

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

BERNADETA KAMINSKAITĖ

**MiRNR raiškos tyrimai pažengusios formos cukriniu diabetu sergančių ligonių
leukocituose**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovė
Doc. dr. Kristina Daniūnaitė

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	3
SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Cukrinis diabetas ir jo klasifikacija	8
1.2. I tipo cukrinio diabeto rizikos veiksniai ir patogenezė	9
1.3. II tipo cukrinio diabeto rizikos veiksniai ir patogenezė	12
1.4. Diabeto diagnozavimas ir simptominis gydymas.....	13
1.5. Oksidacinio streso vaidmuo cukrinio diabeto patogenezėje	15
1.6. Cukrinio diabeto komplikacijos	19
1.6.1. Inkstų patologijos	20
1.6.2. Širdies ir kraujagyslių patologijos.....	21
1.6.3. Periferinių nervų patologijos	21
1.6.4. Akių patologijos	22
1.7. MiRNR kaip cukrinio diabeto biožymenys.....	23
1.7.1. MiRNR biogenezė ir funkcija	23
1.7.2. MiRNR raiškos pokyčiai sergant cukriniu diabetu	25
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	28
2.1. Naudotos medžiagos ir įranga	28
2.2. Ligoniai ir mėginiai	29
2.3. RNR skyrimas	31
2.4. Komplementarios DNR sintezė.....	31
2.5. MiRNR raiškos tyrimas kiekybinės PGR metodu.....	33
2.6. Statistinė analizė.....	34
3. REZULTATAI	35
3.1. MiRNR raiškos skirtumai cukriniu diabetu sergančių ir sveikų asmenų leukocituose	35
3.2. MiRNR raiška I tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų leukocituose	36
3.2.1. MiRNR raiškos sąsajos su ligonių rodikliais	36
3.2.2. MiRNR raiškos sąsajos su glikemijos kontrole.....	39
3.2.3. MiRNR raiškos sąsajos su ligos komplikacijomis	40
3.3. MiRNR raiška II tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų leukocituose.....	46
3.3.1. MiRNR raiškos sąsajos su ligonių rodikliais	46
3.3.2. MiRNR raiškos sąsajos su glikemijos kontrole.....	48
3.3.3. MiRNR raiškos sąsajos su ligos komplikacijomis	49
3.4. MiRNR raiškos sąsajos su gydymu α -lipoine rūgštimi.....	55
4. REZULTATŲ APTARIMAS	59
ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS.....	66
PADĖKA.....	67
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	68
PRIEDAI	89

SANTRUMPOS

- 4NQO – 4-nitrochinolino 1-oksidas
AGE – galutiniai glikacijos produktai (angl. *Advanced glycation end products*)
ALA – α -lipoinė rūgštis (angl. *α -lipoic acid*, ALA)
APC – antigeną pateikiančios ląstelės (angl. *Antigen-presenting cell*)
ASP – ambulatoriškai sveiki pacientai
AŠN – autonominė širdies neuropatija
AT – atvirkštinė transkripcija
CD – cukrinis diabetas
CD1 – pirmo tipo cukrinis diabetas
CD2 – antro tipo cukrinis diabetas
DTL – didelio tankio lipoproteinai
FFA – laisvosios riebalų rūgštys (angl. *Free fatty acids*)
GFG – glomerulų filtracijos greitis
GSH – glutationas
HbA1c – glikozilintas hemoglobinas
HLA – žmogaus leukocitų antigenai (angl. *Human leukocyte antigens*)
IR – atsparumas insulinui (angl. *Insulin resistance*)
IRS – insulino receptoriaus substratas
kDNR – komplementari DNR
KMI – kūno masės indeksas
kPGR – kiekybinė PGR (polimerazės grandininė reakcija)
LIL – lėtinė inkstų liga
MHC – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (angl. *Major histocompatibility complex*)
miRNR – mikroRNR
MTL – mažo tankio lipoproteinai
OS – oksidacinis stresas
PAH – pirminė arterinė hipertenzija
Post-ALA – po gydymo α -lipoine rūgštimi
Pre-ALA – prieš gydymą α -lipoine rūgštimi
ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *Reactive oxygen species*)
ŠKL – širdies ir kraujagyslių ligos
ŠN – širdies nepakankamumas
TNF- α – naviko nekrozės faktorius α

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Bernadeta Kaminskaitė

MiRNR raiškos tyrimai pažengusios formos cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Cukrinis diabetas (CD) yra sudėtinga medžiagų apykaitos liga, kuri pasireiškia lėtine hiperglikemija. CD patogenezė yra glaudžiai susijusi su oksidaciniu stresu (OS), o tai savo ruožtu padidina įvairių komplikacijų riziką. Gebėjimas kuo anksčiau prognozuoti konkrečių komplikacijų išsivystymą leistų užkirsti kelią jų atsiradimui, todėl yra ieškoma epigenetinių CD biožymenų.

Kiekybinės PGR metodu buvo tiriama miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 raiška I tipo (CD1, N = 40), II tipo (CD2, N = 38) ir ambulatoriškai sveikų pacientų (ASP, N = 21) leukocituose, veiktuose 4-nitrochinolino 1-oksidu (4NQO). Gauti duomenys susieti su ligonių rodikliais ir komplikacijų pasireiškimu. Papildomų 10-ies miRNR (miR-27a, miR-29a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR-195, miR-210, miR-222 ir miR-499a) raiškos pokyčiai buvo įvertinti 11-os ligonių mėginiuose prieš ir po gydymo antioksidantu – α -lipoine rūgštimi (ALA).

MiR-106a raiška CD2 grupėje buvo mažesnė nei ASP ($p = 0,0287$), o kitų miRNR nesiskyrė (visi $p > 0,0500$). CD1 atveju miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 raiškos skirtumai buvo susiję su inkstų ir / ar širdies ir kraujagyslių ligomis, o poveikis 4NQO indukavo miR-223 raiškos sumažėjimą esant nefropatijai ar kitoms patologijoms (visi $p < 0,0500$). CD2 grupėje miR-16, miR-17 ir miR-106a raiškos skirtumai buvo susiję su inkstų ligomis ir pirmine arterine hipertenzija, miR-16 ir miR-17 – su neuropatija, o miR-17 ir miR-106a – su retinopatija (visi $p < 0,0500$). CD2 mėginiuose poveikis 4NQO sukėlė miR-106a raiškos padidėjimą esant lėtinei inkstų ligai ($p = 0,0312$), o miR-223 – esant retinopatijai ($p = 0,0245$). ALA gydytų asmenų grupėje 4NQO neveiktuose leukocituose tirtų miRNR raiškos skirtumų prieš ir po gydymo nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$). Po poveikio 4NQO miR-155 ir miR-210 raiška post-ALA mėginiuose buvo sumažėjusi palyginus su pre-ALA (abu $p < 0,0500$). Nustatytos įvairios tirtų miRNR sąsajos su CD ligonių klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais rodikliais.

Apibendrinant, šio tyrimo rezultatai parodė galimą miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 vaidmenį nuo OS priklausomame CD1 ir CD2 komplikacijų vystymesi. Nustatytoms sąsajoms patvirtinti reikalingi papildomi tyrimai didesnėse nepriklausomose imtyse.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
LIFE SCIENCES CENTER

Bernadeta Kaminskaitė

MiRNA Expression Analysis in Leukocytes of Advanced Diabetes Mellitus Patients
Master thesis

SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is a complex metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia. The pathogenesis of DM is closely related to oxidative stress (OS), which increases the risk of various complications. The ability to predict the development of specific complications as early as possible would prevent their occurrence, which is why epigenetic DM biomarkers are being investigated.

The present study aimed to evaluate the expression of selected miRNAs (miR-16, miR-17, miR-106a, and miR-223) in leukocyte samples obtained from type I (T1DM, N = 40), type II (T2DM, N = 38), and non-diabetic patients (NDP, N = 21) to assess the effect of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO). The obtained data were linked to the indicators of the patients and occurrence of complications. Changes in the expression of additional 10 miRNAs (miR-27a, miR-29a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR-195, miR-210, miR-222, and miR-499a) were evaluated in 11 samples of DM patients before and after treatment with the antioxidant α -lipoic acid (ALA).

The expression of miR-106a was lower in the T2DM group than NDP ($p = 0.0287$), while the others miRNAs expression did not differ (all $p > 0.0500$). In T1DM, differences in the expression of miR-16, miR-17, miR-106a and miR-223 were associated with renal and/or cardiovascular diseases, and 4NQO treatment induced a decrease in miR-223 expression in nephropathy or other pathologies (all $p < 0.0500$). In the T2DM group, miR-16, miR-17 and miR-106a expression differences were associated with kidney disease and primary arterial hypertension, miR-16 and miR-17 with neuropathy, and miR-17 and miR-106a with retinopathy (all $p < 0.0500$). In T2DM samples, 4NQO treatment induced an increase in the expression of miR-106a in chronic kidney disease ($p = 0.0312$) and miR-223 in retinopathy ($p = 0.0245$). In the ALA-treated group, after exposure to 4NQO, the expression of miR-155 and miR-210 was decreased in post-ALA samples compared to pre-ALA (both $p < 0.0500$), however no differences were found in the expression of miRNAs tested in 4NQO untreated leukocytes before and after treatment (all $p > 0.0500$).

In conclusion, the results of this study indicate the potential roles of miR-16, miR-17, miR-106a, and miR-223 in OS-dependent development of T1DM and T2DM complications. Additional studies with larger independent samples are required to confirm these associations.

IVADAS

Cukrinis diabetas (CD) yra sudėtinga lėtine medžiagų apykaitos liga, kuriai būdinga hiperglikemija. CD yra didelė visuomenės sveikatos problema, prognozuojama, kad sergančių suaugusiųjų skaičius padidės nuo 537 mln. 2021 m. iki 643 mln. iki 2030 m. (American Diabetes Association, 2021). CD yra pagrindinė suaugusiųjų aklumo, paskutinės stadijos inkstų ligos ir netrauminių apatinių galūnių amputacijų (dėl periferinių nervų ligų) priežastis (Hippisley-Cox & Coupland, 2016). Žmonėms, sergantiems CD, 2–4 kartus didesnė tikimybė susirgti koronarine širdies liga ir insultu, nei nesergantiems.

Labiausiai paplitusios diabeto formos yra I tipo CD (CD1) ir II tipo CD (CD2). CD1 yra būdingas insulino gaminančių kasos β ląstelių irimas, sukeliant insulino trūkumą. CD2 pasireiškia dėl audinių atsparumo insulinui ir nepakankamos kompensacinės insulino sekrecijos iš kasos β ląstelių. Šių CD tipų patogenezė ir rizikos veiksniai yra skirtingi, tačiau abiem yra būdinga lėtine hiperglikemija. Tyrimai rodo, kad lėtine hiperglikemija skatina reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymą ir sukelia oksidacinį stresą (OS) (Pasupuleti et al., 2020). Sveiko žmogaus organizmas, reaguodamas į padidėjusią ROS gamybą, aktyvuoja įvairius antioksidantinius mechanizmus, kad neutralizuotų OS poveikį. Tačiau žmonėms, sergantiems CD yra sutrikusi antioksidacinė funkcija, o tai gali sukelti OS ir įvairių organų ir audinių pažeidimus, jų disfunkciją ir komplikacijas (periferinių nervų, inkstų, akies tinklainės, širdies ir kt.) (Asmat et al., 2016; Ohiagu et al., 2021). Siekiant sumažinti CD komplikacijų riziką, yra ieškoma įvairių terapinių gydymų skirtų sumažinti OS. Klinikiniuose tyrimuose nustatyta, kad antioksidantas α -lipoinė rūgštis (ALA) yra svarbus mitochondrijų α -ketorūgšties dehidrogenazės komplekso kofaktorius, kuris pašalina laisvuosius radikalus, taip pat veikia kitus antioksidantus, tokius kaip askorbo rūgštis ir vitaminas E ir padidina glutationo kiekį ląstelėse (Diane et al., 2020; Mousavi et al., 2019). Dėl savo antioksidacinių savybių, ALA sulaukė daug dėmesio diabeto komplikacijų gydymui ir dabar yra patvirtinta diabetinės neuropatijos gydyme (Ziegler et al., 2021). Tačiau tyrimai, vertinantys ALA papildų poveikį diabeto simptomų mažinime išlieka prieštaringi (Ebada et al., 2019; Huerta et al., 2015; N. Li et al., 2017; U. Singh & Jialal, 2008).

CD yra pripažįstamas kaip globaliai paplitusi medžiagų apykaitos sutrikimų grupė, todėl yra svarbu išsiaiškinti CD vystymosi molekulinis mechanizmus ir ryšį su OS bei identifikuoti biožymenis, kurie leistų tiksliau prognozuoti ligos eigą bei parinkti efektyviausią gydymą. MikroRNR (miRNA) yra mažos nekoduojančios RNR molekulės, reguliuojančios genų raišką ir atliekančios svarbų vaidmenį įvairiuose ląsteliniuose procesuose, įskaitant tuos, kurie tiesiogiai susiję su diabeto patogenezė. Literatūroje pateikiama duomenų, kad miR-16, miR-17, miR-146a, miR-223, miR-375 dalyvauja CD patogenezėje, reguliuojant uždegimą ir atsparumą insulinui (X.

Fan et al., 2020; Improta-Caria et al., 2022; X. Li, 2014; Roos et al., 2021; Ye et al., 2018). Taip pat, žinoma, kad miR-17, miR-21 ir miR-106a reguliuoja genų, susijusių su OS, raišką (Larrue et al., 2022; Tai et al., 2020; Wei et al., 2020). MiRNR yra laikoma perspektyviais diagnostiniais ir prognostiniais ligos žymenimis, tačiau įvairių tyrimų rezultatai vis dar išlieka prieštaringi dėl nustatomos skirtingos miRNR raiškos tarp imčių dydžių ir tirtų audinių.

Šio **darbo tikslas** buvo įvertinti pasirinktų miRNR raišką pažengusios formos CD sergančių ligonių leukocitų mėginiuose ir susieti su 4NQO poveikiu ir ALA gydymu. Tikslui pasiekti išsikelti šie **uždaviniai**:

1. Ištirti miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 raišką CD1 ir CD2 ligonių ir kontrolinės grupės leukocitų mėginiuose.
2. Įvertinti tirtų miRNR raiškos sąsajas su CD1 ir CD2 ligonių klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais rodikliais.
3. Įvertinti tirtų miRNR raiškos sąsajas su CD1 ir CD2 ligonių komplikacijomis ir susieti su 4NQO poveikiu.
4. Įvertinti gydymo ALA poveikį 14-os pasirinktų miRNR raiškai ir susieti su veikimu 4NQO.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Cukrinis diabetas ir jo klasifikacija

Cukrinis diabetas (CD) yra lėtinis medžiagų apykaitos sutrikimas, kuriam būdinga hiperglikemija, atsirandanti dėl absoliutaus arba santykinio insulino trūkumo. Visi diabeto tipai lemia laipsnišką kasos β ląstelių masės ir / arba funkcijos praradimą, kuris kliniškai pasireiškia kaip hiperglikemija. Tačiau diabeto išsivystymo priežastys tarp CD tipų yra skirtingos: genetinis polinkis, epigenetiniai procesai, aplinkos veiksniai, autoimuninis poveikis, gretutinės ligos, uždegimai (American Diabetes Association, 2021). Hiperglikemija lemia angliavandenių, riebalų ir baltymų apykaitos sutrikimus, kurie paveikia daugelį organų ir sutrikdo normalią jų veiklą. Kai pasireiškia hiperglikemija, ligoniams, sergantiems įvairiomis diabeto formomis, kyla lėtinių komplikacijų rizika (periferinių nervų, inkstų, akies tinklainės, širdies ir kraujagyslių ligos) (Ohiagu et al., 2021; Skyler et al., 2017). Sergančiam asmeniui yra sudėtinga priskirti CD tipą, nes nėra griežtos ribos, tarp skirtingų ligos tipų. Norint pilnai suprasti ir atskirti visų formų diabetus ir išvengti diabeto komplikacijų, labai svarbu suprasti kasos β ląstelių disfunkcijos ir / ar nykimo būdus, kurie gali būti susiję su skirtingu ligos progresavimo greičiu ir skirtinga komplikacijų rizika (Skyler et al., 2017).

Bendrai CD yra skirstomas į monogeninę ir poligeninę formas. Monogeninis diabetas yra skiriamas į tris dideles grupes: jaunų žmonių, sergančių brandos laikotarpiu, diabetas (angl. *Maturity-onset diabetes of young*, MODY), naujagimių diabetas (angl. *Neonatal diabetes mellitus*, NDM) ir sindrominis diabetas. Visais atvejais monogeninį diabetą lemia viena mutacija, kuri gali sukelti kasos β ląstelių funkcijos defektus.

MODY yra genetiškai, metaboliškai ir kliniškai nevienalytė, daugiausia nuo insulino nepriklausoma, diabeto grupė, kuriai būdinga kasos β ląstelių irimas ir sutrikusi insulino biosintezė (H. Zhang et al., 2021). Šis diabeto tipas yra skirstomas į potipius pagal tai, kokiame gene yra įvykusi mutacija, pavyzdžiui, *GCK* koduoja gliukokinazės fermentą, katalizuojantį gliukozės fosforilinimą glikolizės kelio pradžioje. Gliukokinazė yra kasos β ląstelių gliukozės jutiklis; genetiniai defektai pakeičia gliukozės stimuliuojamo insulino sekrecijos slenkstį, todėl sergantiems asmenimis pasireiškia lengva hiperglikemija, kuriai gydymo dažniausiai neprireikia (H. Zhang et al., 2021). *HNF1A* ir *HNF4A* yra svarbūs vystantis kasos β ląstelėms; mutacijos, įvykusios šiuose genuose lemia gliukozės homeostazės ir insulino sekrecijos sutrikimus, dėl to pasireiškia stipri hiperglikemija ir reikalingas gydymas insulinu (Haliyur et al., 2019).

NDM yra sunki monogeninė liga, pasireiškianti per pirmuosius šešis gyvenimo mėnesius. Šio diabeto patogenezė priklauso nuo įvykusių mutacijų genuose, kurie yra svarbūs kasos β ląstelių

vystymuisi bei insulino sintezėje ir sekrecijoje (*KCNJ11, ABCC8, GCK, INS, RFX6, SLC2A2, SLC19A2*; Dahl & Kumar, 2020).

Sindrominis diabetas – diabetas, kuris pasireiškia su kitais simptomais ir suformuoja klinikinį sindromą, dar vadinamą atsparumo insulinui sindromu. Sindrominiam diabetui yra priskiriamas lipoatrofinis diabetas, Volframo sindromas, mitochondrinis diabetas, nuo tiamino priklausoma megaloblastinė anemija ir kt. (Sanyoura et al., 2018).

Poligeninio diabeto formos išsivysto dėl genetinių ir epigenetinių (aplinkos ir gyvenimo būdo) veiksnių. Poligeninio diabeto formai yra priskiriami I tipo ir II tipo CD (CD1 ir CD2) ir nėščiujų (gestacinis) diabetas (ND).

CD1 yra autoimuninis sutrikimas, kuriam būdingas T ląstelių sukeltas kasos β ląstelių irimas, dėl kurio kasa gamina mažai arba visai negamina insulino. CD1 sudaro apie 5–10 % visų CD atvejų (American Diabetes Association, 2021).

CD2 yra nuo insulino nepriklausomas diabetas, tai labiausiai paplitęs CD tipas, kuris sudaro apie 90–95 % visų atvejų ir daugiausia susijęs su nepakankamu atsaku į insuliną (sumažėjęs jautrumas insulinui) ir atsparumu insulinui periferiniuose audiniuose (American Diabetes Association, 2021). Šio tipo diabetui būdingos dvi pagrindinės su insulinu susijusios anomalijos: atsparumas insulinui ir kasos β ląstelių disfunkcija (Banday et al., 2020).

ND yra bet koks gliukozės netoleravimo ar diabeto laipsnis, diagnozuotas nėštumo pradžioje arba nėštumo metu, dažniausiai antrąjį ar trečiąjį trimestrą (American Diabetes Association, 2021). ND metu pasireiškusi silpna hiperglikemija praeina po gimdymo, tačiau ND kelia riziką tiek motinai, tiek kūdikiui. Dėl gliukozės netoleravimo didėja prieššlaikinio gimdymo ir preeklampsijos rizika (Plows et al., 2018). Diagnozavus ND, motinai didėja rizika susirgti CD2, o kūdikiui padidėja nutukimo, CD2 ir hiperlipidemijos rizika paauglystėje ir vėliau (Petry, 2010). Be to, moteriškos lyties palikuonėms yra didesnė rizika susirgti ND jų nėštumo metu (Petry, 2010).

1.2. I tipo cukrinio diabeto rizikos veiksniai ir patogenezė

CD1 atsiranda dėl kasos β ląstelių sunaikinimo, kurį sukelia autoimuniniai procesai, tačiau tiksli etiologija ir patologiniai mechanizmai vis dar nėra pilnai išaiškinti (Anderson, 2023). Yra žinoma, kad šios ligos vystymuisi įtakos turi sudėtingas įvairių veiksnių tinklas, pavyzdžiui, genetinis polinkis (stiprios sąsajos su žmogaus leukocitų antigenais (angl. *Human leukocyte antigens*, HLA), genetinis ryšys su imuninės sistemos genais), imunologiniai (pavyzdžiui, specifiskumas β ląstelėms) ir aplinkos veiksniai (pavyzdžiui, amžius ligos pradžioje) ir žarnyno mikrobiota (Zajec et al., 2022).

Metaanalizių ir viso genomo asociacijos tyrimais (angl. *Genome-wide association study*, GWAS) yra nustatyta daugiau nei 50 lokusų, susijusių CD1 genetinė rizika (Størling & Pociot, 2017). Pagrindiniais genetinės rizikos veiksniais yra laikomi HLA genų, koduojančių DQ ir DR, polimorfizmai. Lokusų, koduojančių šešis klasikinius I (A, B ir C) ir II (DR, DQ ir DP) antigenus, produktai yra struktūriškai homologiški ląstelės paviršiaus receptoriniai baltymai, kurie suriša antigeninius peptidus ir pateikia juos T ląstelėms. DQ ir DR polimorfizmai randami regionuose, koduojančiuose aminorūgščių liekanas, kurios sudaro peptidų surišimo griovelį, todėl skirtingos DQ baltymų izoformos gali prisijungti ir pateikti skirtingus antigenus T ląstelėms (Banday et al., 2020; Noble & Valdes, 2011). Nors įvairiose ligos stadijose dalyvaujantys molekuliniai keliai labai skiriasi, vis daugiau tyrimų rodo, kad kasos β ląstelės turi genetinį polinkį, o rizikai turi įtakos jautrumas proapoptotiniams dirgikliams ir kasos β ląstelių fenotipas (Pang et al., 2020; Scoville & Jetten, 2021; G. H. Yang et al., 2021).

