результати свідчать про дизрегуляцію периферичного молекулярного циркадіанного годинника у букальному епітелії пацієнтів з САР. Застосування протокольного лікування у дітей із САР у вечірній час продемонстрував краще відновлення експресії позитивної та негативної регуляторної ланки молекулярного циркадіанного годинника.

**Ключові слова:** алергічний риніт; циркадний ритм; гени годинника; *per1*; *bmal1*; букальний епітелій; лікування.

### Вступ

Аналіз робіт, які висвітлюють алергічний риніт, вказує на те, що дана алергопатологія має велике значення як для алергологів, отоларингологів так і для лікарів загальної практики – педіатричного й терапевтичного профілю [1-3]. Перш за все, це пояснюється поширеністю захворювання, високою коморбідністю з бронхіальною астмою й алергічним кон'юнктивітом, економічними затратами, негативним впливом на якість життя хворих та низькою ефективністю симптоматичної терапії для певної частки пацієнтів [4].

Циркадні ритми – це внутрішні біологічні ритми, які мають період тривалістю близько 24 годин і від-

повідають 24-годинному циклу зміни світла і температури на Землі. Одним з механізмів, що лежить в основі циркадних ритмів, є молекулярний годинник [5]. Молекулярний годинник – це система генетичних і біохімічних процесів, які регулюють циркадні ритми в клітинах організму [6]. Один з найважливіших компонентів молекулярного годинника – це набір генів, відомий як гени циркадних ритмів або гени періодичності, які виробляють спеціальні білки, котрі накопичуються або руйнуються в клітині протягом 24-годинного циклу й в кінцевому рахунку контролюють широкий спектр циркадіанних ритмів. Основними компонентами годинника є гени *Bmal1*

(brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1) і *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput), білки яких утворюють гетеродимерний комплекс *BMAL1/CLOCK*, що стимулює транскрипцію E-box, який в свою чергу, містить гени інших компонентів молекулярного годинника, включаючи *Per1-3* (period circadian protein homolog), *Cry1-2* (cryptochrome circadian clock), *Rev-erb* (orphan nuclear receptor) та *Ror* (retinoic acid-related orphan). Гени *Bmal1/Clock* утворюють позитивний ланцюг зворотного зв'язку, а *Per/Cry* за рахунок відповідних білків пригнічують власну експресію та створюють негативний зворотній зв'язок подавляючи активність *CLOCK/BMAL1*. Цей механізм негативного зворотного зв'язку разом із додатковими посттрансляційними модифікаціями саме й контролюють циркадні ритми [7].

Циркадні ритми, керовані молекулярним годинником, регулюють широкий спектр фізіологічних процесів у людей і інших організмів, включаючи сон, пробудження, температуру тіла, активність мозку, апетит, гормональний баланс й функцію органів і систем, а також інші важливі аспекти фізіології [8]. Деякі дослідження показують, що порушення циркадних ритмів можуть мати негативний вплив на здоров'я та призводити до розладів сну, настрою, імунної системи, метаболічних та інших хронічних захворювань [9-13].

Зв'язок між циркадним годинником й алергічним ринітом ще не повністю зрозумілий і вивчається науковцями, але відомо, що циркадний годинник є потужним регулятором алергічних реакцій [14-16]. Проте, існує деяка експериментальна евіденція, що підтримує взаємозв'язок між цими двома поняттями. Деякі дослідження показують, що імунологічна відповідь може варіюватись залежно від часу доби [17]. Це може пояснювати той факт, що деякі пацієнти з сезонним алергічним ринітом (САР) спостерігають погіршення симптомів в певний час доби, наприклад, вранці або вночі [18].

Дослідження ролі молекулярного годинника та його впливу на фізіологічні та патологічні процеси в організмі наразі є активним напрямком наукових досліджень, й має значний потенціал для розуміння біологічних процесів та розробки нових підходів до терапії різних захворювань, адже циркадні ритми також впливають на ефективність терапевтичних засобів і вакцин [19, 20]. Наукові праці демонструють, що експресія циркадних генів може впливати на ефективність лікування різних захворювань, включаючи алергічний риніт [21]. Оскільки циркадні ритми впливають на функціонування імунної системи та запалення, розуміння взаємозв'язку між циркадним молекулярним годинником та алергічними реакціями може мати практичне значення для підбору оптимального лікування. Наприклад, деякі дослідження показали, що врахування циркадних ритмів при призначенні лікарських препаратів може підвищити їх ефективність, особливо впливає час введення, відомий як хронотерапія [22]. Крім того, визначення оптимального часу прийому антигістамінних препаратів або назальних глюкокорти-

костероїдів може поліпшити контроль над симптомами алергічного риніту [23-24].

**Метою** нашої роботи була оцінка ступеня експресії мРНК генів *bmal1* та *per1* циркадального молекулярного годинника в клітинах букального епітелію та вивчення ефективності протокольного лікування у дітей із сезонним алергічним ринітом в залежності від часу доби застосування терапії.