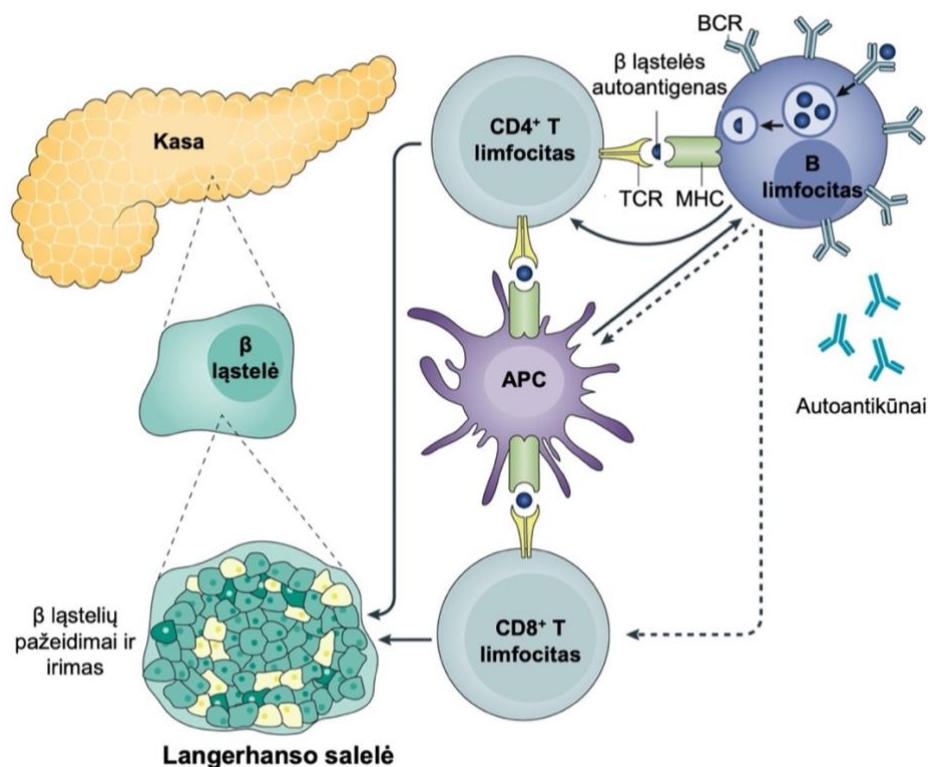
Genetiniai veiksniai yra būtini CD1 vystymuisi, tačiau ir aplinkos veiksniai vaidina svarbų vaidmenį šios ligos patogenezėje: mityba, toksinai ir infekcijos, kurios paveikia vaikus gimdoje, perinataliniu laikotarpiu ir vaikystėje (Paschou et al., 2018). Jei perinataliniame laikotarpyje vaisius paveikiamas raudonukės virusu, vaikas dažniau serga CD1 (Paschou et al., 2018). Nustatyta, kad SARS-CoV-2 užkrečia ir dauginasi žmogaus endokrininėse ir egzokrininėse kasos ląstelėse ir sukelia kasos β ląstelių pažeidimus ir apoptozę (Müller et al., 2021; C. T. Wu et al., 2021). Tačiau reikalingi tolimesni tyrimai, norint išsiaiškinti, ar SARS-CoV-2 sukeltas β ląstelių pažeidimas yra laikinas ar nuolatinis ir ar virusas gali išlikti kasos ląstelėse, sukeldamas lėtinę infekciją.

Mikrobiotos ir mitybos vaidmuo CD1 patogenezėje taip pat kelia didelį susidomėjimą. Ankstyvas karvės pieno įtraukimas į kūdikio mitybą padidina ligos riziką dėl autoimuninės reakcijos, kurią sukelia piene esančio insulino poveikis (Awadalla et al., 2017). Taip pat ankstyvas grūdinių produktų įtraukimas į mitybą, su vandeniu suvartojamų nitratų kiekis, omega-3 riebalų rūgščių ir vitamino D trūkumas siejamas su padidėjusia CD1 išsivystymo rizika (Paschou et al., 2018). Specifinės ir įvairios žarnyno mikrobiotos buvimas yra labai svarbus įgimtos imuninės sistemos vystymuisi, palaikant gleivinės barjerą ir gaminant įvairius metabolitus bei vitaminus. Tyrimai parodė, kad asmenų, sergančių CD1, mikrobiota skiriasi nuo sveikų asmenų. CD1 rizikos veiksniai apima didesnę *Firmicutes* bakterijų tipų kiekį ir didesnę angliavandenių suvartojimą, o *Bifidobacterium* kiekis siejamas su tokiais apsauginiais veiksniais kaip žindymas (Traversi et al., 2020).

CD1 atsiradimą sukelia netinkamas tiek įgimtos, tiek adaptyviosios imuninės sistemos aktyvavimas, kurios metu susidaro signalinių kelių kaskados, kurios naikina kasos Langerhanso saleles. CD1 vystosi palaipsniui ir jo patogenezė yra skirstoma į tris stadijas, kurios progresuoja į β ląstelių irimą, gliukozės kiekio kraujyje disbalansą (disglikemiją) ir galiausiai su hiperglikemija

susijusius simptomus. Pirmai stadijai būdingas autoantikūnų buvimas ir disglukemijos nebuvimas; 2 stadijai būdingas ir autoantikūnų buvimas, ir disglukemija; simptomai pasireiškia tik 3 stadijoje, kuri atitinka simptominių CD1 (Katsarou et al., 2017).

CD1 vystymosi procesas yra susijęs su atsaku į uždegimą (1.1 pav.). B limfocitai išskiria naviko nekrozės faktorių α (angl. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) ir γ interferoną (IFN- γ), kurie skatina azoto monoksido (NO) susidarymą. NO trukdo kasos β ląstelių apoptozei ir antigeną pateikiančių ląstelių (angl. *Antigen-presenting cell*, APC) pritraukimui. APC migruoja į kasos limfmazgius, kur suaktyvina CD4⁺ T limfocitus. Šie skatina makrofagus išskirti citokinus ir reaktyvias deguonies formas (angl. *Reactive oxygen species*, ROS) ir tarpininkauja aktyvuojant autoreaktyvias CD8⁺ T ląsteles. Pastarosios grįžta į Langerhanso saleles ir lizuoja kasos β ląsteles, ekspresuojančias imunogeninius antigenus pagrindinėse audinių suderinamumo komplekso (angl. *Major histocompatibility complex*, MHC) I klasės paviršiaus molekulėse (de Brito Oliveira et al., 2017; DiMeglio et al., 2018).



1.1 pav. I tipo cukrinio diabeto patogenezė.

APC – antigeną pateikiančios ląstelės suaktyvina, TCR – T ląstelių receptorius; BCR – B ląstelių receptorius; MHC – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (Pagal Katsarou et al., 2017).

Apibendrinant, CD1 yra autoimuninis sutrikimas, kuriam būdingas T ląstelių sukeltas kasos β ląstelių irimas, dėl kurio atsiranda insulino trūkumas ir galiausiai hiperglikemija. Šis autoimuninis

kasos ląstelių destrukcijos procesas vyksta genetiškai jautriems asmenims, kurie yra paveikiami vienu ar keliais aplinkos rizikos veiksniais.

1.3. II tipo cukrinio diabeto rizikos veiksniai ir patogenezė

CD2 yra lėtinė metabolinė liga, kuri išsivysto dėl nepakankamos insulino sekrecijos iš kasos β ląstelių, audinių atsparumo insulinui (angl. *Insulin resistance*, IR) ir nepakankamo kompensacinio insulino sekrecijos atsako (Galicia-Garcia et al., 2020). Šios ligos patogenezės mechanizmai žinomi tik iš dalies, nes liga yra nevienalytė; rizikos veiksniai apima sudėtingą genetinių, metabolinių ir aplinkos veiksnių derinį, kurie sąveikauja vienas su kitu ir prisideda prie CD2 vystymosi.

Per pastarąjį dešimtmetį nustatyta daugybė su CD2 rizika susijusių genetinių lokusų. Dauguma jų padidina ligos vystymosi riziką dėl pirminio poveikio insulino sekrecijai, veikiant kasos β ląsteles (pavyzdžiui, *ABCC8*, *KCNJ11* (*KIR6.2*), *SLC2A2* (*GLUT2*), *HNF4A* (*HNF4 α*), *INS* ir kiti). Papildomai nustatyta keletas lokusų, kurie yra susiję su insulino veikimu (pavyzdžiui, *INSR*, *PIK3R1* ir *SOS1*; (Mambiya et al., 2019). Nors individualus polinkis sirgti CD2 dėl nepakeičiamų rizikos veiksnių (šeimos istorijos / genetinio polinkio) yra svarbus, manoma, kad daugelio CD2 atvejų galima išvengti pagerinus gyvenimo būdą.

CD2 patofiziologijoje dalyvaujančių aplinkos ir metabolinių veiksnių sąrašas vis dar nėra baigtinis, pastaraisiais metais į jį įtraukti tokie veiksniai kaip nutukimas, vitaminų trūkumas, mikrobiotos pokyčiai ir t.t. (Kesavadev et al., 2019). Asmenims, sergantiems CD2, dažnai būdingas nutukimas ir didesnis kūno riebalų procentas ($KMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Riebalinis audinys skatina insulino atsparumą per įvairius uždegiminius mechanizmus, įskaitant padidėjusį laisvųjų riebalų rūgščių (angl. *Free fatty acid*, FFA) išsiskyrimą ir adipokinių reguliavimo panaikinimą. Didelė riebalų rūgščių aplinka hiperglikeminėmis sąlygomis gali sumažinti *INS* raišką, o sutrikusi cholesterolio transporterio funkcija sukelia kasos β ląstelių nykimą dėl sterolių kaupimosi ir uždegimo. Prie β ląstelių nepakankamumo prisideda lipoproteinų frakcijos, cholesterolio metabolizmas ir mažo tankio lipoproteinai (MTL). Lipoproteinų frakcijos oksiduojasi ir gali sumažinti insulino raišką izoliuotose kasos β ląstelėse, o MTL gali sukelti kasos β ląstelių apoptozę.

Didėjant riebalų atsargoms ir adipocitų dydžiui, ląstelės mažiau reaguoja į insuliną, nes perteklinė mityba sukelia oksidacinį stresą (OS), dėl kurio yra inaktyvuojamas gliukozės transporteris GLUT4 (Malone ir Hansen, 2019). Be to, riebalų rūgštys gali sustiprinti uždegiminį toksiškumą tiesiogiai aktyvuodamos uždegiminio atsako kelius. Į kraują išsiskiria uždegimą skatinančios molekulės, tokios kaip interleukinai 1 ir 6 (IL-1, IL-6), C reaktyvusis baltymas (angl. *C-reactive protein*, CRP), TNF- α . Pastarasis veikia kaip prieš uždegiminis citokinas, kuris

reguliuoja atsparumą insulinui, skatindamas insulino receptoriaus substrate 1 (IRS-1) esančio serino fosforilinimą ir taip paskirstydamas IRS baltymus (S. Y. Tan et al., 2019). Be to, TNF- α inicijuoja c-Jun N-galinės kinazės (angl. *C-Jun N-terminal kinase*, JNK) ir branduolio faktorius κ B (NF- κ B) signalinius kelius, kurie didina uždegiminių citokinų ir imuninių ląstelių kieki, dėl kurių atsiranda kasos salelių uždegimas ir IR (Zand et al., 2017).

CD2 vystymąsi lemia kompleksinis veiksnių tinklas, kurie turi nevienodą poveikį, todėl diabeto patofiziologija gali skirtis priklausomai nuo individo. Bendrai, ankstyviausias CD2 vystymosi defektas yra IR, kuriam būdingas sumažėjęs gliukozės transportavimas. Todėl sutrinka gliukozės gamybos kepenyse reguliacija ir didėja kasos β ląstelių disfunkcija, galiausiai sukelianti β ląstelių nepakankamumą. Suprasti mechanizmus, susijusius su CD2 vystymusi, yra labai svarbu, kad būtų galima kontroliuoti, gydyti ir išvengti CD2 ir su juo susijusių komplikacijų.

1.4. Diabeto diagnozavimas ir simptominis gydymas

Vadovaujantis Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) rekomendacijomis, CD diagnozuojamas atliekant gliukozės tolerancijos tyrimus, esant CD būdingiems simptomams (dažnas šlapinimasis (poliurija), padidėjęs troškulys (polidipsija) ir noras valgyti (polifagija), staigus svorio kritimas, nuovargis, rankų ir kojų tirpimo ir dilgčiojimo pojūtis) ir bent vienam teigiamam hiperglikemijos rodikliui (1.1 lentelė). Šie testai gali būti naudojami diabeto diagnozavimui bei asmenims, sergantiems prediabetu, nustatyti. Diabetas gali būti nustatytas bet kurioje klinikinių scenarijų spektro dalyje: iš pažiūros mažos rizikos asmenims, kuriems atliekami gliukozės tyrimai, asmenims, kurie tikrinami, remiantis diabeto rizikos vertinimu, ir pacientams, kuriems pasireiškia CD būdingi klinikiniai simptomai. Papildomai, gali būti ištiriamas ketonų kiekis paciento šlapime. Ketonai (acetonas, acetoacto rūgštis, β -hidroksibutiratas) šlapime susidaro, kai energijai yra naudojami riebalai. Todėl jų aptikimas šlapime yra svarbus rodiklis diabeto atveju, nes leidžia spręsti apie metabolinę dekompensaciją.

1.1 lentelė. Hiperglikemijos rodikliai ir slenkstinės ribos.

Hiperglikemijos rodiklis	Gliukozės kiekis veninėje kraujo plazmoje
Alkio glikemija	≥ 7 mmol/l;
2 valandos po 75 g gliukozės testo	$\geq 11,1$ mmol/l;
Hiperglikeminė krizė	$\geq 11,1$ mmol/l
HbA1c reikšmė	$\geq 6,5$ %

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas.

CD1 atveju klinikiniai simptomai ir požymiai pasireiškia staiga, dažniausiai per kelias savaites, o CD2 būdingas ilgas besimptomis laikotarpis, kurio metu liga dažnai lieka nedidžiuojama. Įprastai CD2 diagnozuojamas profilaktinių patikrinimų metu, nustatant padidėjusį gliukozės kiekį veninio kraujo plazmoje. CD1 diagnozė patvirtinama randant tam tikrų antikūnų, pavyzdžiui, glutamo rūgšties dekarboksilazės autoantikūnų (angl. *Glutamic acid decarboxylase autoantibodies*, GADA), salelių ląstelių autoantikūnų (angl. *Islet cell autoantibodies*, ICA) prieš kasos β ląstelių citoplazmos baltymus, autoantikūnų prieš tirozino fosfatazes IA-2 ir IA-2 α , insulino autoantikūnų (angl. *Insulin autoantibodies*, IAA) prieš salelei specifinę cinko transporterio izoformą 8 (angl. *Autoantibodies to islet-specific zinc transporter isoform 8*, ZnT8) (Banday et al., 2020).

Pacientui diagnozavus CD, yra siekiama sustabdyti galimų komplikacijų pasireiškimą ir optimizuoti gyvenimo kokybę. Glikemijos įvertinimui yra atliekamas glikozilinto hemoglobino (HbA1c) tyrimas. HbA1c yra patikimiausias ilgalaikės glikemijos kontrolės rodiklis, nes tiksliai atspindi asmens gliukozės kiekį kraujyje per pastaruosius du ar tris mėnesius (Sherwani et al., 2016). Remiantis HbA1c koncentracijos reikšme yra paskiriamos atitinkamos ligos valdymo priemonės. Remiantis PSO nustatytais kriterijais, glikemijos kontrolė apibrėžiama kaip gera, kai HbA1c reikšmė $<7\%$ ir bloga, kai HbA1c $>8\%$. Be to, siekiant tinkamai valdyti nustatytą CD2, yra rekomenduojama iš karto ištirti ir dėl galimų komplikacijų (inkstų, širdies ir kraujagyslių, periferinių nervų), o CD1 atveju – praėjus 5-iems metams nuo diagnozės nustatymo.

CD simptominis gydymas apima nefarmakologinius ir farmakologinius metodus. Nefarmakologiniai metodai yra pradinis CD2 gydymas, apimantis gyvenimo būdo pokyčius (dieta, fizinio aktyvumo didinimas, svorio mažinimas, diabeto savivaldos mokymai) (Leite et al., 2020). Tyrimai rodo, kad svorio netekimas gali palengvinti CD2 simptomus ir net lemti remisiją. Nustatyta, kad netekus didelio svorio (>15 kg arba $\sim 15\%$ pradinio kūno svorio), daugumai pacientų žymiai sumažėjo gliukozės kiekis kraujyje nevalgius ir HbA1c kiekis (Steven & Taylor, 2015). Toks svorio netekimas, pasiektas ribojant kalorijas, lėmė CD2 remisiją $\sim 80\%$ pacientų, sergančių CD2 ir turinčių nutukimą (Lean et al., 2018). Jeigu gyvenimo būdo pokyčiai nepadedą išlaikyti tikslingo cukraus kiekio kraujyje, gali būti skiriamas farmakologinis gydymas. Rekomenduojama iškart skirti insuliną, kaip dalį kombinuotos terapijos, pacientams, kurių hiperglikemija yra labai aukšta ($>16,7$ mmol/l, HbA1c $>10\%$) ir kuriems yra pasireiškę kataboliniai simptomai (svorio kritimas, hipertrigliceridemija, ketozė). Vėliau, jei nebėra poreikio insulinui, galima pereiti prie peroralinių medikamentų. Dažniausiai CD2 sergantiems asmenims yra skiriamas metforminas, kuris didina jautrumą insulinui ir gliukozės pasisavinimą. Metforminas gali padėti numesti svorio ir mažina trigliceridų ir MTL kiekį serume (Lin et al., 2018). Visa tai lemia gliukozės ir HbA1c kiekio sumažėjimą, tačiau metforminas neturi įtakos kasos β ląstelėms. Dipeptidilpeptidazės-4 (DPP4)

inhibitoriai, kitaip vadinami gliptiniais, yra santykinai naujesnių gydymo priemonių grupė, kuri veikia slopindama fermentą dipeptidilpeptidazę 4 (A. K. Singh et al., 2017). Šio fermento slopinimas inaktyvuoja inkretino hormonus – į gliukagoną panašų peptidą 1 (angl. *Glucagon-like peptide-1 receptor agonist*, GLP-1) ir į nuo gliukozės priklausomą insulino tropinino peptidą (angl. *Gastric inhibitory polypeptide*, GIP), kurie dalyvauja reguliuojant gliukozės homeostazę (A. K. Singh, 2014). CD1 atveju plačiausiai naudojamas simptominis gydymas yra gliukozės koncentracijos kraujyje nuolatinis stebėjimas ir insulino terapija. Dėl prastos diabeto kontrolės daugeliui ligonių prireikia kartu su pakaitine insulino terapija vartoti papildomus vaistus – metforminą arba pramlintidą, kad ilgainiui būtų pasiekta gera glikemijos kontrolė. Metformino vartojimas CD1 sergantiems pacientams gali nežymiai sumažinti trigliceridų, HbA1c kiekį ir padėti mažinti antsvorį (Edelman et al., 2008; Meng et al., 2018).

Dabar naudojami farmakologiniai vaistai padeda slopinti CD progresavimą, tačiau liga nėra išgydoma. Todėl yra ieškoma naujų farmakologinių metodų, kurie būtų nukreipti į signalinius kelius, susijusius su CD vystymusi.

1.5. Oksidacinio streso vaidmuo cukrinio diabeto patogenezėje

Biocheminiai keliai, kuriuos suaktyvina hiperglikemija, yra susiję su ROS susidarymu, galiausiai sukeliančiu oksidacinį stresą (OS). OS yra pagrindinis tarpininkas, sukeliantis diabeto komplikacijas (Pitocco et al., 2013). Dėl didelio reaktyvumo ROS reaguoja su įvairiomis ląstelių sudedamosiomis dalimis, įskaitant DNR, lipidus ir baltymus, ir sukelia ląstelių pažeidimus. Be to, per dideli ROS kiekiai aktyvuoja priešuždegiminius transkripcijos faktorius, NFκB ir AP-1 (angl. *Activator protein 1*), kurie padidina priešuždegiminių citokinų ir adhezijos molekulių raišką (Rendra et al., 2019). Aktyvuotos endotelio ląstelės pritraukia monocitus, kurie dar labiau padidina uždegimą ir skatina makrovaskulinius ir mikrovaskulinius pažeidimus (Pitocco ir kt., 2013).

ROS yra chemiškai aktyvios deguonies turinčios molekulės, kurios yra natūralūs deguonies apykaitos šalutiniai produktai. Pagrindiniai ROS tipai yra superoksidai, hidroperoksido radikalai, singletiniai radikalai, hidroksilo radikalai, azoto oksidai, peroksinitritai ir kt. (Sies & Jones, 2020). ROS daugiausia susidaro mitochondrijose, tačiau juos specialiai gamina fermentai: NADPH oksidazė (NOX), ksantino oksidazė. (Forrester et al., 2018). ROS plačiai dalyvauja tarpląstelinuose signaliniuose keliuose ir ląstelių aktyvumo reguliavimo procesuose: apoptozės indukcijoje, prisitaikyme prie įvairių veiksnių poveikio ir imuniniame atsake (Sies, 2020). Įprastomis sąlygomis ląstelėse esantys antioksidacinės apsaugos mechanizmai užtikrina ROS pašalinimą iš organizmo ir palaiko homeostazę. Tačiau ląstelėms esant hiperglikeminėje būsenoje, ROS koncentracija viršija

NADPH ir glutationo (GSH) koncentracijas, todėl ląstelėse atsiranda DNR pažeidos, kurios galiausiai sukelia OS.

Hiperglikemijos metu vyksta perteklinė gliukozės oksidacija per glikolizės ir Krebso ciklus, todėl mitochondrijų elektronų pernešimo grandinė tampa hiperaktyvi, tokiu būdu sukeldama per didelę ROS gamybą. Dėl ROS sukeltų DNR pažeidimų yra suaktyvinamas DNR reparacijos fermentas – poli-ADP ribozės polimerazė 1 (PARP1), kuri slopina gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GADPH) aktyvumą (Kosova et al., 2017). Inaktyvuota GADPH lemia gliceraldehido 3-fosfato ir kitų glikolizės tarpinių produktų, fruktozės 6-fosfato ir gliukozės 6-fosfato, kaupimąsi. Padidėjęs glikolizės tarpinių produktų kiekis suaktyvina penkis pagrindinius molekulinis kelius, susijusius su CD ir jo komplikacijų patogenezė: poliolio kelią, padidėjusi galutinių glikacijos produktų (angl. *Advanced glycation end products*, AGE) susidarymą, padidėjusi AGE receptorių (RAGE) ir juos aktyvuojančių ligandų susidarymą, baltymų kinazės C (PKC) izoformų aktyvaciją ir per didelį heksozamino kelio aktyvumą (Nellaiappan et al., 2021).

Gliukozės metabolizmo metu ląstelėse susidaro toksiški aldehydų metabolitai, kuriuos per poliolio kelią aldazės reduktazės paverčia netoksiškais alkoholiais. Sergant CD, aldazės reduktazės, naudojamos NADPH, gliukozę paverčia sorbitoliu, kuris oksiduojamas iki fruktozės. NADPH yra būtinas atliekant kitus svarbius procesus ląstelėje, pavyzdžiui, regeneruojant sumažintą GSH. Dėl to sumažėjusi antioksidantų NADPH ir GSH koncentracija sukelia per didelę vandenilio jonų gamybą, sutrikdant antioksidacinę funkciją (Nellaiappan et al., 2021).

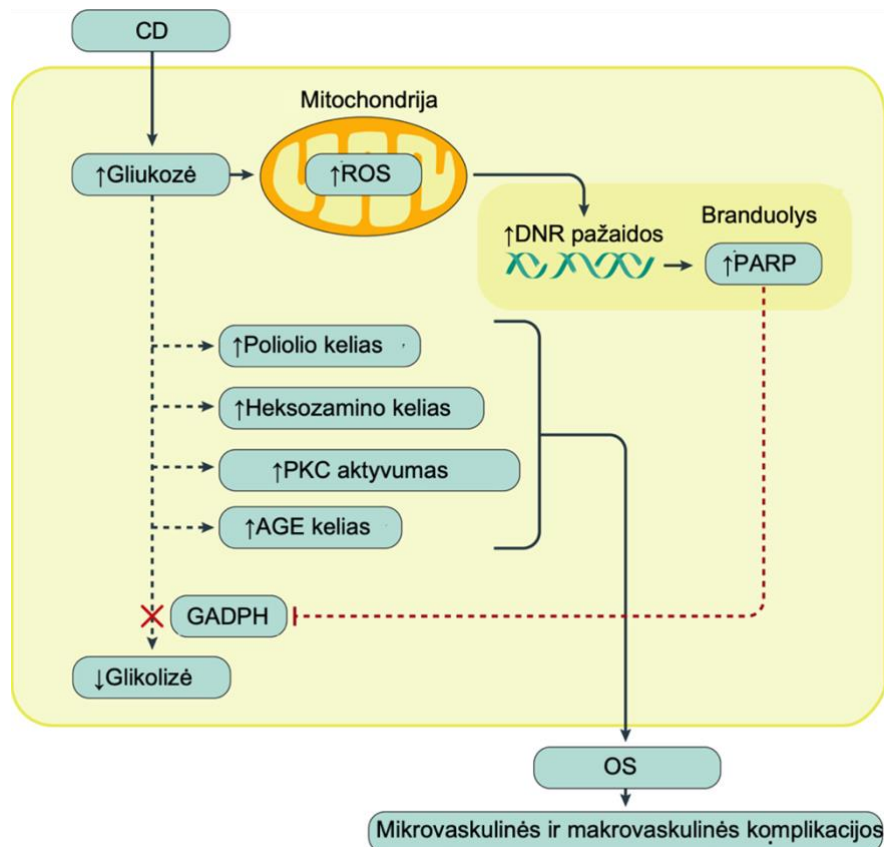
Glikolizės metu heksokinazė arba gliukokinazė suskaido gliukozę iki fruktozės 6-fosfato. Sergant CD, dėl didelio cirkuliuojančios gliukozės kiekio fruktozės 6-fosfatas nukreipiamas į kitus kelius, kur jis metabolizuojamas į uridino difosfato N-acetilgliukozaminą (UDP-GlcNAc). O-GlcNAc transferazė (OGT) UDP-GlcNAc panaudoja baltymų glikozilinimui, kurie yra susiję su priešūždegiminių ir koagulantų genų raiškos pokyčiais ir padidėjusia transkripcijos faktorių TGF- α ir TGF- β raiška (Daniels et al., 2020). Heksozamino kelio aktyvinimas taip pat gali slopinti endotelinės NO sintazės aktyvumą, taip pažeidžiant fosfatidilinozitolio 3-kinazės (PI3K) / baltymų kinazės B (Akt) kelią, taip lemiant OS (Fiorentino et al., 2013).

Per dideli viduląstelinės gliukozės kiekiai skatina mitochondrijų aktyvumą, padidina PKC ir NOX aktyvumą ir skatina padidėjusį gliukozės srautą per poliolio kelią – visa tai turi įtakos ląstelių metabolizmui. Hiperglikeminė aplinka aktyvuoja daugybę PKC izoformų, o tai lemia molekulinis pokyčius, įskaitant padidėjusią uždegiminių žymenų ir citokinų raišką. Patologinės pasekmės yra angiogenezė, kapiliarų ir kraujagyslių okliuzija, ekstraląstelinės membranos išsiplėtimas, bazinės membranos sustorėjimas ir pakitęs fermentų aktyvumas (Nellaiappan et al., 2021).

Padidėjęs ekstraląstelinis gliukozės kiekis lemia nefermentinį baltymų glikozilinimą ir AGE susidarymą. AGE keičia ląstelių baltymų struktūrą, todėl prarandama jų funkcija; jie taip pat

modifikuoja membranos baltymus, sudarydami kryžminius ryšius su kolageno skaidulomis, dėl kurių prarandamas kraujagyslių elastingumas (V. P. Singh et al., 2014). AGE prisijungia RAGE plazminėje membranoje ir skatina ROS gamybą. Taip pat AGE prisijungęs RAGE aktyvuoja transkripcijos faktorių NFκB, dėl kurio suaktyvinami priešuždegiminiai citokinai, augimo faktoriai ir adhezijos molekulės (Tobon-Velasco et al., 2014).

Kaip pavaizduota 1.2 paveikslėlyje, diabeto ir jo komplikacijų patogenezėje dalyvauja persidengiantys mechanizmai. Tačiau visais atvejais dėl per didelio gliukozės kiekio aktyvinti metaboliniai keliai skatina ROS formavimąsi ir ląstelės patiria OS. Šiais būdais padidėjęs tarpląstelinis ROS lemia DNR pažeidimus. Dėl DNR pažeidimų aktyvinama PARP1, kuri gamina ADP-ribozės polimerus, kurie jungiasi prie GAPDH ir keičia jos aktyvumą. GAPDH slopinimas blokuoja glikolizę, todėl glikolitiniai tarpiniai produktai yra nukreipiami į patogenetinius signalinius kelius, kurie lemia OS ir pasireiškia CD komplikacijos.

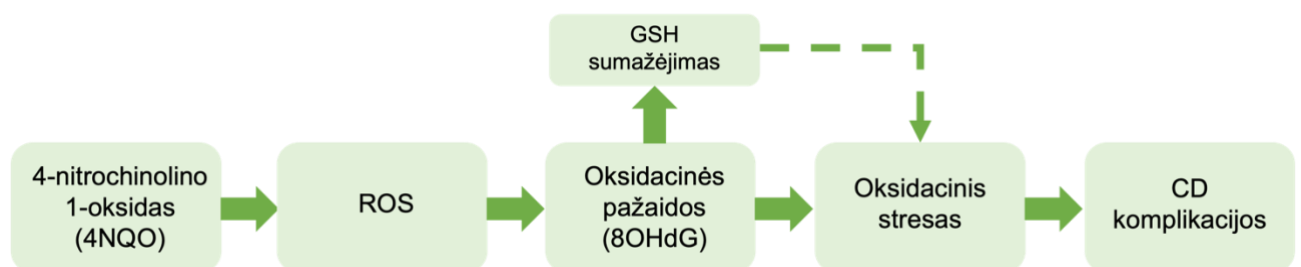


1.2 pav. Hiperglikemijos sukulto ląstelinio streso mechanizmai.

CD – cukrinis diabetas, ROS – reaktyvios deguonies formos. (Pagal Katsarou et al., 2017).

Siekiant iširti ir suprasti OS vaidmenį CD vystymesi, yra sukurti eksperimentiniai modeliai, naudojant struktūrinius gliukozės analogus. Pavyzdžiui, aloksanas (AX) naudojamas dviem skirtingiems patologiniams poveikiams tirti: selektyviam gliukozės stimuliuojamo insulino

sekrecijos slopinimui ir ROS susidarymui, skatinanti kasos β ląstelių nekrozę (Ighodaro et al., 2017). Abu poveikiai kartu sukelia į CD1 panašią patofiziologinę būseną ląstelėse. Įrodyta, kad citotoksinis AX poveikis pasireiškia dėl ROS veikimo, sukeliančio ląstelių nekrozę, dėl kalcio homeostazės sutrikimų ir mitochondrijų membranos destabilizavimo (Bensellam et al., 2012). Kiti gliukozės analogai ir įvairios cheminės medžiagos gali būti naudojamos, kuriant ROS susidarymo ir diabeto vystymosi modelius. Pavyzdžiui, 4-nitrochinolino 1-oksidas (4NQO) yra tabaką imituojantis kancerogenas, skatinantis ROS medžiagų apykaitos produktų susidarymą, kurie sąveikauja su nukleofiline DNR dalimi ir sudaro DNR aduktus (Sagheer et al., 2021). Dėl šių pažeidimų guaninas pakeičia pirimidiną ir sukelia genų mutacijas (Downes et al., 2014). Be tiesioginės sąveikos su DNR, 4NQO yra tarpląstelinio OS induktorius – išsekvoja ląstelėse GSH, taip ląstelėse skatinant OS (Koike et al., 2018) (1.3 pav.). 4NQO metabolizmo metu susidaro superoksido, vandenilio peroksido ir hidroksilo radikalai, kurie sąveikauja su nukleobazėmis ir susidaro dideli 8-hidroksideoksiguanozino (8OHdG) kiekiai (Butkowski, 2020). 8OHdG yra vienas pagrindinių oksidacijos šalutinių produktų; sergant CD nustatomi didesni jo kiekiai šlapime ir kraujo plazmoje (Butkowski, 2020). Tyrimais parodyta, kad dideli 8OHdG kiekiai teigiamai koreliuoja su HbA1c reikšme, bendru cholesterolio kiekiu ir neigiamai koreliuoja su GSH kiekiu (Al-Aubaidy & Jelinek, 2014; Moresco et al., 2013). Todėl 8OHdG yra laikomas potencialiu CD komplikacijų prognostiniu biožymeniu.



1.3 pav. 4-nitrochinolino 1-oksido veikimo schema.

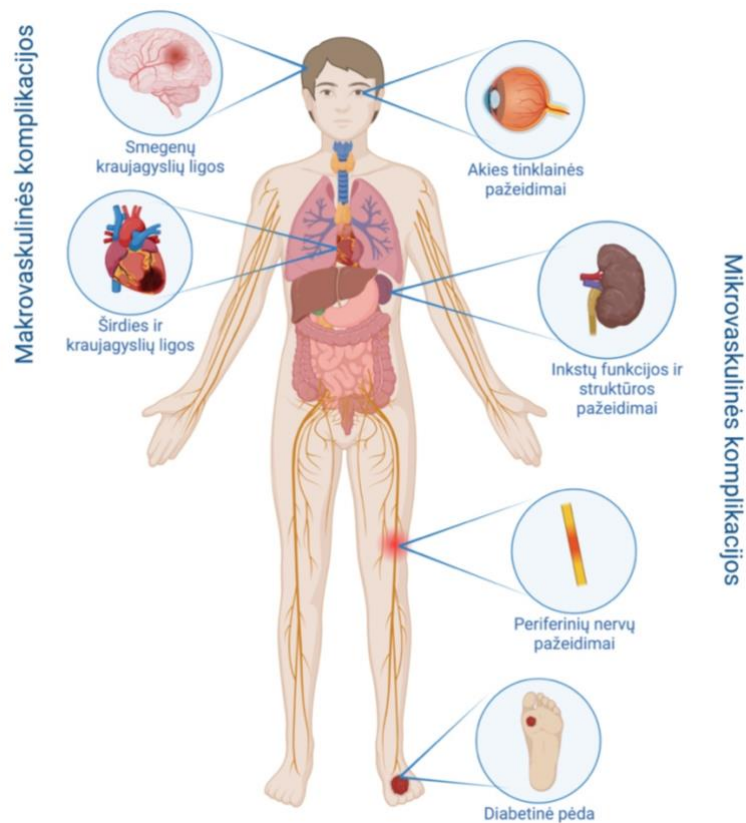
ROS – reaktyvios deguonies formos, GSH – glutationas, 8OHdG – 8-hidroksideoksiguanozinas, CD – cukrinis diabetas (Pagal Butkowski, 2020; Lan et al., 2016)

CD ir jo komplikacijos yra susijusios su ROS susidarymu, todėl yra ieškoma įvairių būdų kaip sumažinti ROS ir OS, taip slopinant CD progresavimą. Vieni iš terapinių gydymo vaistų yra antioksidantai, kurie mažina ROS kiekį ir slopina OS. A-lipoinė rūgštis (angl. *α-lipoic acid*, ALA) yra sieros turintis natūralus antioksidantas, kuris atlieka esminį kofaktoriaus vaidmenį, fermentiškai skaidant maistines medžiagas (Packer & Cadenas, 2011). Tyrimais parodyta, kad ALA mažina ROS kiekį, pagerina jautrumą insulinui, sumažina gliukozės kiekį kraujyje ir skatina kitų antioksidantų gamybą (Haghighatdoost & Hariri, 2019; G. Li et al., 2015). Tačiau ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimų rezultatai apie ALA naudą gydant CD yra prieštaringi. Neseniai atlikta metaanalizė neparodė

HbA1c skirtumų tarp kontrolinės grupės ir grupės, gydytos ALA (Ebada et al., 2019). Dauguma įtrauktų ligonių vartojo kitus vaistus nuo diabeto, pavyzdžiui, metforminą, sulfonilkarbamidą ir insuliną. Tik vienas tyrimas parodė, kad sergantiems pažengusia CD2 forma ir gydytiems ALA asmenims, pagerėjo HbA1c ir kiti metaboliniai rodikliai (Zhao & Hu, 2014). Tyrimais parodyta, kad įprastinio antidiabetinio gydymo, sergant CD2, papildymas ALA normalizuoja kūno svorį, išsaugo kasos β saleles ir palaiko normalią glikemiją, kartu sumažindamas inkstų pažeidimus, uždegimą ir fibrozę bei pagerindamas jų antioksidacinę būseną (Dugbartey et al., 2022). Tyrimuose su diabetinėmis pelėmis ALA vartojimas slopino OS bei iš dalies panaikino neuropatinį skausmą, todėl ALA papildai yra naudingi gydant diabetinę neuropatiją (Verma, 2018). Be to, *in vitro* ir *in vivo* tyrimais nustatyta, kad ALA reguliuoja antioksidacinių genų raišką (Jamor et al., 2019; Yamada et al., 2012), tačiau bendrai duomenų apie ALA poveikį genetiniams ir epigenetiniams mechanizmomams yra labai mažai. Apibendrinant, ALA turi pleiotropinį poveikį gliukozės metabolizmui, tačiau vis dar yra reikalingi papildomi, didesnio masto tyrimai, siekiant pilnai išsiaiškinti ALA papildų pritaikymą CD gydyme.

1.6. Cukrinio diabeto komplikacijos

CD komplikacijos skirstomos į mikrovaskulines ir makrovaskulines, pagal tai, kokios kraujagyslės (mažosios ar didžiosios) yra pažeidžiamos (1.4 pav.). Mikrovaskulinės komplikacijos apima pažeidimus akies tinklainėje, inkstų glomeruluose ir periferiniuose nervuose. Tai gali lemti aklumą, lėtinę inkstų ligą (LIL) ir nefropatiją bei skausmingas neuropatijas (Garla et al., 2019; Lim, 2014; Patel et al., 2021; Vujosevic et al., 2020). Makrovaskulinės komplikacijos pažeidžia arterijas, todėl kyla miokardo infarkto, insulto ir galūnių amputacijų riziką.



1.4 pav. Makrorovaskulinės ir mikrovaskulinės cukrinio diabeto komplikacijos. (Pagal Cole & Florez, 2020, sukurta su BioRender.com).

1.6.1. Inkstų patologijos

LIL yra progresuojantis sutrikimas, pasireiškiantis sumažėjusia inkstų funkcija, o ilgalaikė inkstų disfunkcija lemia nefropatijos – inkstų funkcijos praradimo ir struktūros pažeidimų – išsivystymą. LIL diagnozuojama remiantis dviem klinikiniais žymenimis: padidėjusiu albumino išsiskyrimu su šlapimu (albumino ir kreatinino santykis ≥ 30 mg/mmol) ir mažu glomerulų filtracijos greičiu (GFG < 60 ml/min/1,73 m²).

Hiperglikemija yra pagrindinis diabetu sergančių pacientų inkstų ligos išsivystymo ir progresavimo rizikos veiksnys. Sergant CD2, LIL išsivystymo rizika dar labiau didėja esant ilgai diabeto trukmei (≥ 15 metų), hiperlipidemijai, hipertenzijai ar jau išsivysčiusiai diabetinei retinopatijai (Siddiqui et al., 2022). Nustatyta, kad dauguma pacientų, sergančių nefropatija, serga dislipidemija, kurią sukelia sutrikęs lipoproteinų lipazės (LPL), esančios endotelio ląstelėse, veikimas. Sutrikusi LPL lemia padidėjusią trigliceridų koncentraciją serume ir sumažėjusį didelio tankio lipoproteinų (DTL) kiekį (Kawanami et al., 2016). Hiperglikemijos sąlygomis endotelio ląstelės ir podocitai struktūriškai nesubręsta, todėl negali palaikyti normalaus glomerulų kapiliarų pralaidumo.

1.6.2. Širdies ir kraujagyslių patologijos

Makrovaskulinės diabeto komplikacijos pažeidžia didesnes kraujagysles, dėl to sukeliama širdies ir kraujagyslių ligos (ŠKL). Pagrindinis širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimas būdingas CD sergantiems asmenims, yra priešlaikinė aterosklerozė, kurią lydi miokardo infarktas, insultas ir širdies funkcijos sutrikimai. ŠKL yra dažnos CD atveju ir sudaro daugiau nei pusę visų mirčių dėl diabeto komplikacijų (American Diabetes Association, 2021).

Manoma, kad hiperglikemija ir atsparumas insulinui labiausiai prisideda prie aterosklerozinių pokyčių ir diabeto makrovaskulinių komplikacijų patogenezės. Per pirmuosius 6–7 diagnozės metus išlaikius gerą glikemijos kontrolę, mažesnė ŠKL rizika išlieka ~10 metų (McRae & Low Wang, 2022). Didelė HbA1c koncentracija sukelia dislipidemiją, hiperhomocisteinemiją ir hipertenziją, padidina CRP kiekį, kraujo klampumą ir skatina OS, o tai prisideda prie ŠKL vystymosi (Prasad, 2018). Nors tikslios priežastys, lemiančios pradinius širdies ir kraujagyslių sistemos pokyčius, nėra žinomos, daugelis tyrimų rodo, kad endotelio disfunkcija atlieka svarbų vaidmenį (Nellaiappan et al., 2021). Endotelis kontroliuoja kraujagyslių homeostazę, reguliuodamas kraujagyslių pralaidumą, lipnumą, elastingumą ir vientisumą. Sergant CD organizmas yra uždegimo būsenoje, todėl yra aktyvuojamos imuninės ląstelės (makrofagai, T-ląstelės), kurios jungiasi prie kraujagyslių sienelių ir sukelia endotelio disfunkciją (Sun et al., 2020).

1.6.3. Periferinių nervų patologijos

Neuropatija yra jutimo funkcijos praradimas, kuris atsiranda dėl periferinės ir autonominės nervų sistemos pažeidimų. Tai neurodegeneracinis periferinės nervų sistemos sutrikimas, kuris pirmiausia paveikia jutimo aksonus, autonominius aksonus, o vėliau, kiek mažesniu mastu, motorinius aksonus (Patel et al., 2021). Neuropatiniai sindromai gali pasireikšti įvairiomis formomis ir yra klasifikuojami pagal pažeidžiamo nervo tipą, nervo pažeidimo vietą (centrinis, daugiažidininis ar sisteminis) ir ligos eigą (ūminė ar lėtinė). CD atveju labiausiai paplitusi ligos forma yra distalinė simetrinė polineuropatija, todėl dažniausiai ji įvardijama kaip diabetinė neuropatija (Patel et al., 2021). Ši patologija pasireiškia periferinių nervų pažeidimais rankose ir apatinėse galūnėse. Bet gali pasireikšti ir antrinės diabetinės neuropatijos: židininės neuropatijos, kurios apima atskirų periferinių nervų disfunkciją (mononeuropatijos arba radikulopatijos) ir autonominės neuropatijos (širdies autonominė neuropatija (AŠN), virškinimo trakto neuropatija, diabetinė cistopatija bei impotencija) (Feldman et al., 2019).

Jutimo nervas susideda iš trijų skirtingų nervų skaidulų pogrupių, kurie perduoda skirtingus pojūčius. Mažiausios (nemielinizuotos) skaidulos perduoda buką skausmą ir temperatūros jutimą,

vidutinio skersmens (mažos mielinizuotos) skaidulos perduoda greitą skausmo, temperatūros ir slėgio jutimą, o didžiausios (mielinizuotos) skaidulos perduoda lytėjimo ir slėgio jutimą. Diabetinės neuropatijos atveju pradžioje yra pažeidžiamos mažos nemielinizuotos skaidulos, o ligai progresuojant – mielinizuotos mažos ir didelės skaidulos. Pirminės sveikatos priežiūros srityje neuropatijos rizikos stebėjimas apsiriboja kasmetine diabeto apžvalga, įvertinant diabeto trukmę, HbA1c lygį ir atliekant galūnių apžiūrą. Todėl diabetinė neuropatija dažnai diagnozuojama per vėlai, nors ji gali išsivystyti CD1 sergantiems vaikams ir per pirmuosius metus nuo CD1 diagnozės (Kallinikou et al., 2019; Ziegler et al., 2014). Pagal PSO ir Amerikos diabeto asociacijos (ADA) rekomendacijas, diabetinės neuropatijos diagnozė patvirtinama, naudojant 10 g monofilamentą (World Health Organization, 2020; American Diabetes Association, 2022). Tačiau naudojant monofilamentą yra identifikuojama tik pažengusios formos neuropatija (kai pažeistos mielinizuotos nervinės skaidulos), kai yra didelė pėdos išopėjimo rizika (Armstrong et al., 2017; Pop-Busui et al., 2017). Dėl metodinių problemų, susijusių su neuropatijos diagnozavimu yra reikalingi papildomi tyrimai, siekiant tiksliau ir anksčiau nustatyti neuropatiją. (Inceu & Veresiu, 2015).

1.6.4. Akių patologijos

Diabetinė retinopatija sukelia tinklainės pažeidimus ir yra pagrindinė aklumo priežastis tarp dirbančio amžiaus populiacijos. Retinopatija pasižymi kraujagyslių pralaidumo pokyčiais, kapiliarų degeneracija, kapiliarų mikroaneurizmų ir nenormaliu kraujagyslių formavimusi. Diabetinės retinopatijos patogenezės ypatybės apima bazinės membranos sustorėjimą, sandarios tarpdotelinės jungties praradimą ir selektyvų pericitų praradimą, dėl kurio padidėja kraujagyslių pralaidumas (W. Wang & Lo, 2018). Pericitų apoptozė, kurią tiesiogiai sukelia hiperglikemija, yra svarbus ankstyvosios diabetinės retinopatijos rodiklis (Cheng et al., 2021). Manoma, kad dėl hiperglikemijos pradeda veikti metabolinis autoreguliacinis mechanizmas, kuris lemia tinklainės kraujagyslių išsiplėtimą ir kraujotakos pokyčius (Bek, 2017). Be to, ryškus pericitų ir endotelio ląstelių praradimas sukelia kapiliarų okliuziją ir išemiją. Todėl suaktyvėja hipoksijos sukeliamas faktorius 1 (HIF-1) ir kraujagyslių endotelio augimo faktorius A (angl. *Vascular endothelial growth factor A*, VEGFA) reguliavimas (H. Huang et al., 2015).

Diabetinė retinopatijos paplitimas priklauso nuo diabeto trukmės ir glikemijos kontrolės (Stitt et al., 2016). Dėl blogos glikemijos kontrolės CD sergantiems asmenims dažniau ir anksčiau pasireiškia glaukoma, katarakta ir kiti akių sutrikimai. Be to, prie diabetinės retinopatijos rizikos prisideda pirminė arterinė hipertenzija (PAH) ir dislipidemija (Eid et al., 2019; Yau et al., 2012). Neveiksminga gliukozės kiekio kraujyje kontrolė asmenims, sergantiems CD2, dažnai lydi lipidų apykaitos sutrikimus, dėl kurių sumažėja kraujagyslių endotelio ląstelių barjerinė funkcija ir

raudonųjų kraujo kūnelių gebėjimas pernešti deguonį, o tai lemia kitų akių ligų atsiradimą asmenims sergantiems retinopatija (Shi et al., 2020; Yao et al., 2021). Tyrimai rodo, kad asmenims, sergant CD dešimt metų ir ilgiau, akies dugno pažeidimai palaipsniui pablogėja ir patenka į geltonosios dėmės sritį (Yao et al., 2021). Todėl CD ligoniai, turėtų atidžiai stebėti savo gyvenimo būdą ir mitybos įpročius, reguliariai tikrinti gliukozės kiekį kraujyje ir kitų audinių bei organų funkcinę būklę, palaikyti gliukozės kiekio kraujyje stabilumą ir vengti tolesnio CD pablogėjimo.