### Матеріал та методи дослідження

До проспективного когортного дослідження було включено 20 пацієнтів віком від 6 до 17 років з верифікованим діагнозом сезонний алергічний риніт, які звернулися до Центру спеціалізованої педіатричної допомоги «Полтавська обласна клінічна лікарня імені М. В. Скліфосовського Полтавської Обласної Ради» протягом 2022 року. Серед них було 8 (40 %) дівчаток та 12 (60 %) – хлопчиків. Середній вік хворих на САР склав  $11,75 \pm 3,37$  років. У всіх обстежених дітей відмічалися симптоми алергічного риніту та у половини (50 %) хворих алергічного кон'юнктивіту. Основними критеріями включення хворих до дослідження були: період загострення захворювання, симптоми які спостерігаються не менше 4 днів на тиждень та впродовж не менше ніж 4 тижнів; вік дітей – 6-17 років. Критеріями виключення були: наявність супутньої бронхіальної астми та інших захворювань верхніх дихальних шляхів. До групи контролю були залучені 7 здорових дітей відповідного віку без будь-яких алергічних та хронічних захворювань в анамнезі.

Всі пацієнти з САР були розподілені на 2 групи. До 1-ї групи (n=10) увійшли пацієнти, які приймали терапію протягом 4 тижнів зранку. Пацієнти 2-ї групи (n=10) отримували лікування ввечері. Дослідження включало скринінговий візит і візит через 2 та 4 тижні. Вираженість симптомів алергічного риніту оцінювали за стандартною 4-бальною шкалою з використанням TNSS (Total Nasal Symptom Score). Лікування хворим призначалося відповідно до алгоритму рекомендованим ARIA (Bousquet J, et al. 2020) та вітчизняного уніфікованого протоколу «Алергічний риніт» (2016). За даними візуальної аналогової шкали, при першому візиті, всі пацієнти з САР мали >5 балів, тому призначався інтраназальний кортикостероїд (ІНКС) або ІНКС + азеластин інтраназально.

Експресію генів циркадного молекулярного годинника досліджували біозразках букального епітелію ротової порожнини дітей у ранковий (о 8:00) та вечірній (о 20:00), крім того хворим на САР проводили забір букального епітелію через 1 місяць після проведеного лікування. Зібраний матеріал негайно поміщали до пробірки Eppendorf із РНК стабілізуючим розчином (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Стабілізовані зразки зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальших досліджень.

Рівень експресії мРНК генів *bmal1* та *per1* у зразках букального епітелію визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР РЧ). Загальну РНК виділяли з біологічного зразка за допо-

могою набору реагентів для виділення й очищення РНК (GeneJET RNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для отримання комплементарної ДНК (кДНК) використовували набір реагентів для синтезу кДНК (LunaScript™ RT SuperMix, New England Biolabs, Inc.).

ПЛР-ПЧ проводили на «CFX96™ Real-Time PCR Detection System» («BioRad», США) за використання суміші для кількісної ПЛР із референсним барвником (Luna® Universal Master Mix, New England Biolabs, Inc.). ПЛР проводили за наступних умов: перший цикл початкової денатурації 95 °C – 60 сек, наступні 45 циклів: 95 °C – 15 сек, 60 °C – 30 сек.

Послідовність праймерів для визначення експресії генів:

– hPER1

прямий: 5' – AGGTGAGAGTAGCGGAGAG – 3';

зворотній: 5' – AGGGAGAGGGCAGGTTAG – 3.

– hBMAL1

прямий: 5' – TCAGTGATTTTCATGTCCCCG – 3';

зворотній: 5' – CATTTGTGCTCCCCAAATTCG – 3'.

В якості референтного гену використовували ген hGAPDH, послідовність праймерів для його визначення [25]:

прямий: 5' – CCACATCGCTCAGACACCAT – 3';

зворотній: 5' – AGTTAACAGCCCTGGTGA – 3'.

Для аналізу даних застосовували відносний дельта Ct метод. Розрахунок проводили за формулою  $2^{-\Delta Ct}$ .

Статистичний аналіз проводився за допомогою комп'ютерної програми GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). В залежності від нормальності розподілу ряду даних були застосовані параметричні та непараметричні статистичні методи. Для визначення статистичної достовірності в середині групи при правильному розподілі використовували t-критерій Ст'юдента, при неправильному – U критерій Манна-Уїтні. З метою обчислення динамічних змін одержаних результатів до та після лікування використовували методи обчислення для спарених даних. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

Дизайн дослідження був обговорений та схвалений на засіданні медико-етичної комісії Української медичної стоматологічної академії, протокол № 188 від 25.11.2020 р., де було видано дозвіл на проведення медико-біологічних досліджень. Також отримано добровільну письмову інформовану згоду від усіх батьків обстежених дітей на участь в науковому дослідженні, яке проводилося із дозволу комісії біоетики.

Дослідження проведено відповідно до плану науково-дослідної роботи кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету «Оптимізація ранньої діагностики, лікування та визначення прогнозу найбільш поширених захворювань дитячого віку», номер державної реєстрації 0122U001876 (2021-2026 роки виконання) та науково-дослідної роботи науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ПДМУ «Розробка методики лікування та профілактики розвитку фіброзу легень шляхом активації PPAR-gamma рецепторів», номер державної реєстрації 0122U201686 (2023-2025 роки виконання).

## Результати дослідження та їх обговорення

Характеристика вираженості вранішньої експресії генів у здорових дітей (табл. 1) продемонструвала статистично вищі рівні *perl* ( $0,780 \pm 0,070$ ) порівняно з показниками *bmal1* ( $0,293 \pm 0,074$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як ввечері рівень останнього ( $0,697 \pm 0,130$ ) навпаки був достовірно вищим за значення *perl* ( $0,370 \pm 0,044$ ;  $p < 0,05$ ). Порівнюючи рівні показників *perl*, в даній групі, можна сказати, що ранкова експресія даного гену ( $0,780 \pm 0,070$ ) була вищою ніж у вечірній час ( $0,370 \pm 0,044$ ;  $p < 0,001$ ), тоді як експресія *bmal1* була більшою о 20:00 ( $0,697 \pm 0,130$  проти  $0,293 \pm 0,074$ ;  $p < 0,05$ ).

Отримані в групі контролю результати дослідження, знаходять підтвердження в інших подібних роботах. Так, нещодавно, вітчизняними науковцями було продемонстровано, що в здорових людей експресія мРНК *perl* у букальному епітелії була вищою вранці, в той час як *bmal1* була більш вираженою у вечірній час незалежно від хронотипу, віку та статі [26]. Аналіз додаткових зарубіжних робіт, наводить дані, що у здорових людей експресія мРНК *perl* в слизовій оболонці ротової порожнини та шкіри має найвищі показники в першій половині дня, з наступним зниженням впродовж доби (Vjarnason G. A., 2001). Отримані нами результати динаміки експресії генів *bmal1* та *perl* серед здорових дітей узгоджуються з результатами інших науковців щодо молекулярних механізмів регуляції тактових циркадних генів, які наводять свідчення про авторегуляторний реверсний цикл зворотного зв'язку, відповідно до якого експресія генів біологічного годинника є ритмічною й перебуває в протилежній фазі відносно один одного (Von Schantz M. 2008). Таким чином, результати, виявлені в нашому дослідженні, також підтверджують референтні значення експресії даних генів у здорових осіб з урахуванням молекулярних циркадних ритмів, що сприяє їх використанню в процесі констатації синхронних процесів (явищ синхронізації) в людському організмі.

За результатами даних, отриманих в ході дослідження, встановлено, що вранці експресія мРНК гена *bmal1* у пацієнтів із САР була достовірно вищою ( $1,036 \pm 0,161$ ) в порівнянні із здоровими дітьми ( $0,293 \pm 0,074$ ;  $p < 0,05$ ). В цей час, рівень показників експресії мРНК гена *perl* в клітинах букального епітелію не мав відмінностей серед обстежених обох груп ( $0,715 \pm 0,140$  проти  $0,780 \pm 0,070$ ;  $p > 0,05$ ). При дослідженні експресії генів у вечірні години з'ясовано, що значення *bmal1* в усіх учасників дослідження продемонстрували подібні рівні експресії ( $0,775 \pm 0,163$  проти  $0,697 \pm 0,130$ ;  $p > 0,05$ ), тоді як рівень мРНК гена *perl* був статистично вищий у хворих з ринітом ( $1,293 \pm 0,186$ ) в порівнянні зі здоровими дітьми ( $0,370 \pm 0,044$ ;  $p < 0,01$ ).

Крім того, при порівнянні показників експресії мРНК гена *perl* у групі дітей з САР в залежності від часу доби, було виявлено більш виражений його рівень у вечірній час ( $1,293 \pm 0,186$ ) в порівнянні з ранковими показниками ( $0,715 \pm 0,140$ ) ( $p < 0,05$ ). Визначено достовірно вищий його рівень ввечері порівняно із значеннями *bmal1* ( $0,775 \pm 0,163$ ;  $p < 0,05$ ).