1.7. MiRNR kaip cukrinio diabeto biožymenys

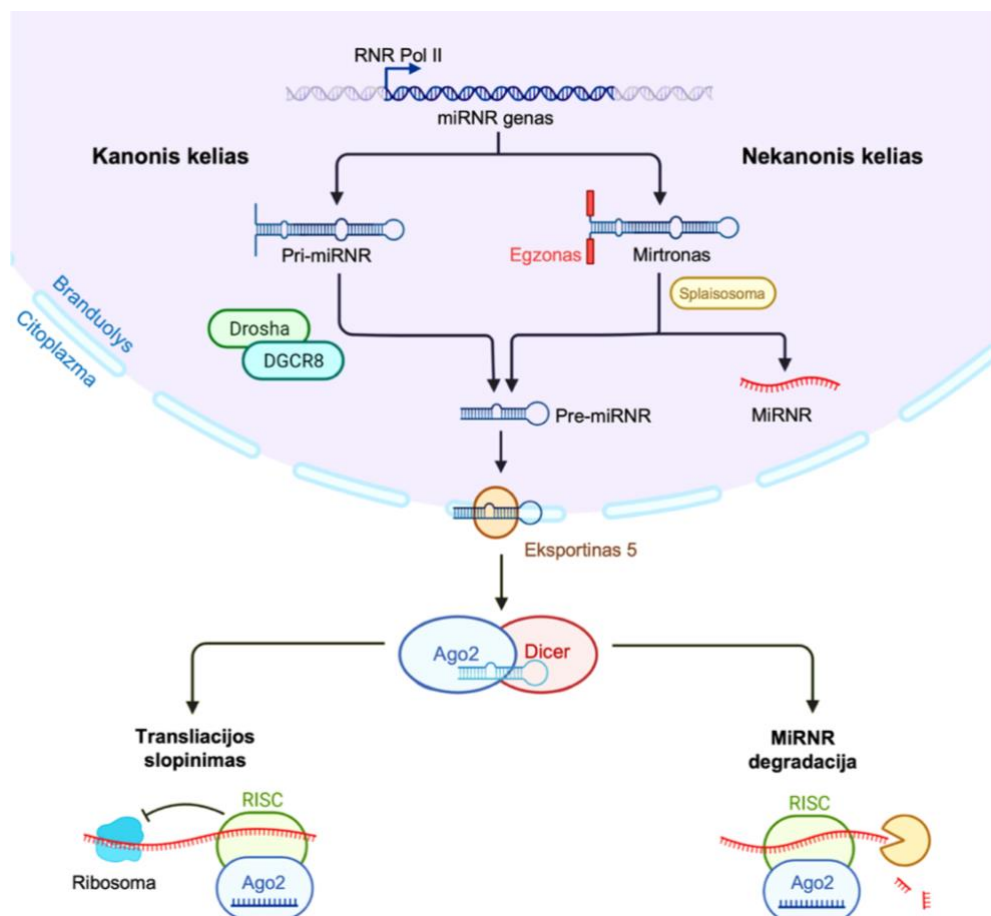
Diabeto paplitimo padidėjimas yra susijęs su gyvenimo būdo ir mitybos įpročių pokyčiais, įskaitant kaloringą ir riebią mitybą bei neveiklumą. Šie aplinkos veiksniai dalyvauja epigenetiniuose keliuose, kurie modifikuoja genų raišką (Diedisheim et al., 2020). MikroRNR (miRNR) yra epigenetinių mechanizmų, reguliuojančių genų raišką po transkripcijos, dalis. Didžioji dauguma miRNR taikinių atpažįstami per dalinį komplementarumą, todėl yra slopinama transliacija ir / arba skatinama mRNR degradacija, taip nuslopinant genų raišką (Iwakawa & Tomari, 2015; Jonas & Izaurralde, 2015). Per pastaruosius du dešimtmečius miRNR vis plačiau siejamos su įvairiais vystymosi ir patologiniais procesais. MiRNR gali būti transportuojamos iš ląstelės į ląstelę ir cirkuliuoti kaip stabilios molekulės kūno skysčiuose, taip koordinuodamos genų raišką įvairiose ląstelėse. Todėl šios biomolekulės yra potencialūs ligos prognozavimo, diagnozavimo ir valdymo biožymenys.

1.7.1. MiRNR biogenezė ir funkcija

MiRNR yra mažos (~22 nt ilgio), viengrandės, nekoduojančios RNR, dalyvaujančios RNR interferencijos procese, kuriame reguliuoja homologinių tikslinių genų transkriptų raišką transkripcijos ir / arba potranskripcijos lygiu. MiRNR gali būti koduojamos baltymus koduojančių genų egzonuose ir intronuose bei ilgose nekoduojančiose RNR. MiRNR reguliuoja genų raišką branduolyje ir citoplazmoje, taip dalyvaudamos ląstelių diferenciacijos, proliferacijos ir apoptozės procesuose bei ligų vystymesi (Annese et al., 2020).

MiRNR biogenezė skirstoma į kanoninį ir nekanoninį kelius (1.5 pav.). Kanonis miRNR biogenezės kelias yra pagrindinis, o nekanoniniame miRNR biogenezės kelyje miRNR subręsta dėl skirtingo tų pačių kanoninio kelio baltymų derinio. Abiem atvejais, miRNR biogenezė prasideda branduolyje, kur RNR polimerazė II transkribuoja miRNR transkriptus į ilgas molekules (~1000 nt ilgio), vadinamas pirminėmis miRNR (pri-miRNR). Kanoniame kelyje, pri-miRNR yra atpažįstama mikroprocesorinio komplekso, kurį sudaro RNR jungiantis baltymas DGCR8 (angl. *DiGeorge*

Syndrome Critical Region 8) ir Dorsha nukleazė ir skelia dvigrandę pri-miRNR į mažesnius (<100 nt ilgio), plaukų segtuko formos, miRNR pirmtakus (pre-miRNR). Nekanoniame, nuo Drosha / DGCR8 nepriklausomame kelyje, pre-miRNR susidaro iš mRNR intronų ir yra vadinamos introninėmis miRNR (mirtronais). Mirtronai primena Dicer substratus ir yra apdorojami alternatyvaus splaisingo būdu, o ne Drosha / DGCR8 kompleksu (Rorbach et al., 2018). Toliau miRNR brendimas vyksta pagal kanoninį kelią. Po skėlimo pre-miRNR 3' gale lieka 2 nukleotidų iškyša, kurią atpažįsta baltymas eksportinas 5 ir jis perneša pre-miRNR iš branduolio į citoplazmą. Citoplazmoje pre-miRNR toliau bręsta dalyvaujant Dicer endonukleazei, kuri skelia pre-miRNR ir susidaro ~22 nt dvigrandė miRNR (Ha & Kim, 2014; Margaritis et al., 2021). Viena iš subrendusių miRNR grandinių prisijungia prie Ago šeimos baltymų (angl. *Argonaute proteins*) ir vyksta miRNR indukuoto nutildymo kompleksas (angl. *MiRNA-induced silencing complex*, RISC) brendimas. Brendimo metu viena miRNR grandinė atskiriama ir suardoma, o kita grandinė paliekama. Grandinės pasirinkimas (5p arba 3p) iš dalies yra pagrįstas termodinaminiu stabilumu miRNR duplekso 5' galuose, įprastai mažesnio stabilumo grandinė yra 5', todėl ji prisijungia prie Ago2 (O'Brien et al., 2018). Subrendę RISC pristatomi į jų mRNR taikinius ir sukelia mRNR slopinimą arba suardymą.



1.5 pav. MiRNR biogenezės procesas (Buitrago et al., 2023).

MiRNR genų raišką reguliuoja dviem skirtingais būdais: aktyvuoja mRNR deadenilinimą, kuris vėliau sukelia transkripto degradaciją, ir / arba slopina transliaciją, todėl nesusidaro transkriptas (Kim & Zhang, 2019). MiRNR gali turėti kelis mRNR taikinius, todėl susidaro sudėtingas miRNR tarpininkaujamas genų raiškos reguliavimo tinklas. Taip pat miRNR turi specifinių branduolinių funkcijų: RNR transkriptomo ir alternatyvaus splaisingo reguliavimas ir tiesioginis dalyvavimas reguliuojant genų raišką transkripcijos lygiu (Catalanotto et al., 2016). Tyrimais parodyta, kad miRNR padidina mRNR kiekį, skatindamos transkripciškai aktyvią chromatiną būseną ir alternatyvų splaisingą (Alló et al., 2014; Xiao et al., 2017). Manoma, kad miRNR gali būti susijusios su *de novo* DNR metiliniu, nes jų taikiniai gali būti DNR metiltransferazės arba su metiliniu susiję genai (Alló et al., 2014; Portnoy et al., 2016). Pavyzdžiui, kompleksas, nukreiptas į nuo ciklino priklausomą kinazės inhibitoriaus 1 A (*CDKN1A*) promotorių, sąveikauja su RNR polimeraze II, kad paskatintų transkripcijos inicijavimą ir mRNR elongaciją, kartu su histono H2B ubikvitiliniu *CDKN1A* geno srityje. Šis ubikvitilimas yra būtinas H3K4 metiliniui ir acetiliniui, po kurio seka histono modifikacija (Alló et al., 2014; Portnoy et al., 2016). Visi šie duomenys rodo, kad miRNR funkcijos yra labai įvairios ir svarbios. Įrodyta, kad dėl miRNR raiškos pokyčių žmonėms pasireiškia įvairios ligos, įskaitant vėžį, ŠKL, medžiagų apykaitos ligas, CD, o sutrikusi miRNR reguliacija yra priežastinis ligos progresavimo veiksnys (Paul et al., 2018).

1.7.2. MiRNR raiškos pokyčiai sergant cukriniu diabetu

MiRNR kiekis kūno skysčiuose paprastai atspindi specifinius audinių pažeidimus ir vis daugiau tyrimų rodo, kad specifinis miRNR rinkinys turi pakitusį raiškos profilį progresuojant CD (Assmann et al., 2018; Kim & Zhang, 2019). MiRNR dalyvauja daugybėje biologinių procesų, pavyzdžiui, ląstelių vystymesi, proliferacijoje, diferenciacijoje, apoptozėje. Taip pat miRNR reguliuoja genų, susijusių su CD patogenezė (kasos β ląstelių disfunkcija, gliukozės homeostazės sutrikimai, atsparumas insulinui, uždegimas) raišką (Dieter et al., 2021; Estrella-Ibarra et al., 2021; Feng et al., 2016; Grieco et al., 2021; Kapłon-Ciešlicka et al., 2015). Kiekviena miRNR gali reguliuoti daugiau nei vieną taikinį, taip vienu metu darydama poveikį keliuose lygmenyse. CD ir jo komplikacijų vystymesi yra svarbios miRNR, kurios reguliuoja genus, susijusius su kasos β ląstelių destrukcija, gliukozės metabolizmo palaikymu ir ROS susidarymu.

MiRNR veikia kasos β ląsteles, reguliuodamos ląstelių apoptozę, proliferaciją, diferenciaciją, veikdamos proapoptotinius ir antiapoptotinius genus (Feng et al., 2016). Pavyzdžiui, miR-125b, miR-153 ir miR-16 taikiniai yra Bcl-2 baltymų šeima, kuri reguliuoja ląstelių ciklą (J. Cui &

Placzek, 2018). MiR-17-92 klasteryje esančios miRNR skatina kasos β ląstelių proliferaciją ir adaptaciją streso sąlygomis (Y. Chen et al., 2016). Tyrimais parodyta, kad miR-17 pagerina gliukozės toleranciją ir kasos β ląstelių funkciją bei slopina su TXNIP/NLRP3 uždegiminiu keliu susijusią piroptozę CD pelėse (Liu et al., 2021). Kiti kasos β ląstelių proliferacijos reguliatorių pavyzdžiai yra miR-29a, miR-146a ir miR-375: padidėjęs miR-29a kiekis tarpininkauja kasos β disfunkcijoje ir padidina ląstelių proliferaciją, miR-146a prisideda prie FFA sukeltos β ląstelių apoptozės stiprinimo, o miR-375 palaiko normalią kasos α ir β ląstelių masę (Bagge et al., 2012; Lovis et al., 2008; Poy et al., 2009).

MiRNA dalyvauja medžiagų apykaitos procesuose, reguliuodamos riebalų ir lipidų metabolizmą, adipocitų diferenciaciją ir atsparumą insulinui. Mažas cirkuliuojantis miR-223 lygis yra susijęs su pažeistu riebalinio audinio jautrumu insulinui (Sánchez-Ceinos et al., 2021). MiR-223 slopina *IGF-1R* raišką, kuris yra būtinas užtikrinant normalų audinių energijos metabolizmą ir mažas jo kiekis yra siejamas CD2 ir diabetinių komplikacijų, įskaitant neuropatiją, nefropatiją ir retinopatiją, išsivystymu (Aguirre et al., 2016; F. Liu et al., 2021). Kitos miRNR taip pat dalyvauja jautrumo insulinui procesuose. Pavyzdžiui, miR-93, miR-199a ir miR-223 gali tiesiogiai slopinti GLUT4 baltymą skeleto raumenyse ir riebaliniame audinyje, o miR-16 yra svarbi vystantis IR, nes slopina *IRS-1*, *IRS-2* ir *INSR* genų raišką. (Y. H. Chen et al., 2013; Chuang et al., 2015; Yan et al., 2014; Aguirre et al., 2016). Šie trys baltymus koduojantys genai yra pagrindinės insulino signalinio kelio molekulės, kurių slopinimas lemia atsparumą insulinui ir medžiagų apykaitos sutrikimus, tokius kaip CD (Aguirre et al., 2016; Ma et al., 2018). Tiesioginis miR-27a taikiny yra peroksisomų proliferatoriaus aktyvuotas receptorius γ (PPAR- γ), kuris kontroliuoja IR ir gliukozės įsisavinimą (T. Chen et al., 2019). O miR-155 turi apsauginį poveikį, nes pagerina jautrumą insulinui (Spallone et al., 2021; Xourgia et al., 2018).

ROS susidarymas ir OS yra vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių CD ir jo komplikacijų vystymąsi. OS veikia daugelio miRNR raiškos lygius arba miRNR reguliuoja genus, dalyvaujančių OS atsake (Konovalova et al., 2019). OS metu miR-16 raiška yra slopinama, taip reguliuojant ląstelių ciklą ir apoptozę (Toro et al., 2022). Taip pat, OS sąlygomis yra slopinama miR-17 raiška ir skatinama fosfatazės ir tenzino homologo (angl. *Phosphatase and tensin homolog*, PTEN) raiška, kuris reguliuoja ląstelių proliferaciją (X. Wang et al., 2019). Esant OS sumažėja miR-106a kiekis, o tai sukelia priešlaikinį senėjimą, nes reguliuojant *E2F1* raišką, yra slopinamas ląstelių ciklo G₁/S fazių perėjimas (Tai et al., 2020). MiR-223 slopinimas sulėtina ROS gamybą ir sumažina peroksidacijos aktyvumą, taip padidindama antioksidantų fermentų aktyvumą (Q. Tang et al., 2018). Įvairūs tyrimai pademonstravo apsauginį miR-223 vaidmenį nuo OS, nes ji slopina NF- κ B ir trukdo autofagijos baltymams (H. Y. Tan et al., 2021; Q. Tang et al., 2018). MiR-223 taikiniai yra genai, susiję su OS, insulino sintezės ir sekrecijos, uždegimo ir autofagijos procesais. MiR-195,

slopinama mitochondrijų energijos gamybą ir reguliuodama su mitochondrijomis susijusių baltymų raišką, gali susilpninti uždegimą, apoptozę ir OS (H. Wang et al., 2018; Xia et al., 2022). MiR-499a yra būtina slopinant mitochondrijų apoptozę ir atlieka apsauginį poveikį nuo vandenilio peroksido sukeltos žalos kardiomiocituose (J. Wang et al., 2014).

MiRNR dalyvauja ne tik CD vystymesi, bet ir su juo susijusių komplikacijų pasireiškinge. Pavyzdžiui, maža miR-192 raiška stipriai koreliuoja su mažu GFG ir dideliu fibrozės balu, o tai rodo miR-192 sumažėjimą pažengusioje nefropatijoje (Krupa et al., 2010). Taip pat nustatyta žymiai didesnė miR-106a ir miR-30a raiška glomerulonefritu sergančių asmenų glomeruluose, palyginti su sveikais asmenimis (L. Wang et al., 2020). Ankstesni tyrimai patvirtino, kad miR-17 ir miR-20a yra susiję su nefrono pirmtakų proliferacija ir prisideda prie inkstų ligų vystymosi (C. Cui et al., 2018). Hiperglikemija lemia padidėjusį miR-27a kiekį, kuris trikdo normaliai podocitų veiklai bei skatina jų apoptozę (Z. Zhou et al., 2017). Nustatyta, kad padidėjusi miR-199a raiška pagreitina diabetinės neuropatijos progresavimą, o miR-146a buvo rasta uždegiminėse ląstelėse, esant periferinei neuropatijai (Spallone et al., 2021; Xourgia et al., 2018). Be to, buvo nustatyta, kad miR-27a ir miR-140 yra svarbios Švano ląstelių mielinogenezei ir proliferacijai (B. Fan et al., 2020). MiR-499a CD kontekste yra menkai nagrinėta, tačiau yra parodyta, kad tam tikri šios miRNR variantai gali būti susiję su didesne neuropatijos ir AŠN rizika (Ciccacci et al., 2018). Nustatyta mažesnė miR-106a raiška sergant diabetine neuropatija, 12/15-lipoksigenaze reguliuojant OS (Y. Wu et al., 2017). Kita vertus, padidėjusi miR-106a raiška slopina *HIF1-α* ir kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus A (angl. *Vascular en endothelial growth factors*, VEGFA) raišką diabetinėje tinklainėje ir taip apsaugo nuo retinopatijos (Ling et al., 2013). Asmenims, sergantiems širdies nepakankamumu (ŠN), nustatyti mažesni miR-106, miR-197 ir miR-223 kiekiai (S. S. Zhou et al., 2018).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos ir įranga

Šiame tyrime naudotos medžiagos ir priemonės pateiktos 2.1 lentelėje, įranga – 2.2 lentelėje.

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos ir priemonės, jų gamintojai.

Medžiaga / priemonė	Gamintojas
TRIZOL LS reagentas	<i>Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, JAV</i>
Trichlormetanas / chloroformas	<i>Carl ROTH, Karsrūhė, Vokietija</i>
100 % izopropanolis	<i>Fisher Bioreagents, Gelis, Belgija</i>
≥96 % etanolis	<i>Honeywell, Zėlcė, Vokietija</i>
benukleazis vanduo	<i>Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva</i>
Egzogeninė 1 nmol/l ath-miR159a su fosforilintu 5' galu	<i>Metabion, Šteinkirchenas, Vokietija</i>
<i>TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis</i> rinkinys	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Plezantonas, JAV</i>
kPGR reakcijos mišinys <i>4× TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX)</i>	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Plezantonas, JAV</i>
50 µl ROX tirpalas	<i>Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva</i>
<i>20×TaqMan Advanced MicroRNA Assay</i> pradmenų ir hidrolizės zondų rinkiniai, kat. nr: hsa-miR-16-5p (#477860_mir), hsa-miR-17-5p (#478447_mir), hsa-miR-27a-3p (#478384_mir), hsa-miR-29a-3p (#478587_mir), hsa-miR-106a-5p (#478225_mir), hsa-miR-128-3p (#477892_mir), hsa-miR-146a-5p (#478399_mir), hsa-miR-152-3p (#477921_mir), hsa-miR-155-5p (#483064_mir), hsa-miR-195-5p (#477957_mir), hsa-miR-210-3p (#477970_mir), hsa-miR-222-3p (#477982_mir), hsa-miR-223-3p (#477983_mir), hsa-miR-499a-5p (#478139_mir), ath-miR159a (#478411_mir).	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Plezantonas, JAV</i>
Mėgintuvėlių plokštelės <i>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL</i>	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Sudžou, Kinija</i>
Mėgintuvėlių juostelės <i>MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip</i>	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Sudžou, Kinija</i>
Mėgintuvėlių dangtelių juostelės <i>MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips</i>	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Sudžou, Kinija</i>
Dengiamosios optinės plėvelės <i>Adhesive sealing film, for qPCR, 50 µm</i>	<i>Nerbeplus, Luhė-Vildenau, Vokietija</i>

2.2 lentelė. Naudota įranga ir jos gamintojai.

Įranga	Gamintojas
Realaus laiko termocikleris <i>QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR System, 96-well, 0,1 ml</i>	<i>Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Singapūras</i>
Termocikleris <i>Eppendorf MasterCycler EP Gradient S Thermal Cycler 96 Well</i>	<i>Eppendorf, Hamburgas, Vokietija</i>
Bekiuvetis spektrofotometras <i>NanoDrop™ 2000</i>	<i>Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Šiaurės Karolina, JAV</i>
Centrifuga <i>Universal 320</i>	<i>Hettich Zentrifugen, Tuttingenas, Vokietija</i>
Centrifuga <i>Eppendorf 5424</i>	<i>Eppendorf, Hamburgas, Vokietija</i>

2.2. Ligoniai ir mėginiai

Šis tyrimas yra Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro (VU GMC) kartu su Vilniaus universiteto ligoninės “Santaros klinikų” (VUL SK) Endokrinologijos centru vykdomo biomedicininio tyrimo dalis, kuriam atlikti yra gautas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 2019/6–1146–635. Kraujo mėginiai surinkti VUL SK 2019-2022 m.

Į tyrimą įtraukti 99 asmenys, iš kurių 40 diagnozuotas CD1, 38 – CD2 ir 21 asmuo priklauso kontrolinei, ambulatoriškai sveikų (asimptomatinių) pacientų (ASP) grupei. Vienuolika CD ligonių (3 CD1 ir 8 CD2) buvo gydomi α -lipoine rūgštimi (ALA) – iš jų mėginiai buvo paimti prieš ir po ALA gydymo. Klinikiniai ir biocheminiai tyrime dalyvaujančių asmenų rodikliai buvo paimti iš medicininių įrašų ar gauti apklausos metu, kurią atliko endokrinologas (2.3 lentelė). Kai kuriems iš tiriamosios grupės ligonių buvo nustatyta ketonurija (4 CD1 ir 1 CD2), angiopatija – 3 (1 CD1 ir 2 CD2), tačiau dėl mažo atvejų skaičiaus palyginamosiose subgrupėse sąsajos su miRNR raiška nebuvo analizuojamos.

Molekulinei analizei veninis kraujas buvo renkamas į vakuuminius mėgintuvėlius su ličio heparinu (BD Vacutainer, Naujasis Džersis, JAV). ALA grupės asmenims veninis kraujas buvo paimtas prieš pradėdant gydymą ir vidutiniškai po penkių dienų gydymo. Per tris valandas nuo kraujo paėmimo mėginiai transportuoti kambario temperatūroje į VU GMC laboratorijas. Genetiniams tyrimams leukocitai buvo kultivuojami veikiant 4NQO, VU GMC Biomokslų instituto (BMI) citogenetikos laboratorijoje.

2.3 lentelė. Cukrinio diabeto ligonių klinikiniai-biocheminiai rodikliai.

Rodiklis (vidurkis, intervalas)		CD1 (N = 40)	CD2 (N = 38)	ALA grupė* (N = 11)	ASP (N = 21)
Demografiniai rodikliai					
Lytis	Moteris	15	11	7	13
	Vyras	25	17	4	8
Amžius (m.)		39 [20; 70]	61 [34; 81]	55 [23; 81]	37 [23; 70]
Klinikiniai rodikliai					
Diabeto trukmė (m.)		16 [0; 43]	12 [0; 42]	16 [0; 42]	–
Blogos glikemijos kontrolės trukmė (m.)		3 [0; 11]	3 [0; 8]	1 [0; 1]	–
Glikemijos kontrolė	Gera	11	8	5	–
	Bloga	29	29	6	–
Sistolinis kraujospūdis (mmHG)		123 [80; 159]	137 [107; 178]	129 [107; 170]	121 [100; 128]
Diastolinis kraujospūdis (mmHG)		75 [50; 90]	81 [59; 95]	77 [55; 80]	78 [65; 96]
Pulsas (dūžiai/min.)		75 [36; 92]	74 [55; 115]	75 [55; 80]	76 [63; 89]
Biocheminiai rodikliai					
HbA1c konc. (%)		9,3 [5,6; 16,3]	9,1 [5,8; 15]	8,4 [7,0; 12,6]	–
Nežinoma, N		5	5	1	–
Kreatinino konc. (μmol/l)		79 [40; 379]	78 [41; 240]	70 [41; 98]	–
Nežinoma, N		1	–	–	–
GFG (ml/min./1,73 m ²)		97 [26; 146]	86 [25; 129]	94 [73; 118]	–
Nežinoma, N		2	–	–	–
Cholesterolio konc. (mmol/l)		5,4 [3,1; 7,5]	5,1 [3,3; 7,9]	4,8 [3,1; 7,31]	–
Nežinoma, N		26	26	4	–
Trigliceridų konc. (mmol/l)		1,4 [0,5; 3,7]	2,7 [1,0; 7,4]	1,9 [0,6; 5,0]	–
Nežinoma, N		26	26	4	–
DTL konc. (mmol/l)		1,5 [0,9; 2,4]	1,1 [0,7; 1,5]	1,3 [0,7; 1,5]	–
Nežinoma, N		26	26	4	–
MTL konc. (mmol/l)		3,2 [1,8; 4,9]	2,8 [1,7; 4,7]	[1,7; 4,7]	–
Nežinoma, N		26	26	4	–
Antropometriniai rodikliai					
KMI (kg/m ²)		24 [18; 34]	34 [25; 45]	32 [21; 45]	26 [18; 34]
Liemens apimtis (cm)		94 [62; 109]	95 [81; 140]	104 [68; 134]	93 [66; 111]
Klubų apimtis (cm)		103 [64; 123]	104 [98; 140]	113 [97; 140]	105 [87; 126]
Kaklo apimtis (cm)		36 [31; 48]	36 [32; 48]	39 [32; 43]	35 [29; 44]
Diabetinės komplikacijos (yra / nėra)					
Ketoacidozė		8 / 32	1 / 37	2 / 9	–
Lėtinė inkstų liga		5 / 35	7 / 31	–	–
Nefropatija		8 / 6	7 / 5	1 / 3	–
Pirminė arterinė hipertenzija		15 / 25	32 / 6	6 / 5	–
Išeminė širdies liga		3 / 37	12 / 26	2 / 9	–
Širdies nepakankamumas		2 / 38	10 / 38	1 / 10	–
Polineuropatija		12 / 28	13 / 25	1 / 10	–
Autonominė širdies neuropatija		11 / 28	19 / 18	5 / 6	–
Retinopatija		20 / 7	14 / 10	3 / 1	–

CD1 – I tipo cukrinis diabetas, CD2 – II tipo cukrinis diabetas, ASP – asimptomatinių pacientų grupė, ALA grupė – α-lipoine rūgštimi gydyti ligoniai, KMI – kūno masės indeksas, HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, GFG – glomerulų filtracijos greitis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai.

*ALA grupę sudaro 3 ligoniai su CD1 ir 8 su CD2.

2.3. RNR skyrimas

Iš šaldytų leukocitų mėginių visuminė RNR išskiriama naudojant *TRIzol™ LS* reagentą, vadovaujantis gamintojo protokolu (*Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific*). Į 250 µl atitirpinto leukocitų mėginio įdedama 4,88 pmol/L egzogeninės miRNR ath-miR159a (*Metabion*) ir švelniai išmaišoma. Tuomet įpilama 750 µl *TRIzol™ LS* reagento, mėginys sumaišomas švelniai pavartant ir inkubuojamas 6 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos į mėginį įpilama 200 µl 96 % chloroformo (*Carl ROTH*), mėginys sumaišomas švelniai pavartant ir inkubuojamas kambario temperatūroje 3 min. Po inkubacijos mėginys 15 min. centrifuguojamas $12\ 000 \times g$ 4 °C temperatūroje. Viršutinis vandeninis sluoksnis su jame esančia RNR frakcija perkeliamas į naują 1,5 mL mikrocentrifuginį mėgintuvėlį. Į RNR frakciją įpilama 500 µl 100 % izopropanolio (*Fisher Bioreagents*), išmaišoma ir mėginys inkubuojamas 10 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojamas 10 min. $12\ 000 \times g$ 4 °C temperatūroje, supernatantas pašalinamas, paliekant RNR nuosėdas. RNR nuosėdos praplaunamos 1 ml 75 % etanoliu (*Honeywell*) ir 5 min. centrifuguojamas $7500 \times g$ 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir išdžiovinamas likęs etanolis (10 min. kambario temperatūroje). Išgryninta RNR ištirpinama 40 µl benukleazio vandens (*Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific*), inkubuojant 10 min. 58 °C temperatūroje. Išskirtos RNR koncentracija ir kokybė įvertinta *NanoDrop™ 2000* spektrofotometru (*Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific*). Išskirta RNR nedelsiant naudojama komplementariai DNR (kDNR) sintezei arba trumpai saugoma -20 °C temperatūroje.

2.4. Komplementarios DNR sintezė

kDNR sintezė atliekama naudojant *TaqMan Advanced miRNA Synthesis* rinkinį (*Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific*), laikantis gamintojo rekomendacijų. MiRNR raiškos tyrimui kDNR sintetinama visoms mėginyje esančioms miRNR kartu, atliekant keturias reakcijas: poliadenilinimo, adapterio ligavimo, atvirkštinės transkripcijos (AT) ir pirminės amplifikacijos, preamplifikacija, reakcijos.

Pirmosios reakcijos metu poli(A) uodega prijungiama prie miRNR 3' galo. Poliadenilinimo reakcijos mišinio sudėtis pateikta 2.4 lentelėje. Temperatūrinis režimas: 37 °C – 45 min., 65 °C – 10 min., 4 °C – ∞.

2.4 lentelė. Poliadenilinimo reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Komponentas	Pradinė koncentracija / kiekis	Galutinė koncentracija / tūris
Autoklavuotas, distiliuotas vanduo	–	Iki 5 μ l
Poli(A) buferis	10 \times	1 \times
ATP	10 mM	1 mM
Poli(A) polimerazė	5 U/ μ l	0,3 U/ μ l
Išskirta RNR	~100-200 ng	2 μ l

Antrosios reakcijos – ligavimo – metu prie kiekvienos miRNR 5' galo prijungiamas adapteris. Paruoštas reakcijos mišinys, kurio sudėtis vienam mėginiui pateikta 2.5 lentelėje, išpilstomas po 10 μ l į kiekvieną mėgintuvėlį su poliadenilinimo produktu. Ligavimas vykdomas inkubuojant 16 °C 60 min.

2.5 lentelė. Adapterio ligavimo reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Komponentas	Pradinė koncentracija / kiekis	Galutinė koncentracija / tūris
Autoklavuotas, distiliuotas vanduo	–	iki 15 μ l
Ligazės buferis	5 \times	1 \times
PEG 8000	50 %	15 %
Ligavimo adapteris	25 \times	1 \times
RNR ligazė	10 U/ μ l	1 U/ μ l
Poliadenilinimo produktas	–	5 μ l

Trečioji reakcija – atvirkštinė transkripcija (AT). Reakcijos mišinys, kurio sudėtis vienam mėginiui pateikta 2.6 lentelėje, išpilstomas po 15 μ l į kiekvieną mėgintuvėlį su antro etapo produktu. Temperatūrinis režimas: 42 °C – 15 min., 85 °C – 5 min., 4 °C – ∞ .

2.6 lentelė. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Komponentas	Pradinė koncentracija / kiekis	Galutinė koncentracija / tūris
Autoklavuotas, distiliuotas vanduo	–	iki 30 μ l
AT buferis	5 \times	1 \times
dNTP mišinys	100 mM	4 mM
Universalus AT pradmuo	20 \times	1 \times
AT fermentų mišinys	10 \times	1 \times
Ligavimo produktas	–	15 μ l

Ketvirtosios reakcijos metu atliekama ankstesniame etape gautos kDNR preamplifikacija. Reakcijos mišinys, kurio sudėtis vienam mėginiui pateikta 2.7 lentelėje, išpilstomas po 45 μ l į kiekvieną mėgintuvėlį ir įdedama po 5 μ l atitinkamo mėginio kDNR. Temperatūrinis režimas: 95 °C – 5 min., 14 ciklų po 95 °C – 3 sek. ir 60 °C – 30 sek., 99 °C – 10 min., 4 °C – ∞ .

2.7 lentelė. kDNR preamplifikacijos reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Komponentas	Pradinė koncentracija / kiekis	Galutinė koncentracija / tūris
Autoklavuotas, distiliuotas vanduo	–	iki 50 µl
miR–Amp reakcijos mišinys	2×	1×
miR–Amp pradmenų mišinys	20×	1×
kDNR	–	5 µl

Paruošti preamplifikuotos kDNR mėginiai iš karto naudojami miRNR raiškos tyrimams kiekybinės PGR (kPGR) metodu arba trumpai (iki tyrimo) saugomi -20 °C temperatūroje.

2.5. MiRNR raiškos tyrimas kiekybinės PGR metodu

Naudojant kPGR metodą įvertinti 14-os miRNR kiekiai: miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-106a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR-195, miR-210, miR-222, miR-223, miR-499a – ir egzogeninės ath-miR159a.

KPGR atliekama *MicroAmpTM Optical 8–Tube Strip* mėgintuvėliuose su *MicroAmpTM Optical 8–Cap Strips dangteliais* arba mėgintuvėlių plokštelėse *MicroAmpTM Fast Optical 96–Well Reaction Plate, 0.1 ml* (visi *Applied BiosystemsTM, Thermo Fisher Scientific*) su optinėmis plėvelėmis *Adhesive sealing film, for qPCR, 50 µm (Nerbeplus)*. Reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui pateikta 2.8 lentelėje (galutinis tūris 20 µl). Amplifikacijai naudojama 10 kartų benukleaziu vandeniui praskiestas kDNR mėginys. Mėginiai centrifuguojami 4000 aps./min greičiu 2 min. (centrifuga – *Universal 320*). Amplifikacijai naudojama *QuantStudioTM 7 Pro Real-Time PCR* sistema (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*). Kiekvienam mėginiui atliekami po du techninius PGR pakartojimus. Kiekvienai tiriamai miRNR paruošiama vandens kontrolinė reakcija (angl. *No template control, NTC*). KPGR reakcijos temperatūrinis režimas: 95 °C – 2min., 50 ciklų po 95 °C – 3 sek. ir 60 °C – 30 sek. Fluorescencija nuskaitoma kiekvieno ciklo pabaigoje.

2.8 lentelė. KPGR reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Komponentas	Pradinė koncentracija / kiekis	Galutinė koncentracija / tūris
Autoklavuotas, distiliuotas vanduo	–	iki 20 µl
<i>TaqPath 1–Step Multiplex Master Mix</i>	4×	1×
<i>TaqMan Advanced MicroRNA Assay</i> pradmenų ir hidrolizės zondų rinkinys (FAM)	20×	0,4×
ROX	1 µM	0,1 µM
kDNR	–	5 µl

kDNR – komplementari DNR.

Gauti duomenys apdorojami *QuantStudio Software v1.3* programa (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*). Fluorescencijos signalas normalizuojamas pagal pasyvios fluorescencijos dažą ROX, amplifikacijos ciklas (angl. *Cycle of quantification, Cq*) nustatomas pagal 0,2 santykinių fluorescencijos vienetų slenkstį (angl. *Threshold*). Tirtų miRNR raiška normalizuota pagal egzogeninę kontrolę ath-miR159a ir konvertuota į santykinius dydžius tiesinėje skalėje naudojant *GenEx v7.0* programą (*MultiD Analyses AB, Geterborgas, Švedija*).

2.6. Statistinė analizė

Statistinei duomenų analizei ir rezultatų vizualizavimui buvo naudojama *GraphPad Prism 9* programinė įranga (*GraphPad Software, San Diegas, JAV*). *Anderson-Darling*, *Kolmogorov-Smirnov* ir *Shapiro-Wilk* kriterijais buvo patikrinta ar duomenys pasiskirstę pagal normalųjį (Gauso) skirstinį. Kadangi duomenų pasiskirstymas neatitiko normaliojo skirstinio, kiekybinių dydžių palyginimui tarp grupių buvo naudojami neparametriniai testai: neporinis *Mann-Whitney U* testas ir porinis *Wilcoxon* testas. Sąsajoms su kiekybiniais klinikiniais ir biocheminiais ligonių rodikliais įvertinti apskaičiuotas *Spearman* koreliacijos koeficientas. Skirtumai ar sąsajos laikyti statistiškai patikimais, esant $p < 0,0500$.

Kiekybinių duomenų sklaida lyginamosiose grupėse pavaizduota dėžutės ir ūsų diagramomis. Jose viršutinė langelio kraštinė atitinka 75% kvartilį, apatinė – 25 % kvartilį, vidurinė linija – medianą, ūsai – didžiausią ir mažiausią reikšmes, taškai – išskirtis. Dviejų dydžių tarpusavio koreliacijos pateiktos taškiniuose grafikuose arba lentelėse.

3. REZULTATAI

Siekiant įvertinti galimus epigenetinius pokyčius, kurie atsiranda dėl CD, buvo analizuojama keturių miRNR raiška pažengusios formos CD1 ir CD2 sergančių ligonių leukocitų mėginiuose (3.1 lentelė). Pirmiausia, miRNR raiškos skirtumai buvo palyginti tarp CD1 ir CD2 bei ASP grupių. Norint nustatyti su CD susijusius miRNR raiškos skirtumus bei įvertinti šių pokyčių dinamiką dėl padidėjusio OS, miRNR raiška iširta leukocitus paveikus 4NQO. Nustatyti miRNR kiekiai palyginti tarpusavyje bei susieti su ligonių klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais rodikliais ir CD komplikacijomis.

Siekiant įvertinti ALA medikamentinio gydymo poveikį, buvo palyginta 14-os miRNR raiškos pokyčiai prieš gydymą (pre-ALA) ir po gydymo ALA (post-ALA) CD ligonių leukocitų mėginiuose. Tirtų miRNR sąrašas pateiktas 3.1 lentelėje.

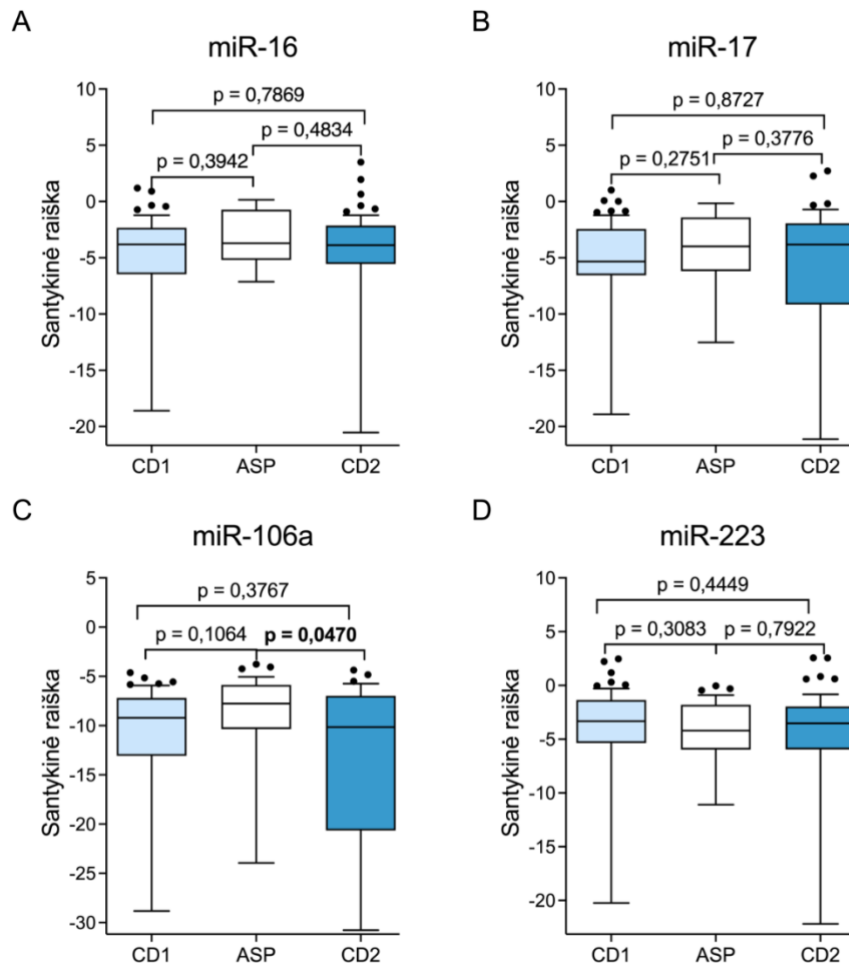
3.1 lentelė. Tirtų miRNR sąrašas.

MiRNR	Visa imtis	ALA gydytų asmenų grupė
	40 CD1, 38 CD2, 21 ASP	3 CD1, 8 CD2
miR-16	+	+
miR-17	+	+
miR-27a	-	+
miR-29a	-	+
miR-106a	+	+
miR-128	-	+
miR-146a	-	+
miR-152	-	+
miR-155	-	+
miR-195	-	+
miR-210	-	+
miR-222	-	+
miR-223	+	+
miR-499a	-	+

CD1 / CD2 – I / II tipo cukrinio diabeto grupė, ASP – asimptomatinių pacientų grupė, ALA – α-lipoine rūgštis, + / - – tirta / netirta miRNR.

3.1. MiRNR raiškos skirtumai cukriniu diabetu sergančių ir sveikų asmenų leukocituose

Pirmiausia, miRNR raiška leukocituose buvo palyginta tarp asmenų, sergančių CD1 ir CD2, ir ASP (3.1 pav.). MiR-106a raiška CD2 leukocituose buvo mažesnė nei ASP, o kitų miRNR atveju nesiskyrė (visi $p > 0,0500$). Tarp CD1 ir ASP bei tarp CD1 ir CD2 grupių tarpusavyje statistiškai patikimų miRNR raiškos skirtumų nenustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.1 pav.).



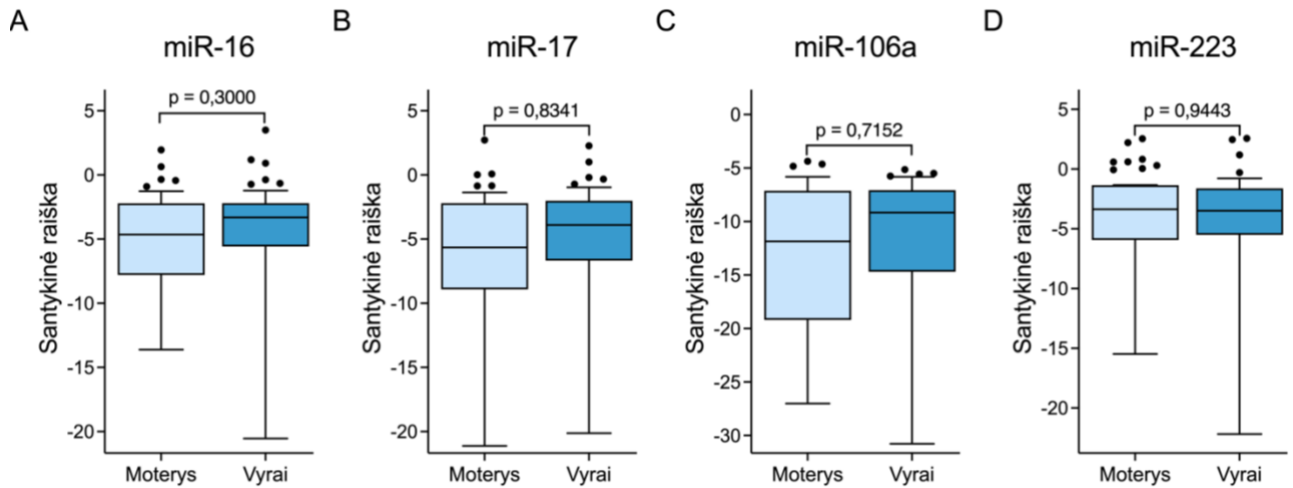
3.1 pav. MiRNR raiškos palyginimas I ir II tipo cukriniu diabetu (CD1 ir CD2) sergančių ligonių ir asimptomatių pacientų (ASP) grupės leukocituose. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

Nors statistiškai patikimų miRNR raiškos skirtumų tarp CD1 ir CD2 ligonių leukocitų nenustatyta, tačiau, atsižvelgiant į skirtingą šių ligų prigimtį ir patogenezę, toliau CD1 ir CD2 grupės buvo analizuojamos atskirai.

3.2. MiRNR raiška I tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų leukocituose

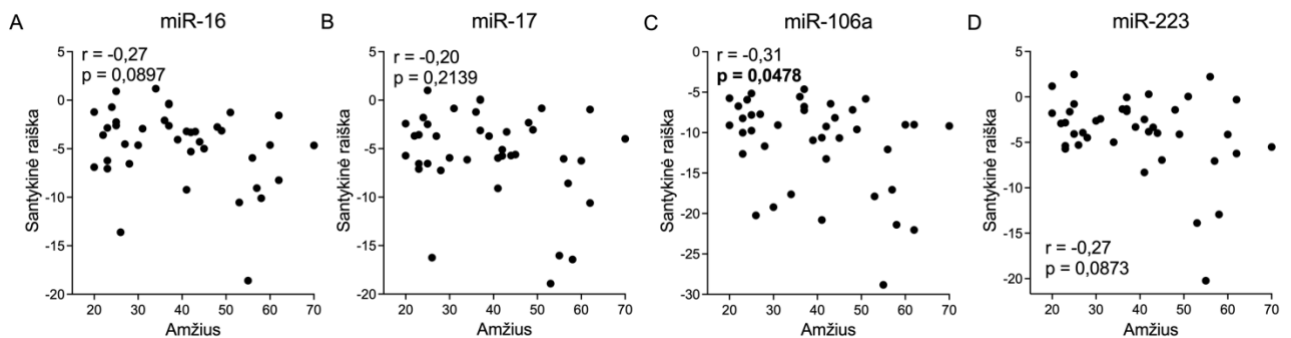
3.2.1. MiRNR raiškos sąsajos su ligonių rodikliais

Pirmiausia miRNR raiška buvo palyginta pagal CD1 ligonių lytį (3.2 pav.). Kadangi statistiškai patikimų skirtumų tarp vyrų ir moterų mėginių nenustatyta (visi $p > 0,0500$), tolimesnėje analizėje pagal lytį sergantieji nebuvo diferencijuojami.



3.2 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių moterų ir vyrų leukocituose. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

MiRNR raišką palyginus su CD1 ligonių amžiumi, nustatyta silpna koreliacija miR-106a atveju ($p = 0,0478$, $r = -0,31$), o kitų miRNR raiška sąsajų neparodė (visi $p > 0,0500$; 3.3 pav.).



3.3 pav. Tirtų miRNR kiekių sąsajos su I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių amžiumi. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

Toliau tirtų miRNR raiška buvo lyginama pagal CD1 ligonių klinikinius, biocheminius ir antropometrinius rodiklius (3.2 lentelė). MiR-17 ir miR-106a raiškos lygis teigiamai koreliavo su bendru cholesterolio kiekiu (atitinkamai $p = 0,0470$, $r = 0,54$ ir $p = 0,0129$, $r = 0,64$). Be to, didesnė miR-17 raiška koreliavo ir su didesne DTL koncentracija ($p = 0,0221$, $r = 0,60$), o miR-106a – su MTL ($p = 0,0186$, $r = 0,62$). Po poveikio 4NQO šių sąsajų nebeliko, tačiau nustatyta koreliacija tarp miR-16 ir bendro cholesterolio kiekio ($p = 0,0371$, $r = 0,56$) ir tarp miR-223 ir sistolinio kraujospūdžio ($p = 0,0295$, $r = -0,34$). Sąsajų su bendra diabeto trukme, diastoliniu kraujospūdžiu ar pulsą nerasta (visi $p > 0,0500$; 3.2 lentelė).