Таблиця 1

Характеристика рівнів експресії мРНК генів *bmal1* та *per1* в клітинах букального епітелію в обстежених дітей на початок проведення дослідження

Час	Ген	Пацієнти з САР (n=20)	Здорові діти (n=7)	p-показник вірогідності
Ранок (8:00)	<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup> (M+m)	1,036 ± 0,161	0,293 ± 0,074	p<0,05
	<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup> (M+m)	0,715 ± 0,140	0,780 ± 0,070	p>0,05
p-показник вірогідності		p>0,05	p<0,001	
Вечір (20:00)	<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup> (M+m)	0,775 ± 0,163	0,697 ± 0,130	p>0,05
	<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup> (M+m)	1,293 ± 0,186	0,370 ± 0,044	p<0,01
p-показник вірогідності		p<0,05	p<0,05	

Значимих відмінностей експресії мРНК *bmal1* в залежності від часу доби серед хворих не було виявлено (p>0,05). Відповідно до результатів інших досліджень (Reilly D. F. 2007), пік експресії мРНК *bmal1* припадає на середину циркадної ночі, з наступним зниженням його рівнів в послідуючі години, в той час як пік показників *per1* більш виражений в середині циркадного дня незалежно від хронотипу людини. Серед інших подібних праць (Kim H. K. 2018) повідомлялося про функціонування циркадного молекулярного годинника в слизовій оболонці носа людей та щурів. Так, ними було встановлено, що у здорових людей та хворих на алергічний риніт, *per1* та *bmal1* мали асиметричну експресію в слизовій оболонці носу відносно правого та лівого носових ходів. Натомість, в щурів *Per1* продемонстрував стійке підвищення показників, що супроводжувалося протифазними коливаннями з рівнем *Bmal1*. Проте в цьому дослідженні не було виявлено суттєвих відмінностей у рівнях експресії *per1* та *bmal1* між здоровими та хворими на алергічний риніт. Таким чином, порівнюючи добові коливання експресії генів *bmal1* та *per1* в букальному епітелії пацієнтів з САР та здоровими, можна стверджувати, що у хворих дітей виявлено явище десинхронозу, що ймовірно свідчить про зміни молекулярних циркадних ритмів впродовж доби.

Насьогодні, циркадні молекулярні механізми й хронотерапія набули важливого значення серед науковців для кращого розуміння терапевтичної користі медичних засобів серед найбільш поширених хронічних захворювань, які мають взаємозв'язок з добовими циркадними ритмами. Станом на теперішній час, хронофармакологічний підхід до лікування отримує все більшого визнання й особливу увагу до себе привертають кортикостероїди. Так, було проведено кілька хронотерапевтичних досліджень із застосуванням інгаляційних кортикостероїдів при бронхіальній астмі, які продемонстрували, що прийом мометазону фуорату один раз на день у вечірній час виявляється більш ефективним, ніж в ранковий час (Noonan M. et al., 2001). Відомо, що гістамін синтезується вечорі й найбільша

його активність спостерігається у вечірній та нічний час з максимальною концентрацією в сироватці крові з 21:00 до 24:00 години, тому його добовий ритм вказує на необхідність призначення антигістамінних препаратів в другій половині дня або ввечері. Таким чином, проведений аналіз зарубіжних хронотерапевтичних досліджень, які були зосереджені на хронотерапії алергічного риніту (Haue та ін. 2005, Urdaneta E. R. та ін. 2018), свідчать про дискусабельність таких підходів до лікування та створює перспективи для подальших досліджень [27]. Тому, з метою оптимізації підходів до лікування пацієнтів із САР наступним етапом нашої роботи було проведення порівняльної оцінки ефективності протокольної терапії в залежності від часу застосування лікарських засобів з урахуванням вираженості експресії генів молекулярного циркадианного годинника.

Згідно отриманих результатів експресії генів периферичного молекулярного годинника у букальному епітелії хворих із САР, які приймали протокольне лікування зранку (табл. 2), було встановлено, що в ранковий час експресія гену позитивної регуляторної ланки *bmal1* після проведеного лікування була статистично менш значимою (0,420 ± 0,898) ніж до лікування (0,974 ± 0,263) (p<0,05), тоді як рівень експресії негативної регуляторної ланки *per1* не мав істотних відмінностей в даній групі як до, так і після лікування (p>0,05). Варто зазначити, що після лікування рівень *per1* вранці (0,911 ± 0,815) статистично значимо перевищував показники *bmal1* (0,420 ± 0,898; p<0,05), що може свідчити про відновлення регуляції молекулярних циркадианних механізмів. Крім того, в даній групі не було виявлено ритмічності експресії мРНК *bmal1* у вечірній час між результатами до та після лікування, тоді як показник *per1* ввечері мав достовірно менші показники після лікування (0,650 ± 0,140 проти 1,588 ± 0,247; p<0,05), що також в черговий раз підтверджує нормалізацію регуляторних молекулярних механізмів негативної ланки у периферичному циркадианному годиннику букального епітелію дітей із САР.