Kai kurių miRNR raiška taip pat koreliavo su įvairiais antropometriniais rodikliais. Didesnė miR-17, miR-106a ir miR-223 raiška buvo susijusi su mažesne CD1 ligonių liemens apimtimi

(atitinkamai $p = 0,0451$, $r = -0,32$; $p = 0,0179$, $r = -0,38$ ir $p = 0,0048$, $r = -0,44$), o miR-106a atveju šis ryšys išliko ir po leukocitų veikimo 4NQO ($p = 0,0478$, $r = -0,32$). Be to, miR-17 raiškos lygis neigiamai koreliavo su klubų apimtimi ($p = 0,0325$, $r = -0,35$). Sąsajų su kaklo apimtimi ar KMI nenustatyta nei vienos tirtos miRNR atveju (visi $p > 0,0500$; 3.2 lentelė).

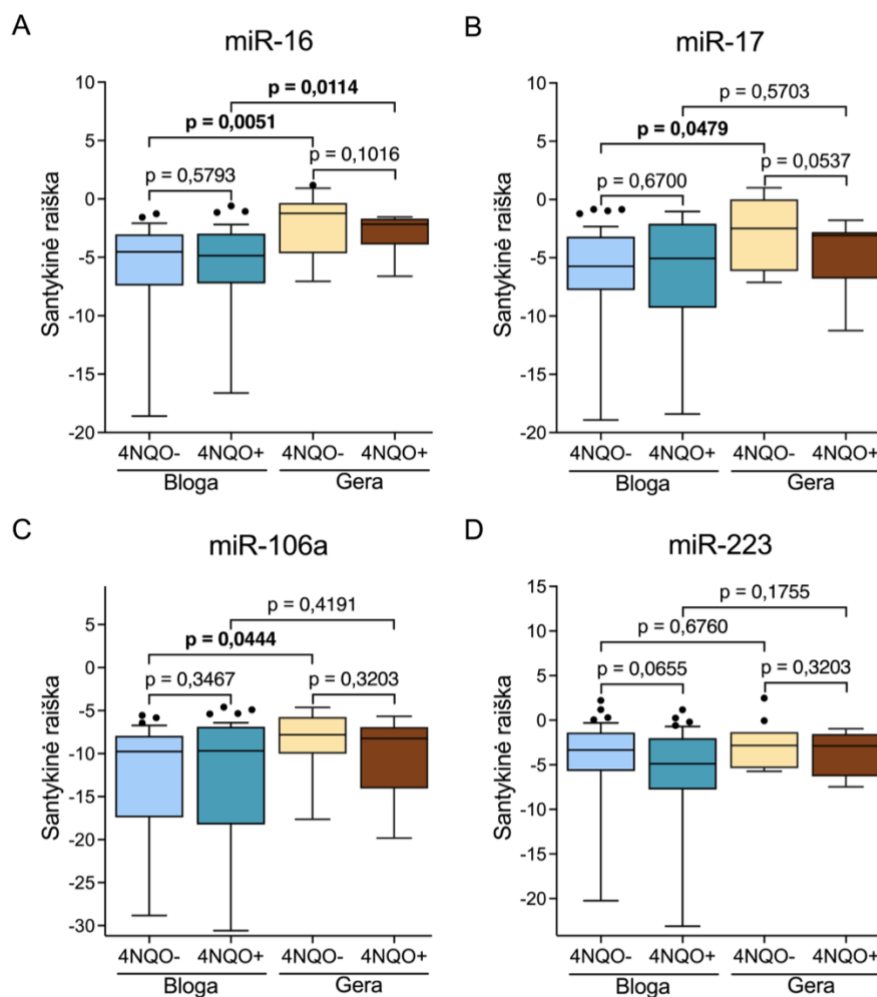
3.2 lentelė. MiRNR raiškos I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose koreliacijos su klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais rodikliais.

Rodiklis		miR-16		miR-17		miR-106a		miR-223	
		4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+
Klinikiniai rodikliai									
Diabeto trukmė	r	-0,20	0,01	-0,11	0,22	-0,23	0,16	-0,02	0,11
	p	0,228	0,9378	0,4934	0,1755	0,1608	0,3269	0,8828	0,5045
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,42	-0,25	-0,25	-0,01	-0,32	-0,07	-0,27	-0,10
	p	0,0116	0,1534	0,1480	0,9608	0,0605	0,6732	0,1217	0,5800
Sistolinis kraujospūdis	r	-0,22	-0,29	-0,22	-0,21	-0,18	-0,2	-0,26	-0,34
	p	0,1808	0,0675	0,175	0,1903	0,2756	0,2079	0,1069	0,0295
Diastolinis kraujospūdis	r	-0,06	-0,07	-0,08	-0,10	-0,02	-0,17	-0,17	-0,17
	p	0,7014	0,6696	0,6362	0,5338	0,8830	0,2886	0,2993	0,3069
Pulsas	r	-0,03	0,04	0,01	0,16	-0,08	0,02	0,04	-0,04
	p	0,8669	0,7937	0,9591	0,3202	0,6380	0,9074	0,8079	0,8111
Biocheminiai rodikliai									
HbA1c konc.	r	-0,07	-0,16	-0,05	0,01	0,01	-0,05	0,13	-0,11
	p	0,7006	0,3587	0,7571	0,9554	0,9332	0,7742	0,4557	0,5242
Kreatinino konc.	r	0,08	0,21	0,02	0,20	0,07	0,30	0,03	0,21
	p	0,6244	0,1941	0,9176	0,2186	0,677	0,0604	0,8558	0,207
GFG	r	0,04	-0,03	0,06	-0,10	0,06	-0,17	0,14	-0,04
	p	0,8167	0,8549	0,6961	0,5392	0,7327	0,3063	0,3987	0,8002
Cholesterolio konc.	r	0,53	0,56	0,54	0,34	0,64	0,18	0,09	0,42
	p	0,0514	0,0371	0,0470	0,2398	0,0129	0,5325	0,7593	0,1351
Trigliceridų konc.	r	0,28	0,36	0,24	0,14	0,22	0,08	-0,10	0,39
	p	0,3293	0,211	0,4001	0,6311	0,4405	0,7878	0,725	0,1687
DTL konc.	r	0,43	0,08	0,60	0,20	0,31	0,13	0,21	0,12
	p	0,1263	0,7938	0,0221	0,5028	0,2809	0,6586	0,4738	0,6917
MTL konc.	r	0,45	0,55	0,42	0,29	0,62	0,16	0,09	0,38
	p	0,1022	0,0408	0,1306	0,3105	0,0186	0,5942	0,7593	0,1854
Antropometriniai rodikliai									
KMI	r	-0,08	-0,11	-0,14	-0,10	-0,22	-0,15	-0,15	-0,12
	p	0,6158	0,5013	0,3756	0,5225	0,1763	0,3408	0,3516	0,4769
Liemens apimtis	r	-0,28	-0,28	-0,32	-0,25	-0,38	-0,32	-0,44	-0,31
	p	0,0885	0,0868	0,0451	0,1308	0,0179	0,0478	0,0048	0,0557
Klubų apimtis	r	-0,3	-0,21	-0,25	-0,23	-0,35	-0,20	-0,29	-0,16
	p	0,0680	0,2102	0,1344	0,1625	0,0325	0,2233	0,075	0,3361
Kaklo apimtis	r	-0,13	-0,03	-0,14	0,01	-0,19	-0,01	-0,25	-0,02
	p	0,4312	0,8573	0,4143	0,9642	0,2613	0,9737	0,1318	0,8977

4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. KMI – kūno masės indeksas, HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, GFG – glomerulų filtracijos greitis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, konc. – koncentracija, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.2.2. MiRNR raiškos sąsajos su glikemijos kontrole

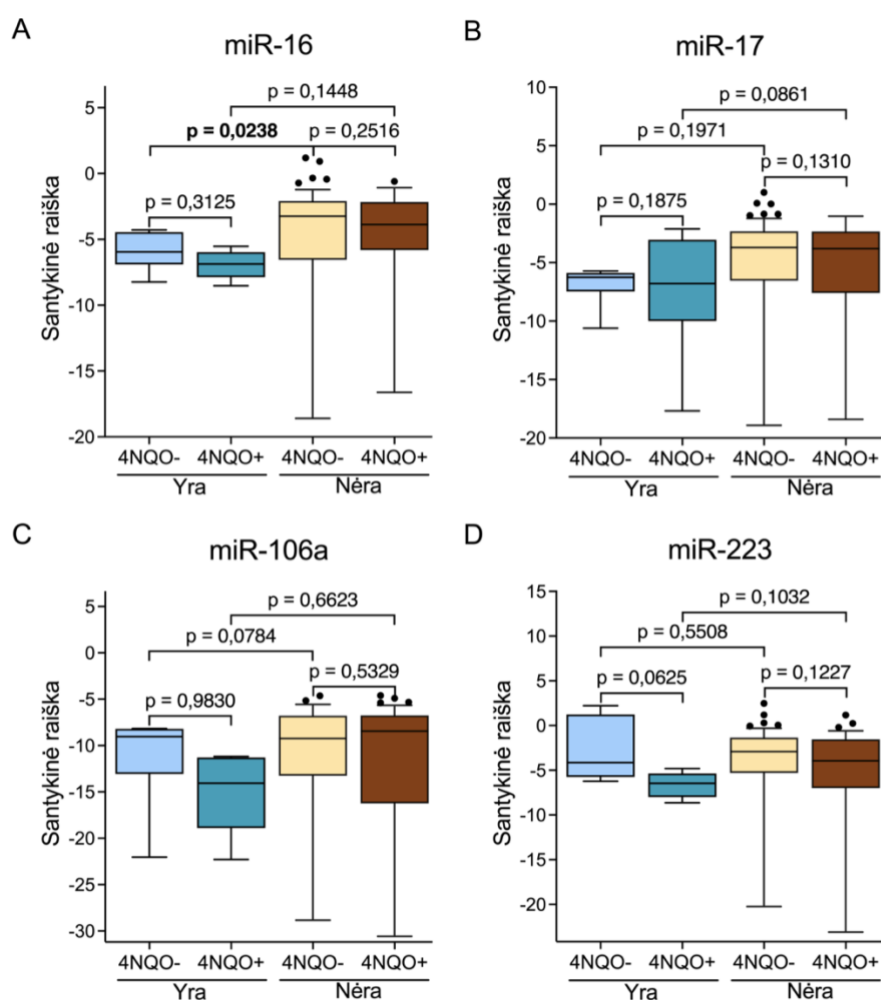
MiRNR raiška buvo palyginta pagal glikemijos kontrolę ir susieta su ligos kontrolės rodikliu, Hb1Ac koncentracija. MiR-16 raiška, esant blogai ligos kontrolei palyginus su gera, buvo mažesnė tiek neveiktuose leukocituose, tiek ir po poveikio 4NQO (atitinkamai $p = 0,0051$ ir $p = 0,0114$), nors veikimas 4NQO raiškos pokyčių nesukėlė nei vienoje grupėje (abu $p > 0,0500$; 3.4 pav.). Be to, mažesnė miR-16 raiška 4NQO neveiktuose leukocituose koreliavo su ilgesne blogos glikemijos kontrolės trukme ($p = 0,0116$, $r = -0,42$; 3.2 lentelė). MiR-17 ir miR-106a raiškos skirtumai tarp atvejų su bloga ir gera ligos kontrole buvo nustatyti tik 4NQO neveiktuose leukocituose (atitinkamai $p = 0,0479$ ir $p = 0,0444$; 3.4 pav.) ir raiškos lygis su blogos glikemijos kontrolės trukme nekoreliavo (abu $p > 0,0500$; 3.2 lentelė). MiR-223 raiškos lygis su ligos kontrole nebuvo susijęs (visi $p > 0,0500$). Sąsajų su Hb1Ac koncentracija nenustatyta nei vienos tirtos miRNR atveju (3.2 lentelė).



3.4 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal glikemijos kontrolę. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos

3.2.3. MiRNR raiškos sąsajos su ligos komplikacijomis
 3.2.3.1. MiRNR raiškos sąsajos su inkstų patologijomis

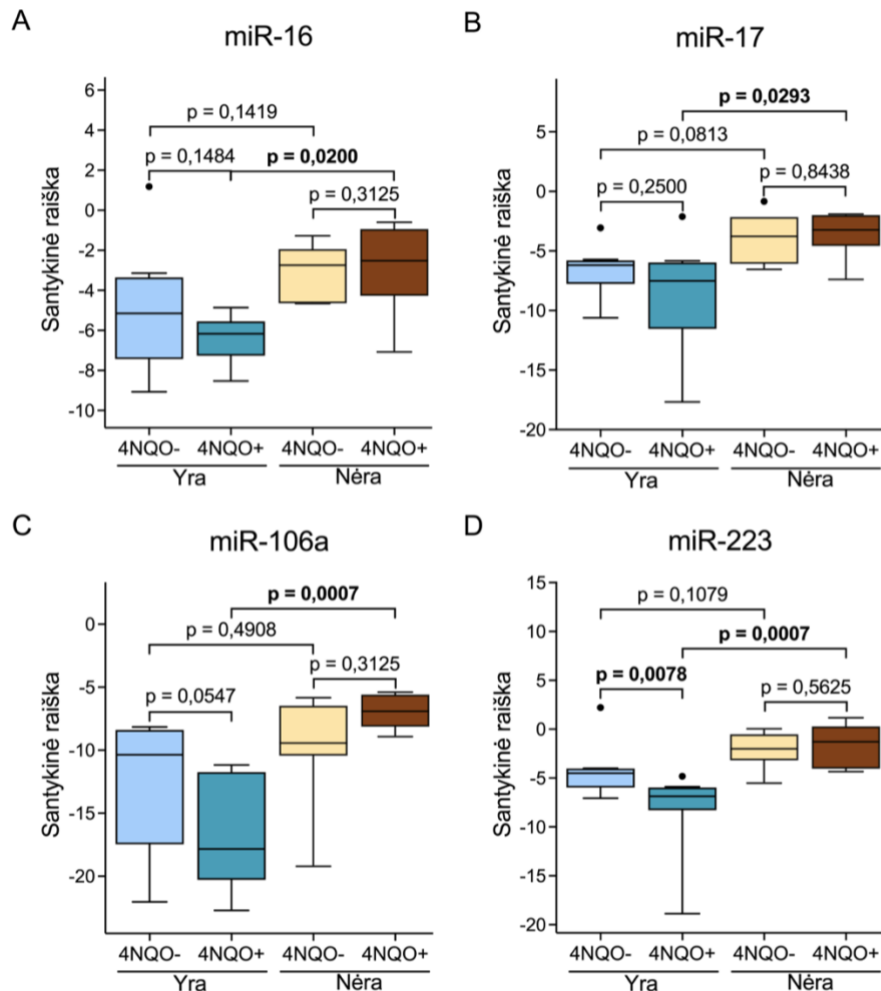
Tirtų miRNR raiška buvo palyginta su CD1 sukeltomis inkstų patologijomis: LIL ir nefropatija. Nors nei vienos miRNR raiška su inkstų funkcijos sutrikimus parodančiais biocheminiais rodikliais (kreatinino koncentracija ir GFG) nekoreliavo (3.2 lentelė), miR-16 raiškos lygis leukocituose buvo mažesnis esant LIL nei neturint šios patologijos ($p = 0,0238$; 3.5 pav.). MiR-223 atveju stebėta silpna 4NQO poveikio leukocitams tendencija, esant LIL diagnozei, tačiau ši sąsaja nebuvo statistiškai patikima ($p > 0,0500$). MiR-17 ir miR-106a raiškos sąsajų su šio komplikacija nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.5 pav.).



3.5 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal lėtinės inkstų ligos (LIL) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusios komplikacijos. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

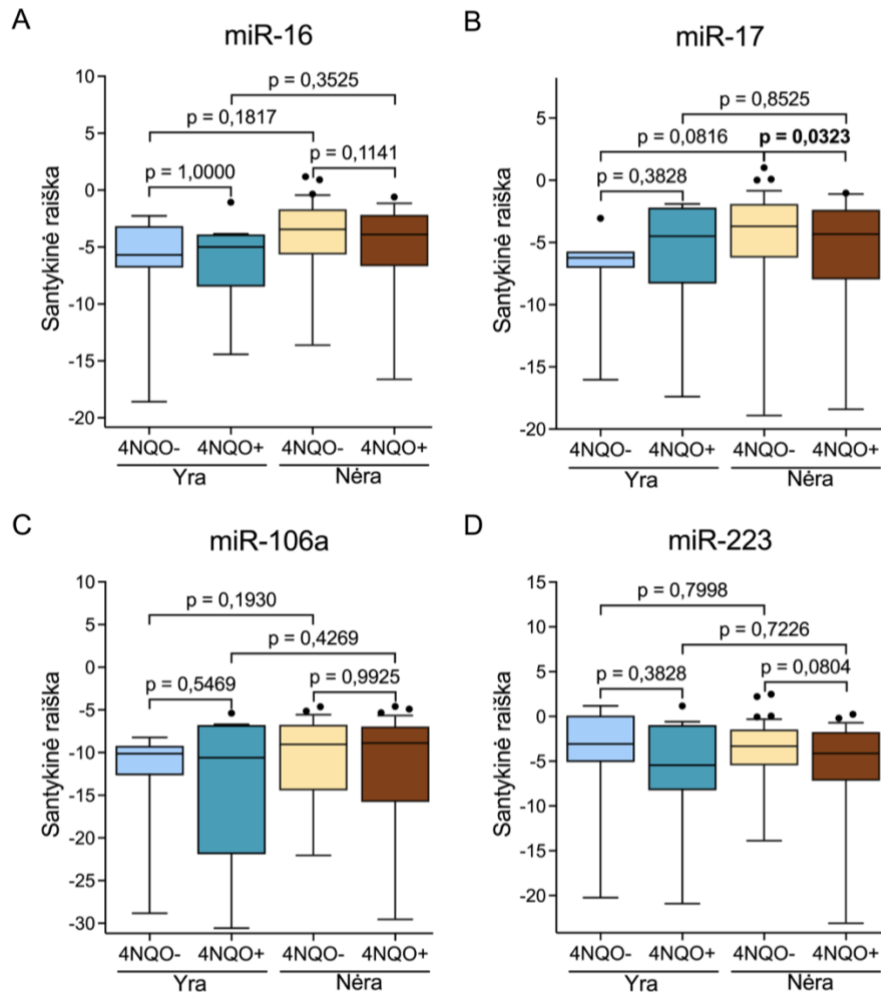
Visų tirtų miRNR raiška leukocituose po poveikio 4NQO buvo mažesnė esant nefropatijai nei neturint šios komplikacijos ($p = 0,0200$, $p = 0,0293$, $p = 0,0007$ ir $p = 0,0007$ atitinkamai miR-16,

miR-17, miR-160a ir miR-223), tačiau analogiškų skirtumų tarp 4NQO neveiktų leukocitų nenustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.6 pav.). Nefropatiją turinčių CD1 ligonių grupėje poveikis 4NQO sukėlė miR-223 raiškos sumažėjimą ($p = 0,0078$, 3.6 pav. D).



3.6 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal nefropatijos pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusios komplikacijos. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

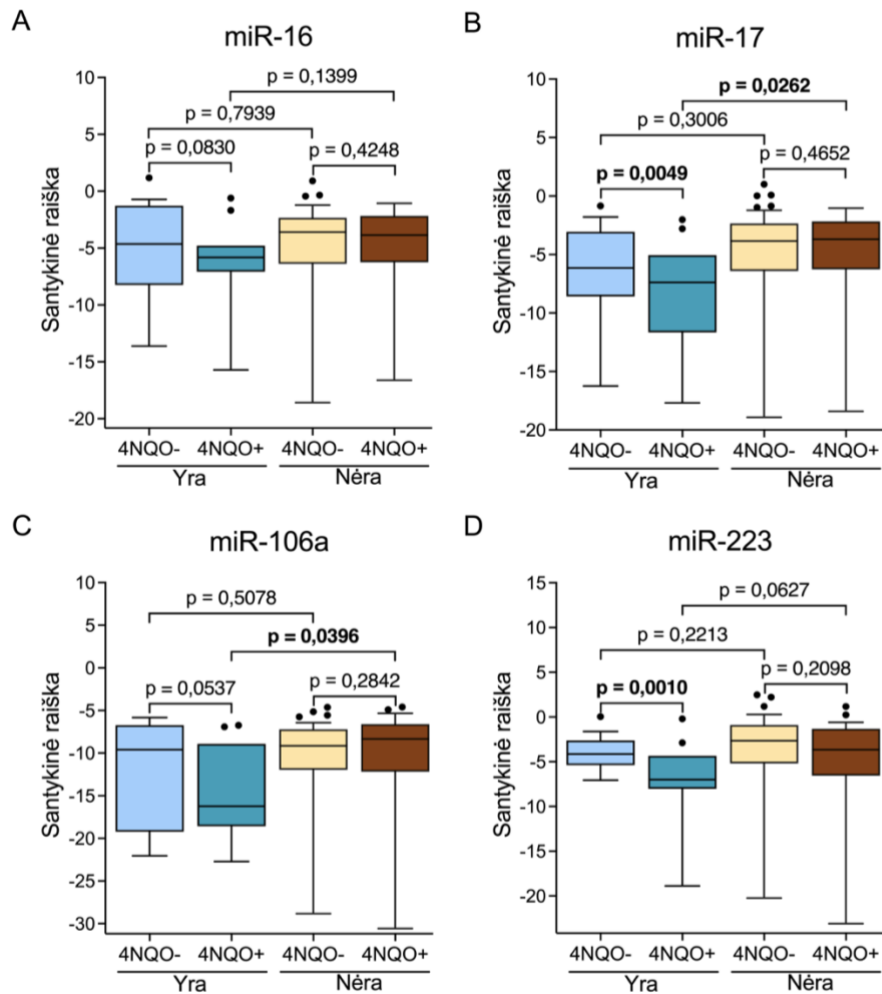
Toliau miRNR raiška buvo palyginta pagal ketoacidozės pasireiškimą (3.7 pav.), kuri laikoma vienu iš pagrindinių inkstų komplikacijų rizikos veiksnių. Statistiškai patikimų skirtumų tarp šią komplikaciją turinčių ir jos neturinčių atvejų nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$), tačiau 4NQO poveikis sukėlė miR-17 raiškos sumažėjimą ketoacidozės neturinčių CD1 ligonių grupėje ($p = 0,0323$; 3.7 pav. B).



3.7 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal ketoacidozės pasireišimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.2.3.2. MiRNR raiškos sąsajos su širdies ir kraujagyslių sistemos patologijomis

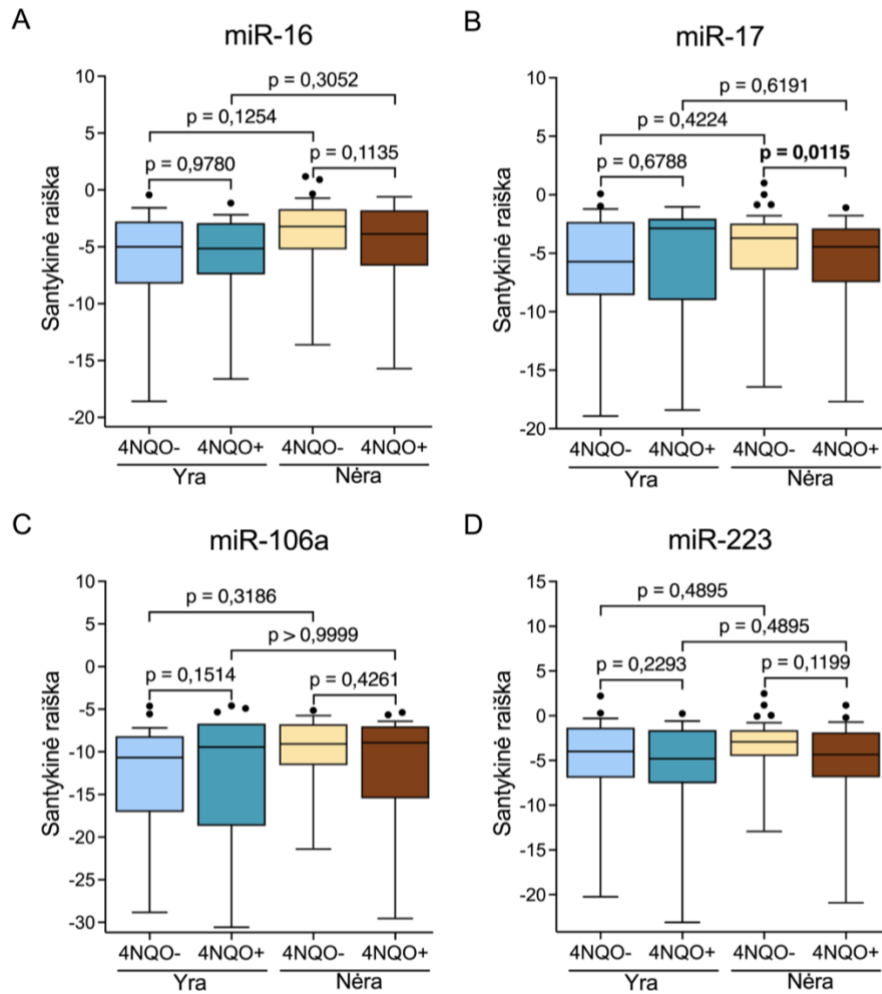
Tirtų miRNR raiška buvo palyginta su AŠN ir PAH komplikacijų pasireišimu. Nors miRNR skirtumų tarp CD1 atvejų su ir be AŠN nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$), po poveikio 4NQO miR-17 ir miR-106a raiška buvo mažesnė CD1 ligonių su pasireiškusia AŠN leukocituose, nei neturėjusių šios patologijos (atitinkamai $p = 0,0262$ ir $p = 0,0396$, 3.8 pav.). Be to, AŠN atveju 4NQO poveikis buvo susijęs su miR-17 ir miR-223 raiškos sumažėjimu (atitinkamai $p = 0,0049$ ir $p = 0,0010$, 3.8 pav. B ir C).



3.8 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal autonominės širdies neuropatijos (AŠN) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

MiRNR raiška taip pat buvo palyginta pagal PAH pasireiškimą, bet statistškai patikimų skirtumų tarp CD1 ligonių su ir be šios komplikacijos nerasta (visi $p > 0,0500$; 3.9 pav.). Tačiau pastarojoje ligonių grupėje (be PAH) nustatyta, kad 4NQO poveikis reikšmingai sumažino miR-17 raišką ($p = 0,0115$; 3.9 pav. B).

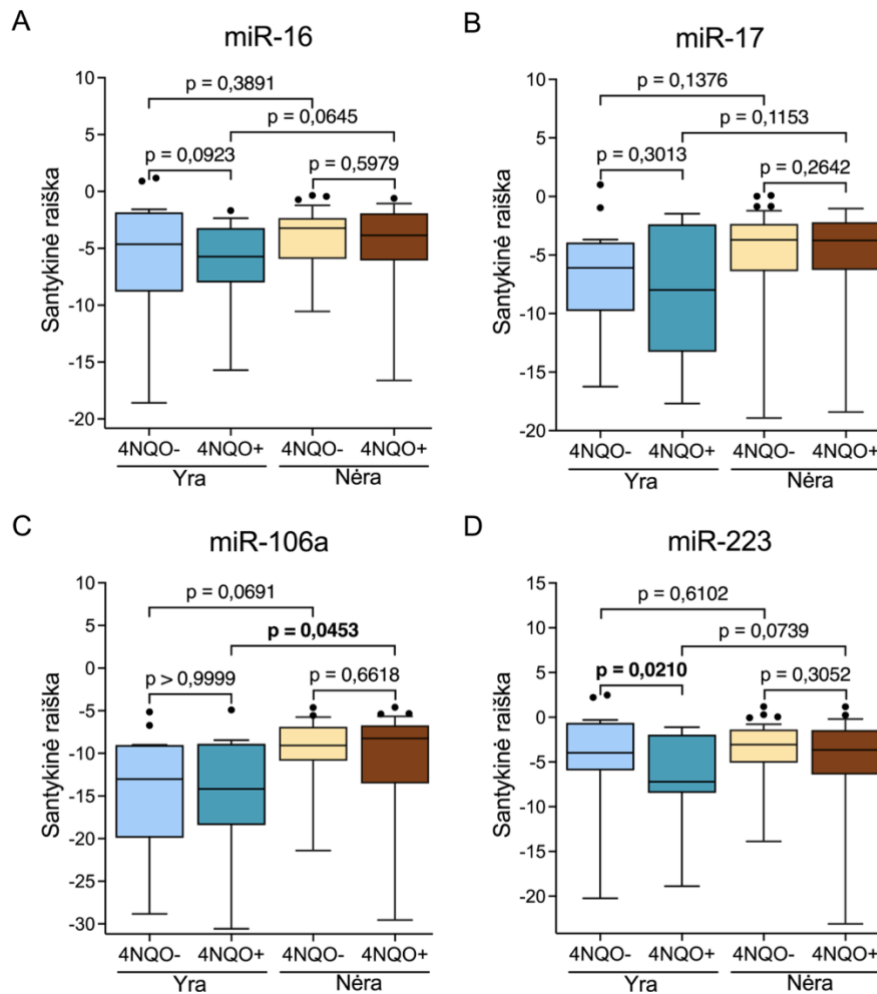
Kai kuriems iš CD1 grupės ligonių buvo nustatyta ir IŠL ar ŠN diagnozė, tačiau dėl mažo atvejų skaičiaus palyginamosiose subgrupėse sąsajos su miRNR raiška nebuvo analizuojamos.



3.9 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal pirminės arterinės hipertenzijos (PAH) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksido veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.2.3.3. MiRNR raiškos sąsajos su periferinių nervų patologija

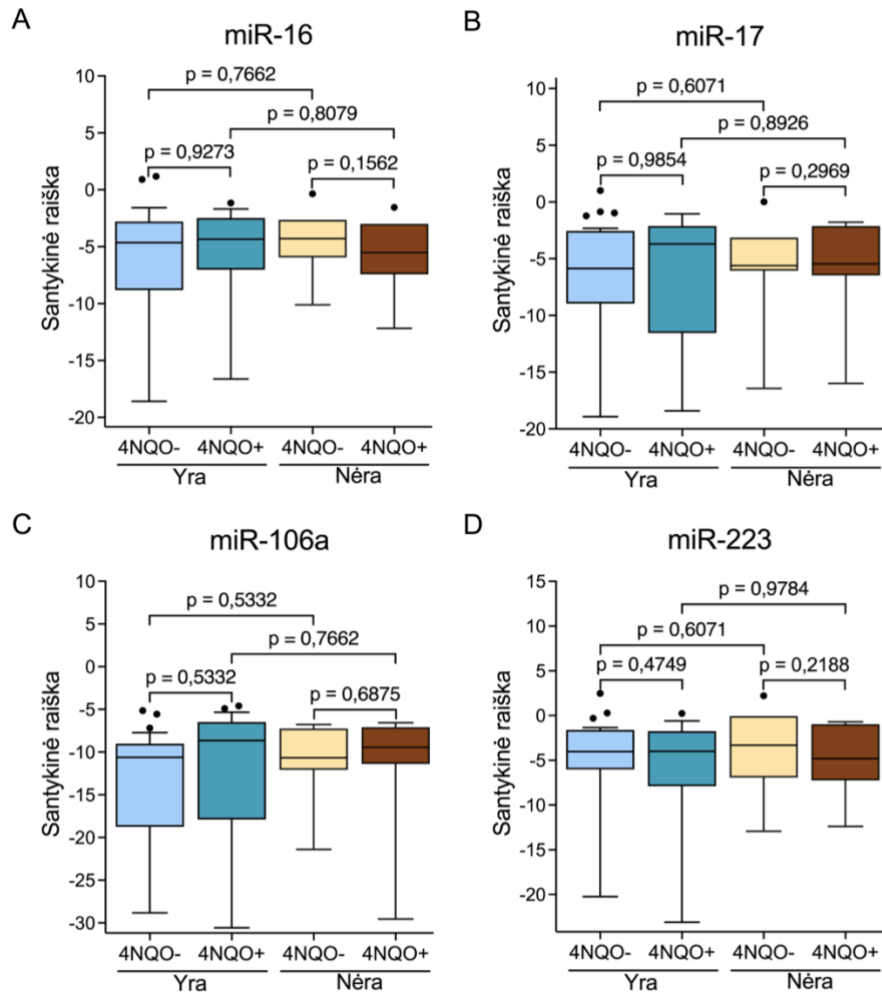
Tirtų miRNR raiškos skirtumų CD1 ligonių mėginiuose pagal neuropatijos pasireiškimą nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$), tačiau leukocitus paveikus 4NQO miR-106a raiška buvo mažesnė esant šiai komplikacijai nei jos neturint ($p = 0,0453$). Be to, neuropatiją turinčių ligonių atveju 4NQO poveikis buvo susijęs su miR-223 raiškos slopinimu ($p = 0,0210$, 3.10 pav. D).



3.10 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal neuropatijos pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusios komplikacijos. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.2.3.4. MiRNR raiškos sąsajos su akies tinklainės patologija

CD1 grupėje palyginus miRNR raišką pagal retinopatijos pasireiškimą, statistiškai patikimų skirtumų nė vienos miRNR atveju nenustatyta (visi $p > 0,0500$, 3.11 pav.).

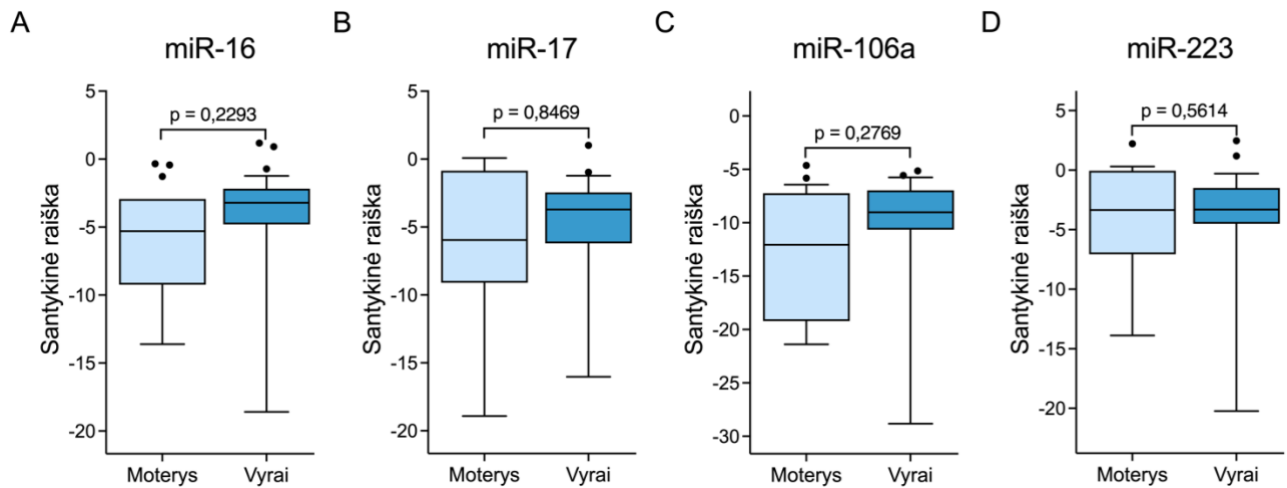


3.11 pav. MiRNR raiškos palyginimas I tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal retinopatijos pasireišimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

3.3. MiRNR raiška II tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų leukocituose

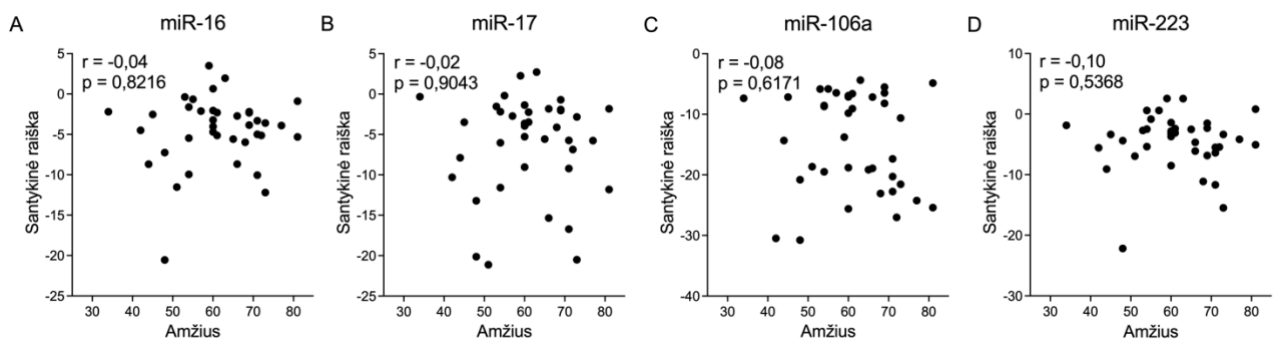
3.3.1. MiRNR raiškos sąsajos su ligonių rodikliais

Atitinkamai kaip ir CD1 grupėje, miRNR raiška CD2 sergančių asmenų leukocituose pirmiausia buvo palyginta pagal lytį (visi $p > 0,0500$; 3.12 pav.). Nenustačius statistiškai patikimų miRNR raiškos skirtumų, tolimesnėje analizėje pagal lytį sergantieji nebuvo diferencijuojami.



3.12 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių moterų ir vyrų leukocituose. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. Santykinė miRNR raiška pateikta \log_2 skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

MiRNR raišką palyginus su CD2 ligonių amžiumi, patikimų sąsajų taip pat nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.13 pav.).



3.13 pav. Tirtų miRNR kiekių sąsajos su II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių amžiumi. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Santykinė miRNR raiška pateikta \log_2 skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

Toliau tirtų miRNR raiška buvo palyginta su klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais CD2 ligonių rodikliais (3.3 lentelė). 4NQO neveikuose leukocitų mėginiuose miRNR raiškos sąsajų su analizuotais rodikliais nebuvo nustatyta. Buvo stebima silpna teigiama tendencija tarp miR-16 raiškos lygio ir KMI reikšmės, tačiau sąsaja nebuvo statistškai patikima ($p = 0,0532$, $r = 0,32$). Po poveikio 4NQO miR-17 raiška leukocituose teigiamai koreliavo su diabeto trukme ($p = 0,0492$, $r = 0,32$; 3.3 lentelė).

3.3 lentelė. MiRNR raiškos II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose koreliacijos su klinikiniais, biocheminiais ir antropometriniais rodikliais.

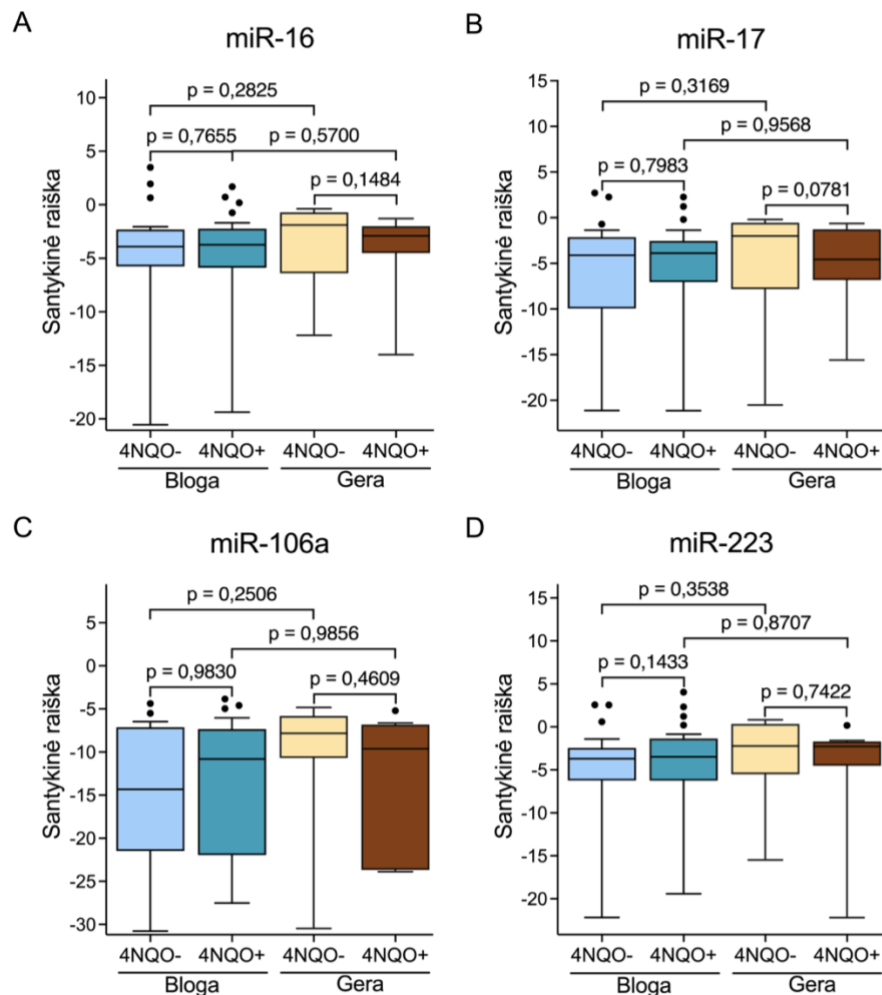
Rodiklis		miR-16		miR-17		miR-106a		miR-223	
		4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+	4NQO-	4NQO+
Klinikiniai rodikliai									
Diabeto trukmė	r	-0,04	0,16	0,07	0,32	0,05	0,14	0,08	0,25
	p	0,7888	0,3379	0,6939	0,0492	0,7843	0,4182	0,6293	0,1228
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,13	0,06	-0,12	0,26	-0,14	0,07	-0,13	0,16
	p	0,4456	0,7402	0,496	0,1226	0,4207	0,6601	0,4391	0,3572
Sistolinis kraujospūdis	r	-0,17	-0,13	-0,05	0,03	-0,07	0,05	-0,16	0,00
	p	0,3210	0,4417	0,7860	0,8597	0,6627	0,7749	0,3372	0,9879
Diastolinis kraujospūdis	r	0,10	-0,16	0,11	-0,10	0,02	0,11	0,16	-0,05
	p	0,5523	0,324	0,5271	0,5649	0,9113	0,5115	0,3433	0,7576
Pulsas	r	0,14	-0,20	0,12	-0,13	0,12	-0,11	0,06	-0,31
	p	0,3942	0,2256	0,4895	0,4402	0,4833	0,5008	0,7227	0,0541
Biocheminiai rodikliai									
HbA1c konc.	r	-0,12	-0,36	-0,11	-0,24	-0,28	-0,08	-0,23	-0,27
	p	0,4991	0,0425	0,5508	0,1801	0,1168	0,6443	0,2010	0,1287
Kreatinino konc.	r	0,02	0,12	-0,08	0,02	-0,15	0,02	-0,09	-0,06
	p	0,8910	0,4632	0,6307	0,8967	0,3810	0,9200	0,6089	0,7088
GFG	r	0,00	-0,25	0,18	-0,18	0,1	-0,12	0,07	-0,05
	p	0,9811	0,1248	0,2836	0,2773	0,5385	0,491	0,6819	0,7882
Cholesterolio konc.	r	-0,04	0,34	0,10	0,17	-0,08	0,01	-0,14	0,21
	p	0,8970	0,2756	0,7456	0,5868	0,8122	0,9828	0,6646	0,5128
Trigliceridų konc	r	-0,06	-0,13	0,02	-0,07	-0,31	-0,10	-0,10	0,00
	p	0,8629	0,6967	0,9484	0,829	0,3191	0,7456	0,7456	1,0000
DTL konc.	r	0,41	0,52	0,28	0,07	0,49	0,16	0,18	0,01
	p	0,1908	0,0849	0,3786	0,8290	0,1063	0,6175	0,5717	0,9656
MTL konc.	r	-0,13	0,32	0,04	0,20	-0,08	-0,03	-0,21	0,21
	p	0,6967	0,3079	0,8970	0,5273	0,8122	0,9141	0,5128	0,5128
Antropometriniai rodikliai									
KMI	r	0,32	0,06	0,26	0,18	0,02	0,03	0,28	0,13
	p	0,0532	0,7195	0,1154	0,2691	0,9019	0,8571	0,0927	0,4291
Liemens apimtis	r	0,15	0,12	0,18	0,27	-0,07	0,12	0,07	0,21
	p	0,3705	0,4851	0,2881	0,1029	0,6949	0,4613	0,6604	0,1979
Klubų apimtis	r	0,16	-0,06	0,13	0,13	-0,13	0,05	0,13	0,11
	p	0,3534	0,7326	0,4331	0,434	0,4452	0,7613	0,4547	0,5386
Kaklo apimtis	r	0,17	0,09	0,24	0,06	-0,07	0,04	0,05	0,14
	p	0,3171	0,5969	0,1667	0,7383	0,7045	0,8259	0,7707	0,4351

4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. KMI – kūno masės indeksas, HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, GFG – glomerulų filtracijos greitis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, konc. – koncentracija, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.3.2. MiRNR raiškos sąsajos su glikemijos kontrole

MiRNR raiška buvo palyginta pagal glikemijos būseną. Sąsajų su ligos kontrolės statusu ar blogos glikemijos kontrolės trukme nenustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.14 pav. ir 3.3 lentelė), tačiau miR-16 raiška po 4NQO poveikio neigiamai koreliavo su HbA1c koncentracija ($p = 0,0425$, $r = -$

0,36; 3.3 lentelė). Be to, panašiai kaip ir CD1 grupėje, esant gerai glikemijos kontrolei CD2 leukocituose stebėta silpna miR-17 raiškos sumažėjimo tendencija paveikus 4NQO, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai patikimas ($p > 0,0500$; 3.14 pav. B).