Таблиця 2

Характеристики рівнів експресії мРНК генів *bmal1*, *per1* в клітинах букального епітелію до та після лікування дітей із сезонним алергічним ринітом, які застосовували терапію вранці, (n=10)

Час		Ген	До лікування	Після лікування	р-показник вірогідності
Ранок (8:00)		<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	0,974 ± 0,263	0,420 ± 0,898	p<0,05
		<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	0,984±0,238	0,911 ± 0,815	p>0,05
р-показник вірогідності			p>0,05	p<0,05	
Вечір (20:00)		<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	0,652 ± 0,196	0,538 ± 0,140	p>0,05
		<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	1,588 ± 0,247	0,650 ± 0,140	p<0,05
р-показник вірогідності			p<0,05	p>0,05	

В таблиці 3 наведені показники експресії мРНК генів *bmal1* та *per1* у слизовій оболонці ротової порожнини пацієнтів з сезонним алергічним ринітом до та після лікування, що отримували терапію у вечірній час. Так, вечірня вираженість експресії мРНК гена позитивної регуляторної одиниці *bmal1* була статистично більш значимою за ранкову (0,864 ± 0,123 проти 0,433 ± 0,123; p<0,05). Аналіз вранішніх значень даного показника після проведеного лікування продемонстрував статистично менш значимі рівні у порівнянні з початковими даними (0,433 ± 0,123 проти 1,100 ± 0,199; p<0,05), що свідчить про нормалізацію

позитивного ланцюга периферичного циркадіанного годинника.

Під час аналізу даних експресії мРНК гену негативної регуляторної ланки *per1* встановлено, що після лікування достовірне його підвищення спостерігалось у ранковий час (0,900 ± 0,191 проти 0,446 ± 0,104; p<0,05) й відповідно зниження рівня його експресії в 1,6 рази ввечері порівняно з ранковим значенням. Отримані результати дозволяють допустити вірогідність відновлення регуляторної циклічності молекулярного осцилятора транскрипційного циклу зворотного зв'язку тактових генів, хоча показники і не мали статистичної значимості (p>0,05).

Таблиця 3

Характеристики рівнів експресії мРНК генів *bmal1*, *per1* в клітинах букального епітелію до та після лікування у дітей з сезонним алергічним ринітом, які застосовували терапію ввечері, (n=10)

Час		Ген	До лікування	Після лікування	р-показник вірогідності
Ранок (8:00)		<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	1,100 ± 0,199	0,433 ± 0,123	p<0,05
		<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	0,446 ± 0,104	0,900 ± 0,191	p<0,05
р-показник вірогідності			p<0,01	p>0,05	
Вечір (20:00)		<i>bmal1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	0,900 ± 0,266	0,864 ± 0,123	p>0,05
		<i>per1</i> , 2 <sup>-ΔCt</sup>	1,100 ± 0,255	0,561 ± 0,130	p>0,05
р-показник вірогідності			p>0,05	p>0,05	

Таким чином, отримані результати дослідження свідчать про помітне налагодження регуляторних механізмів як негативного так і позитивного ланцюга периферичного циркадіанного годинника у букальному епітелії дітей з САР, що приймали лікування у вечірній час.

Проведене дослідження має певні обмеження – невеликий розмір вибірки обстежених дітей. Також не

були враховані такі критерії як забезпечення комфортних умов сну, дотримання режиму сну, обмеження перед сном фізичної, розумової праці й об'єму спожитої їжі та використання гаджетів перед сном. Оскільки зазначені фактори також мають місце у розвитку інсомнії, яка в подальшому впливає не лише на час сну, але й на фізичне та психічне здоров'я дітей, поведінку, настрій та успішність в навчанні, адже цикл сну/неспанья є

класичним прикладом систем циркадних ритмів, підтримка яких залежить від взаємодії між ендogenous ритмами та процесами, що регулюють гомеостаз внутрішнього середовища [28].

### Висновки

Отримані в ході дослідження результати свідчать про дизрегуляцію периферичного молекулярного циркадianного годинника у букальному епітелії пацієнтів з сезонним алергічним ринітом, що відображається у вигляді порушення експресії мРНК генів *bmal1* у ранковий час та *per1* у вечірній години.

Застосування протокольного лікування у дітей із сезонним алергічним ринітом у вечірній час продемонстрував більш виражене відновлення експресії позитивної та негативної регуляторної ланки молекулярного циркадianного годинника у порівнянні з ранковим прийомом топічних інтраназальних кортикостероїдів та антигістамінних препаратів.

### Література:

1. Bousquet J, Agache I, Berger U, Bergmann KC, Besancenot JP, Bousquet PJ, et al. Differences in Reporting the Ragweed Pollen Season Using Google Trends across 15 Countries. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;176(3-4):181-8. doi: 10.1159/000488391
2. Wang J, Zhou Y, Zhang H, Hu L, Liu J, Wang L, et al. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2023[cited 2023 Nov 3];8(1):138. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01344-4> doi: 10.1038/s41392-023-01344-4
3. Bousquet J, Pfaar O, Agache I, Bedbrook A, Akdis CA, Canonica GW, et al. ARIA-EAACI care pathways for allergen immunotherapy in respiratory allergy. *Clin Transl Allergy* [Internet]. 2021[cited 2023 Nov 3];11(4): e12014. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ct2.12014> doi: 10.1002/ct2.12014
4. Dierick BJH, van der Molen T, Flokstra-de Blok BMJ, Muraro A, Postma MJ, Kocks JWH, et al. Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2020;20(5):437-53. doi: 10.1080/14737167.2020.1819793
5. Lee Y, Wisor JP. Multi-Modal Regulation of Circadian Physiology by Interactive Features of Biological Clocks. *Biology (Basel)* [Internet]. 2021[cited 2023 Nov 3];11(1):21. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/1/21> doi: 10.3390/biology11010021
6. Meléndez-Fernández OH, Liu JA, Nelson RJ. Circadian Rhythms Disrupted by Light at Night and Mistimed Food Intake Alter Hormonal Rhythms and Metabolism. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023[cited 2023 Nov 3];24(4):3392. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3392> doi: 10.3390/ijms24043392
7. He QY, Dai N, Mao M, Ma J, Wen Q, Song DD, et al. Insomnia and circadian rhythm: a bibliometrics study and visualization analysis via CiteSpace. *Front Neurol* [Internet]. 2023[cited 2023 Nov 3];14:1184302. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2023.1184302/full> doi: 10.3389/fneur.2023.1184302
8. Mentzelou M, Papadopoulou SK, Papandreou D, Spanoudaki M, Dakanalis A, Vasios GK, et al. Evaluating the Relationship between Circadian Rhythms and Sleep, Metabolic and Cardiovascular Disorders: Current Clinical Evidence in Human Studies. *Metabolites* [Internet]. 2023[cited 2023 Nov 3];13(3):370. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/13/3/370> doi: 10.3390/metabo13030370
9. Ємченко Я, Ішейкін К, Кайдашев І, Безега О, Гайдучок І. Дослідження взаємозв'язку циркадного ритму з тяжкістю псоріазу та ожиріння. *Acta Medica Leopoliensia*. 2021;27(1-2):22-9. doi: 10.25040/aml2021.01-02.022
10. Lokes K, Lychman V, Izmailova O, Shlykova O, Avetikov D, Kaidashev I. Expression of peripheral core molecular clock genes in oral mucosa depends on the chronotype in patients with maxillofacial cellulitis. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2023;13(5):517-21. doi: 10.1016/j.jobcr.2023.06.001
11. Shkodina AD, Tan SC, Hasan MM, Abdelgawad M, Chopra H, Bilal M et al. Roles of clock genes in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2022[cited 2023 Nov 3];74:101554. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568163721003019?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.arr.2021.101554
12. Huang H, Mehta A, Kalmanovich J, Anand A, Bejarano MC, Garg T, et al. Immunological and inflammatory effects of infectious diseases in circadian rhythm disruption and future therapeutic directions. *Mol Biol Rep*. 2023;50(4):3739-53. doi: 10.1007/s11033-023-08276-w
13. Boiko DI, Skrypnikov AM, Shkodina AD, Hasan MM, Ashraf GM, Rahman MH. Circadian rhythm disorder and anxiety as mental health complications in post-COVID-19. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(19):28062-9. doi: 10.1007/s11356-021-18384-4
14. Nakao A. Clockwork allergy: How the circadian clock underpins allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(4):1021-31. doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.007
15. Cheng FL, An YF, Xue JM, Wang YJ, Ding XW, Zhang YT, et al. Circadian rhythm disruption exacerbates Th2-like immune response in murine allergic airway inflammation. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2022;12(5):757-70. doi: 10.1002/alr.22914
16. Tran NQV, Le MK, Nguyen TA, Kondo T, Nakao A. Association of Circadian Clock Gene Expression with Pediatric/Adolescent Asthma and Its Comorbidities. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023[cited 2023 Nov 3];24(8):7477. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/8/7477> doi: 10.3390/ijms24087477
17. Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 2015;146(3):349-58. doi: 10.1111/imm.12525

### Перспективи подальших досліджень.

Продемонстровані результати досліджень, що ґрунтуються на урахуванні часу доби, як ключової біологічної змінної під час лікування хворих із сезонним алергічним ринітом, наглядно розширюють перспективи проведення подальших досліджень на більшій популяції пацієнтів. Продовження наукових досліджень у даному напрямку з більшою вибіркою пацієнтів з урахуванням усіх критеріїв комфортних умов сну дозволять підвищити ефективність протокольного лікування педіатричних пацієнтів та обґрунтують перспективи формування нових раціонально-потенційних підходів сучасного менеджменту алергічних захворювань в рамках розвитку персоналізованої медицини.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Фінансування:** самофінансування.

18. Wang C, Lutes LK, Barnoud C, Scheiermann C. The circadian immune system. *Sci Immunol* [Internet]. 2022[cited 2023 Nov 3];7(72): eabm2465. Available from: <https://www.science.org/doi/reader/10.1126/sciimmunol.abm2465> doi: 10.1126/sciimmunol.abm2465
19. Vandenberghe A, Lefranc M, Furlan A. An Overview of the Circadian Clock in the Frame of Chronotherapy: From Bench to Bedside. *Pharmaceutics* [Internet]. 2022[cited 2023 Nov 3];14(7):1424. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/7/1424> doi: 10.3390/pharmaceutics14071424
20. Otasowie CO, Tanner R, Ray D, Austyn JM, Coventry BJ. Chronovaccination: Harnessing circadian rhythms to optimize immunisation strategies. *Front Immunol* [Internet]. 2022[cited 2023 Nov 3];13:977525. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.977525/full> doi: 10.3389/fimmu.2022.977525
21. Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N. Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery. *Pharmacol Ther.* 2019;202:72-90. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.018
22. Ayyar VS, Sukumaran S. Circadian rhythms: influence on physiology, pharmacology, and therapeutic interventions. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2021;48(3):321-38. doi: 10.1007/s10928-021-09751-2
23. Shimba A, Ikuta K. Glucocorticoids Regulate Circadian Rhythm of Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2020[cited 2023 Nov 3];11:2143. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.02143/full> doi: 10.3389/fimmu.2020.02143
24. Olejniczak I, Oster H, Ray DW. Glucocorticoid circadian rhythms in immune function. *Semin Immunopathol.* 2022;44(2):153-63. doi: 10.1007/s00281-021-00889-2
25. Kim HK, Kim HJ, Kim JH, Kim TH, Lee SH. Asymmetric expression level of clock genes in left vs. right nasal mucosa in humans with and without allergies and in rats: Circadian characteristics and possible contribution to nasal cycle. *PLoS One* [Internet]. 2018[cited 2023 Nov 3];13(3): e0194018. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194018> doi: 10.1371/journal.pone.0194018
26. Vasko M, Marchenko I, Shundryk M, Shlykova O, Tkachenko I, Kaidashev I. Influence of age, gender characteristics, chronotype on the expression of core clock genes *Per1*, *Clock*, *Bmal1* and *Cry1* in buccal epithelium. *Acta Biochim Pol.* 2022;69(4):883-8. doi: 10.18388/abp.2020\_6408
27. Fedchenko T, Izmailova O, Shynkevych V, Shlykova O, Kaidashev I. PPAR- $\gamma$  Agonist Pioglitazone Restored Mouse Liver mRNA Expression of Clock Genes and Inflammation-Related Genes Disrupted by Reversed Feeding. *PPAR Res* [Internet]. 2022[cited 2023 Nov 3];2022:7537210. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2022/7537210/> doi: 10.1155/2022/7537210
28. Meyer N, Harvey AG, Lockley SW, Dijk DJ. Circadian rhythms and disorders of the timing of sleep. *Lancet.* 2022;400(10357):1061-78. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00877-7

## STUDY OF THE CIRCADIAN MOLECULAR CLOCK IN PAEDIATRIC PATIENTS WITH SEASONAL ALLERGIC RHINITIS: POTENTIAL APPROACHES TO TREATMENT

*T. O. Kryuchko, V. V. Shcherbak, L. M. Buby, O. V. Izmailova, Olha Ya. Tkachenko*

**Poltava State Medical University  
(Poltava, Ukraine)**

### Summary.

Understanding of the relationship between the circadian molecular clock and allergic diseases continues to be studied and may be of practical importance for further selection of optimal treatment.

**The aim of this study** was to evaluate the degree of mRNA expression of the circadian molecular clock genes *bmal1* and *per1* in buccal epithelial cells and to investigate the efficacy of protocol treatment in children with seasonal allergic rhinitis, taking into account the time dependence.

**Material and methods.** The study included 20 patients aged 6 to 17 years with a confirmed diagnosis of seasonal allergic rhinitis (SAR). The control group included 7 healthy children of the same age with no history of allergic or chronic diseases. All patients with SAR were divided into 2 groups of 10 patients each, who received the protocol therapy in the morning (group 1) and in the evening (group 2) for 4 weeks. The expression of circadian molecular clock genes was studied by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method by sampling the buccal epithelium of the children's oral cavity in the morning (8:00 am) and in the evening (8:00 pm), with a repeat examination of the samples 1 month after treatment.

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.00 computer program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

The research design was discussed and approved at the meeting of the medical and ethical commission of the Ukrainian Medical and Stomatological Academy, protocol No. 188 dated 11/25/2020, where permission to conduct medical and biological research was issued.

The research design was discussed and approved at the meeting of the Medical and Ethical Committee of the Ukrainian Academy of Medicine and Dentistry, Protocol No. 188 dated 25.11.2000, where permission to conduct medical and biological research was granted.

The study was conducted in accordance with the research plan of the Pediatrics Department no. 2 of Poltava State Medical University «Optimization of early diagnosis, treatment and prognosis of the most common childhood diseases», state registration number 0122U001876 (years of implementation 2021-2026) and research work – Research Institute of genetic and immunological bases of development of pathology and pharmacogenetics of PDMU «Development of methods of treatment and prevention of development of pulmonary fibrosis by activation of PPAR-gamma receptors», state registration number 0122U201686 (years of implementation 2023-2025).

**Results.** Morning gene expression in healthy children showed statistically higher levels of *per1* ( $0.780 \pm 0.070$ ) compared to *bmal1* ( $0.293 \pm 0.074$ ;  $p < 0.001$ ), whereas in the evening the level of the latter ( $0.697 \pm 0.130$ ) was significantly higher than *per1* ( $0.370 \pm 0.044$ ;  $p < 0.05$ ). Comparing the levels of *per1* in this group, the expression of this gene was higher in the morning ( $0.780 \pm 0.070$ ) than in the evening ( $0.370 \pm 0.044$ ;  $p < 0.001$ ), while the expression of *bmal1* was higher at 20:00 ( $0.697 \pm 0.130$  vs.  $0.293 \pm 0.074$ ;  $p < 0.05$ ). In contrast, patients with SAR had a significantly higher level of *bmal1* gene mRNA expression ( $1.036 \pm 0.161$  vs.  $0.293 \pm 0.074$  in healthy children ( $p < 0.05$ ). Examination of gene expression in children with SAR in the evening revealed that *bmal1* values showed similar levels

of expression in all participants ( $0.775 \pm 0.163$  vs.  $0.697 \pm 0.130$ ;  $p > 0.05$ ), while the mRNA level of the *per1* gene was statistically higher in patients with rhinitis ( $1.293 \pm 0.186$ ;  $p < 0.01$ ).

**Conclusions.** The results obtained indicate a dysregulation of the peripheral molecular circadian clock in the buccal epithelium of patients with SAR. The use of the protocol treatment in children with SAR in the evening demonstrated a better restoration of the expression of the positive and negative regulatory link of the molecular circadian clock.

**Key words:** Allergic Rhinitis; Circadian Rhythm; Clock Genes; *per1*; *bmal1*; Buccal Epithelium; Treatment.

**Контактна інформація:**

**Крючко Тетяна Олександрівна** – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна)

**e-mail:** drkryuchko@gmail.com

**Researcher ID:** <https://orcid.org/0000-0002-5034-4181>

**Researcher ID:** <https://www.webofscience.com/wos/author/record/W-4506-2017>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57194855000>

**Щербак Вікторія Валеріївна** – асистент кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна)

**e-mail:** v.shcherbak@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-9268-6454>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=5722112013>

**Бубир Людмила Миколаївна** – PhD, асистент кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна)

**e-mail:** l.bubyr@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0001-9736-3593>

**Researcher ID:** <https://www.webofscience.com/wos/author/record/JEP-4315-2023>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57221124422>

**Ізмайлова Ольга Віталіївна** – старший науковий співробітник інституту в складі закладу вищої освіти Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики, Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

**e-mail:** o.izmailova@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0003-4770-3494>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=58016790800>

**Ткаченко Ольга Ярославівна** – к.м.д.н., доцент кафедри педіатрії № 2 Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна)

**e-mail:** lol.tkachenko@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-9976-6430>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57194855368>

**Contact Information:**

**Tetyana Kryuchko** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pediatrics № 2 of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

**e-mail:** drkryuchko@gmail.com

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-5034-4181>

**Researcher ID:** <https://www.webofscience.com/wos/author/record/W-4506-2017>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57194855000>

**Victoriia Shcherbak** – Assistant Professor of Pediatrics Department № 2 of Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

**e-mail:** v.shcherbak@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-9268-6454>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=5722112013>

**Liudmila Bubyr** – PhD, Assistant Professor of the Department of Pediatrics № 2 of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

**e-mail:** l.bubyr@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0001-9736-3593>

**Researcher ID:** <https://www.webofscience.com/wos/author/record/JEP-4315-2023>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57221124422>

**Olga Izmailova** – Senior Researcher of Scientific Research Institute of Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetic, Poltava State Medical University, Poltava (Ukraine (Poltava, Ukraine))

**e-mail:** o.izmailova@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0003-4770-3494>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=58016790800>

**Olha Tkachenko** – Candidate of Medical Science, Associate Professor of the Department of Pediatrics № 2 of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

**e-mail:** lol.tkachenko@pdmu.edu.ua

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-9976-6430>

**Scopus Author ID:** <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57194855368>

Надійшло до редакції 23.05.2023 р.

Підписано до друку 15.08.2023 р.