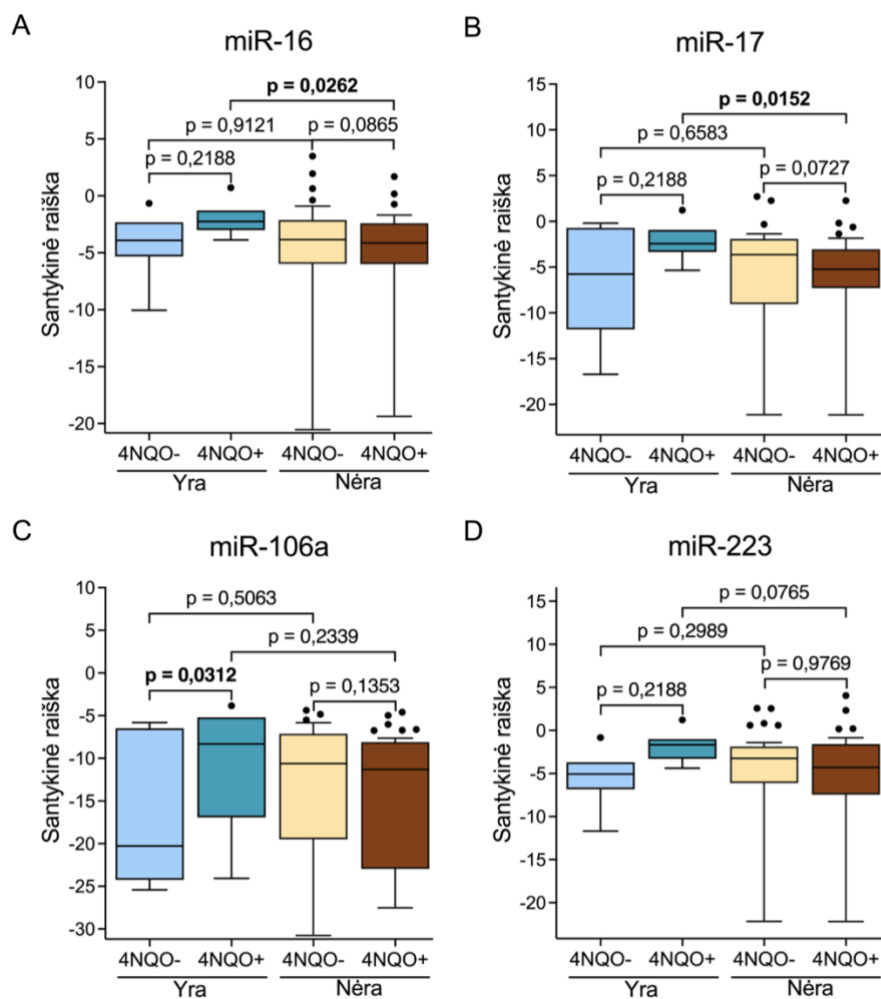


3.14 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal glikemijos kontrolę. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Santykinė miRNR raiška pateikta \log_2 skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

3.3.3. MiRNR raiškos sąsajos su ligos komplikacijomis

3.3.3.1. MiRNR raiškos sąsajos su inkstų patologijomis

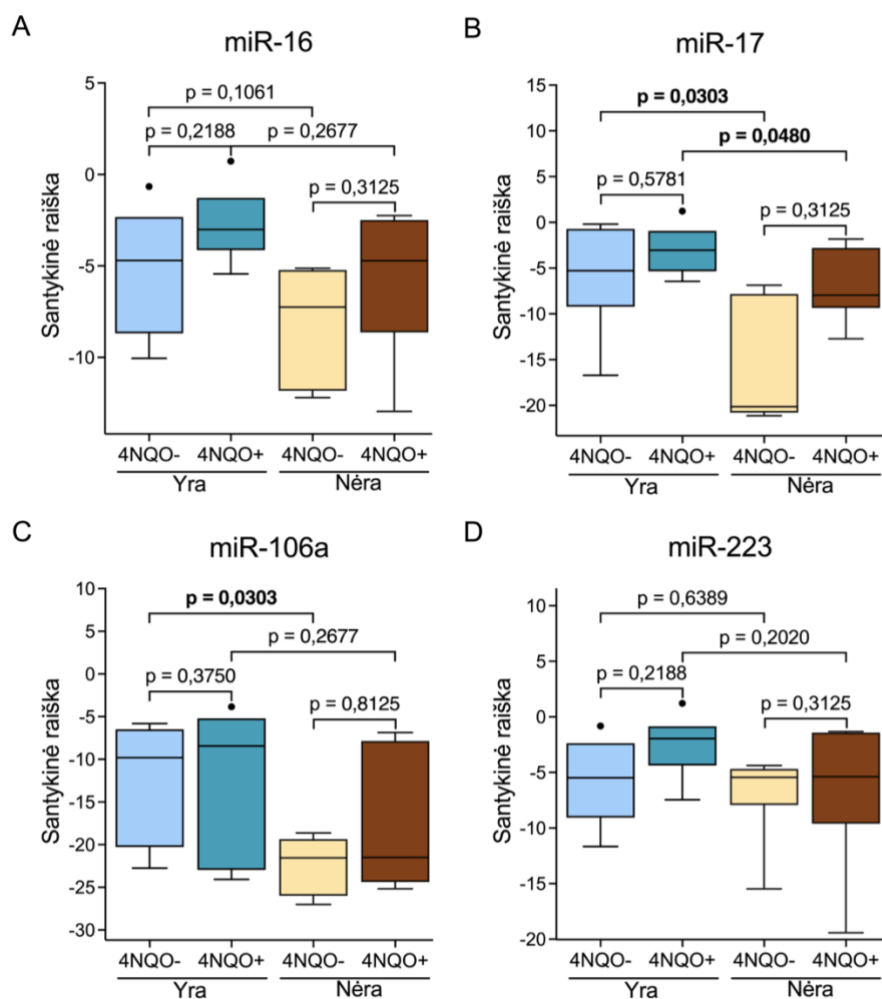
Tirtų miRNR raiška buvo palyginta su CD2 sukelta LIL ir nefropatija. Nei vienos tirtos miRNR raiška su kreatinino koncentracija ar GFG nekoreliavo (3.3 lentelė), tačiau esant LIL 4NQO poveikis buvo susijęs su miR-106a raiškos padidėjimu ($p = 0,0312$, 3.15 pav.). Palyginus 4NQO veiktus leukocitus tarp CD2 atvejų su ir be LIL diagnozės, nustatyta didesnė miR-16 ir miR-17 raiška turinčių šią patologiją ligonių grupėje (atitinkamai $p = 0,0262$ ir $p = 0,0152$). Be to, silpna analogiška tendencija stebėta ir miR-223 atveju ($p > 0,0500$; 3.15 pav.).



3.15 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal lėtinės inkstų ligos (LIL) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

MiR-17 ir miR-106a raiška buvo didesnė esant nefropatijai, nei neturint šios komplikacijos (abu $p = 0,0303$, 3.16 pav.), tačiau analogiški skirtumai tarp 4NQO paveiktų leukocitų nustatyti tik miR-17 atveju ($p = 0,0480$). MiR-16 ir miR-223 raiška su nefropatija nebuvo susijusi (visi $p > 0,0500$; 3.16 pav.).

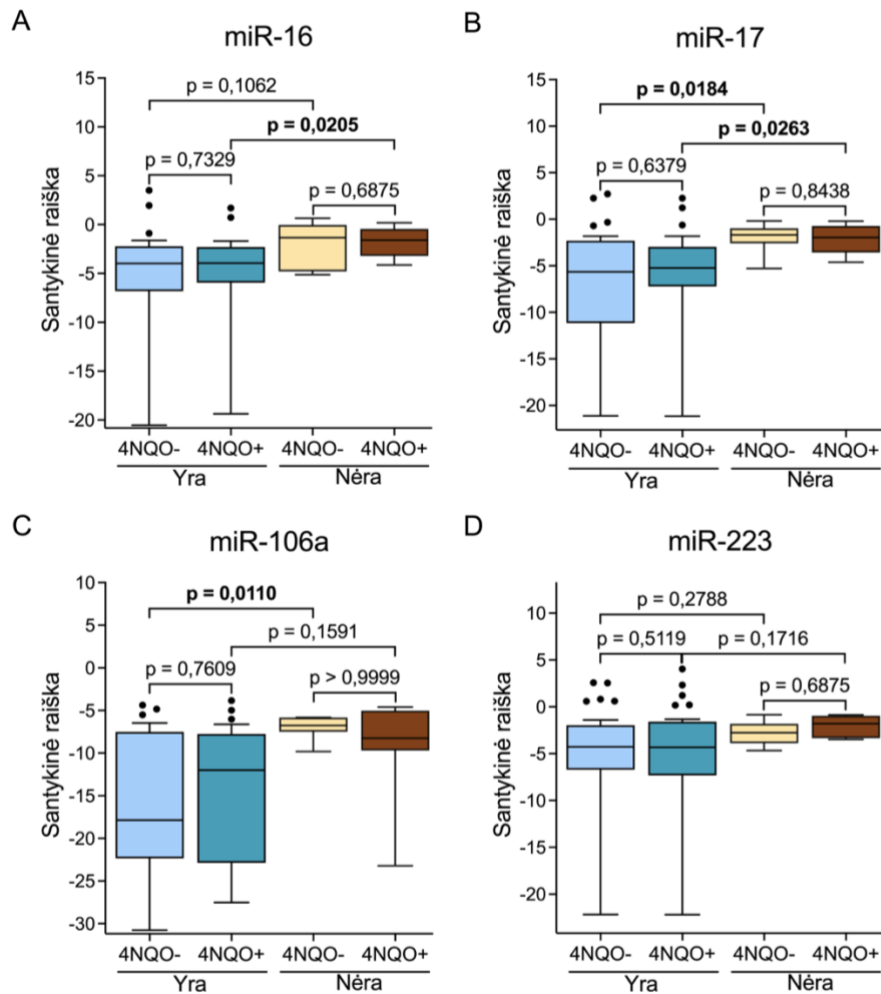
Vienam iš CD2 grupės ligonių buvo nustatyta ir ketoacidozė, tačiau dėl per mažo atvejų skaičiaus palyginamosiose subgrupėse sąsajos su miRNR raiška nebuvo analizuojamos.



3.16 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal nefropatijos pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

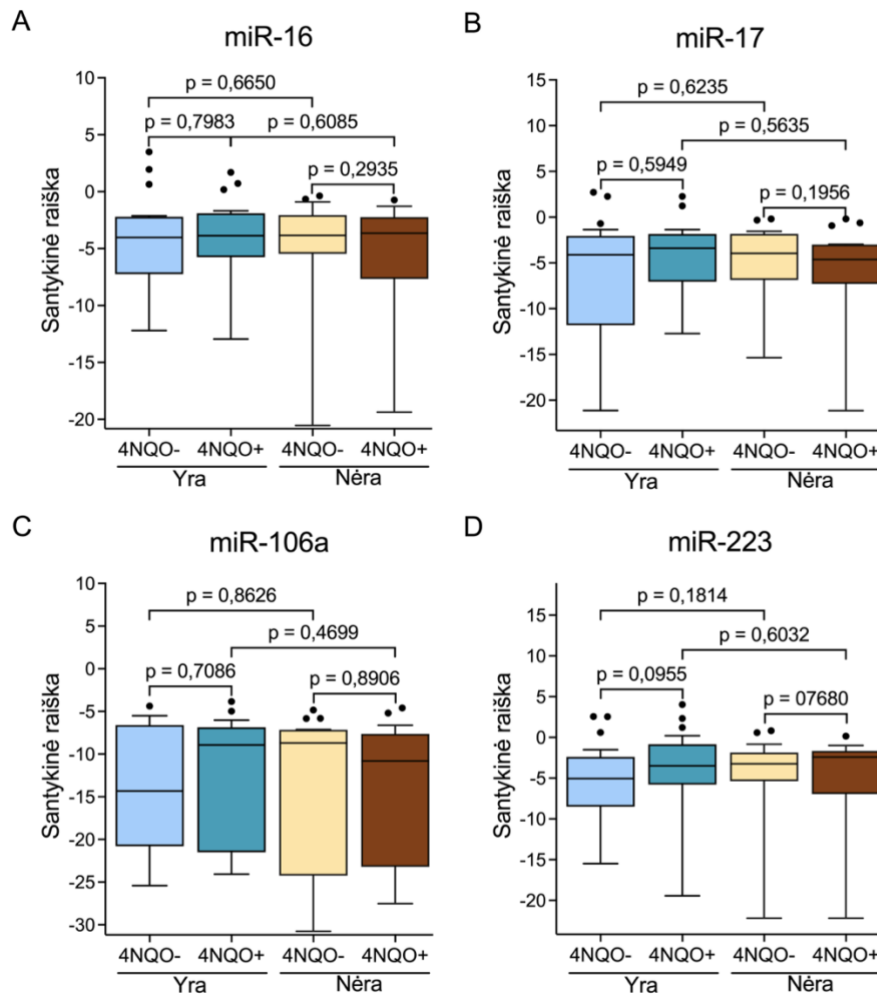
3.3.3.2. MiRNR raiškos sąsajos su širdies ir kraujagyslių patologijomis

Tirtų miRNR raiška buvo palyginta su CD2 sukeltomis širdies ir kraujagyslių patologijomis: PAH, AŠN, IŠL ir ŠN. Nors nei vienos miRNR raiška su širdies funkcijos sutrikimus parodančiais klinikiniais rodikliais (sistoliniu ir diastoliniu kraujospūdžiu ir pulsu) nekoreliavo (3.3 lentelė), miR-17 ir miR-106a raiška leukocituose buvo mažesnė esant PAH nei neturint šios patologijos (atitinkamai $p = 0,0184$ ir $p = 0,0110$), o miR-17 atveju tokia sąsaja buvo nustatyta ir po poveikio 4NQO ($p = 0,0263$; 3.17 pav.). Be to, leukocitus paveikus 4NQO, analogiškas skirtumas nustatytas ir miR-16 atveju ($p = 0,0205$). MiR-223 raiška su šia komplikacija nebuvo susijusi (visi $p > 0,0500$; 3.17 pav.).



3.17 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal pirminės arterinės hipertenzijos (PAH) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksido veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

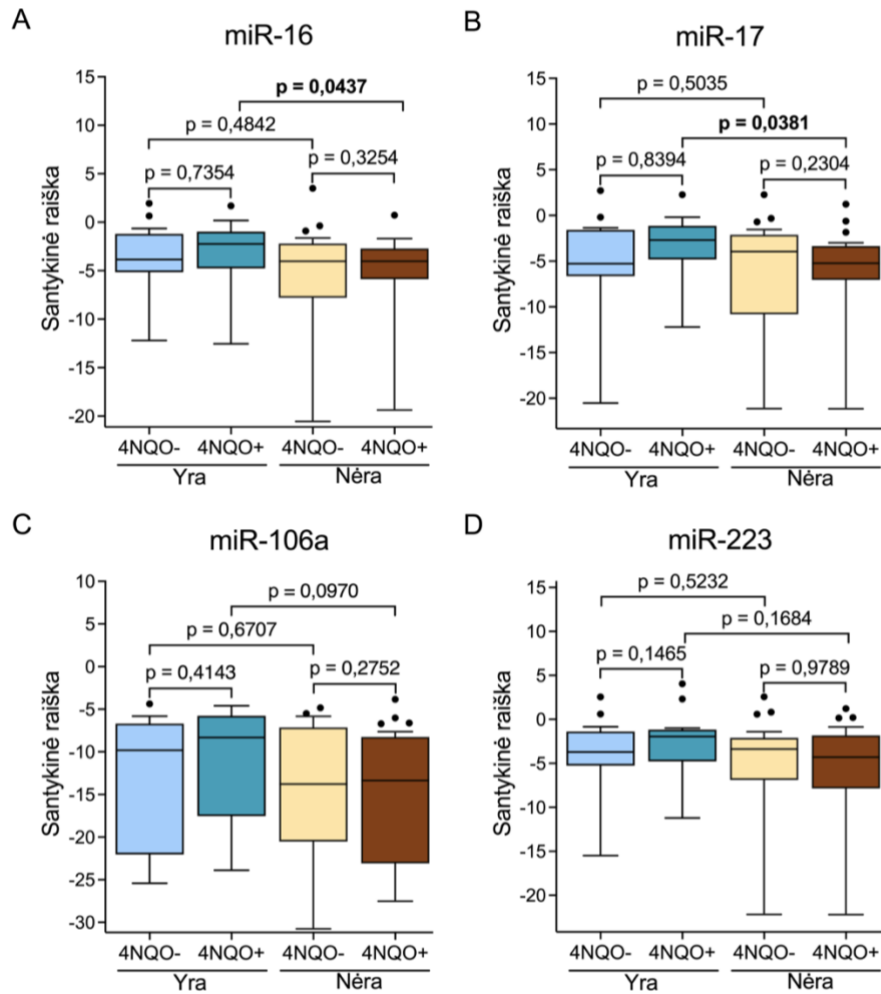
MiRNR raiška taip pat buvo palyginta su AŠN, tačiau, priešingai nei CD1 atveju, CD2 ligonių leukocituose miRNR raiškos skirtumų pagal šią diagnozę nenustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.18 pav.). Tirtų miRNR raiška su IŠL ir ŠN pasireiškimu taip pat nebuvo susijusi (visi $p > 0,0500$; 1 ir 2 priedai).



3.18 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal autonominės širdies neuropatijos (AŠN) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

3.3.3.3. MiRNR raiškos sąsajos su periferinių nervų patologija

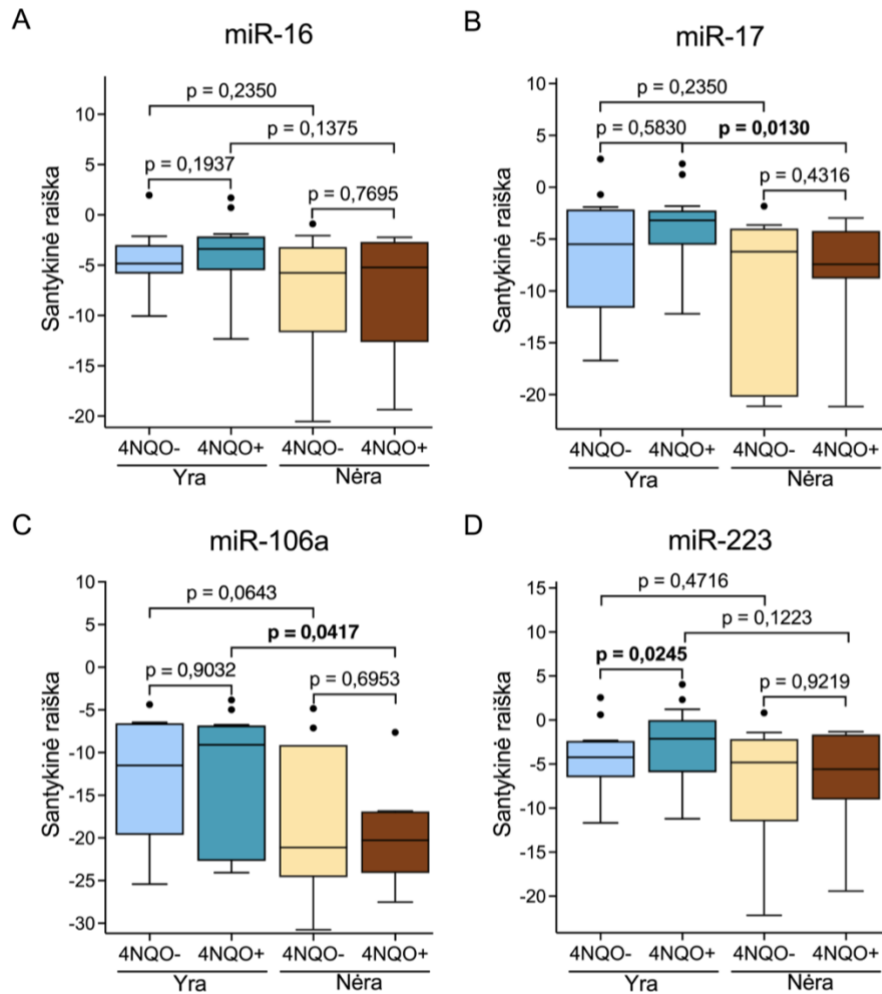
CD2 ligonių mėginiuose tirtų miRNR raiškos skirtumų pagal neuropatijos pasireiškimą nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$), tačiau leukocitus paveikus 4NQO miR-16 ir miR-17 raiška buvo didesnė esant neuropatijai nei šios komplikacijos neturint (atitinkamai $p = 0,0437$ ir $p = 0,0381$, 3.19 pav.).



3.19 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal neuropatijos pasireišimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.3.3.4. MiRNR raiškos sąsajos su akies tinklainės patologija

Tirtų miRNR raiškos skirtumų CD2 ligonių mėginiuose pagal retinopatijos pasireišimą nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$), tačiau leukocitus paveikus 4NQO miR-17 ir miR-106a raiška buvo didesnė esant šiai komplikacijai nei jos neturint (atitinkamai $p = 0,0130$ ir $p = 0,0417$; 3.20 pav.). Be to, retinopatiją turinčių ligonių atveju leukocitų veikimas 4NQO padidino miR-223 raiškos lygį ($p = 0,0245$; 3.20 pav. D).

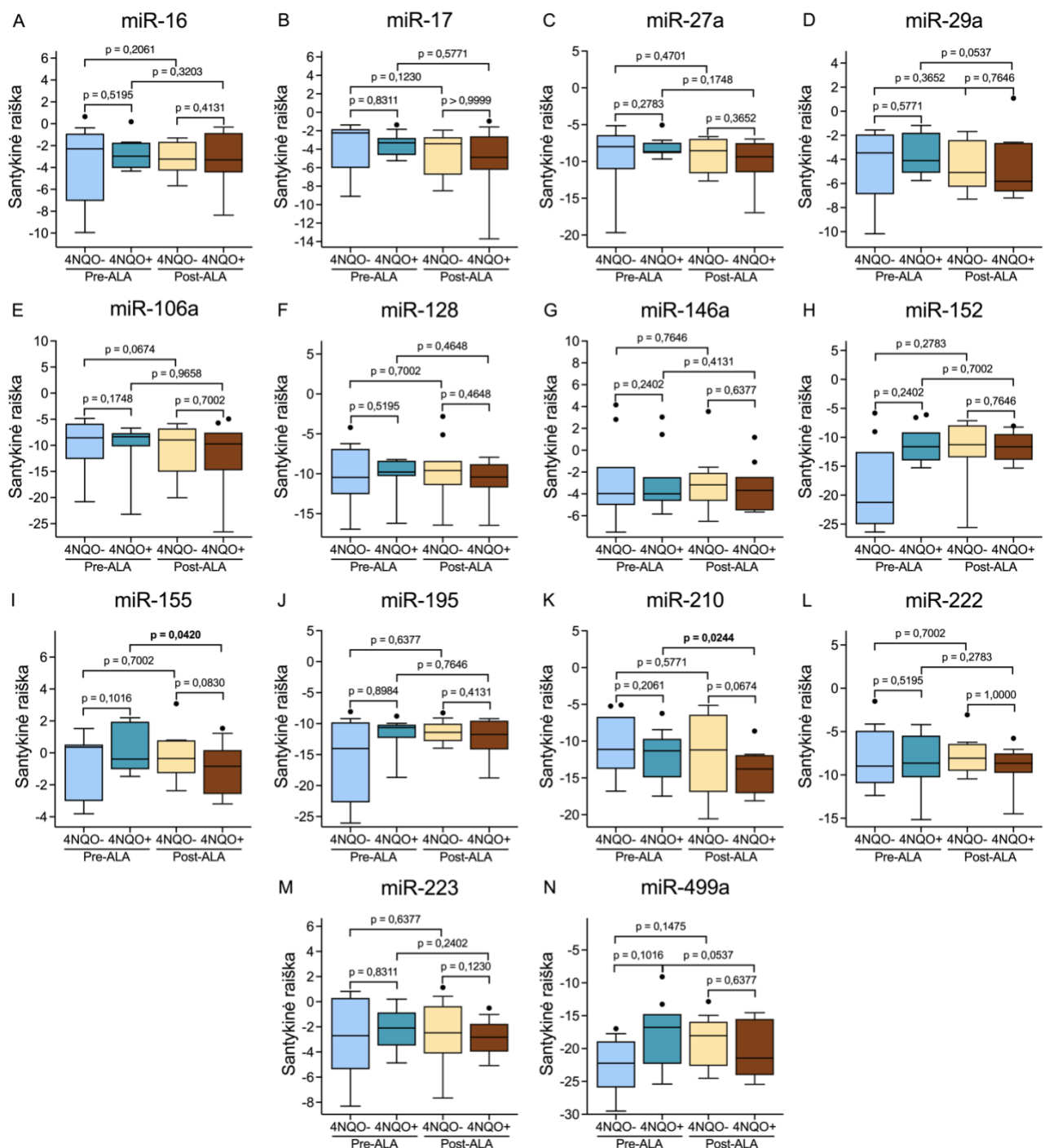


3.20 pav. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal retinopatijos pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

3.4. MiRNR raiškos sąsajos su gydymu α -lipoine rūgštimi

Siekiant įvertinti ALA medikamentinio gydymo poveikį, buvo palyginta 14-os miRNR raiškos (3.1 lentelė) pokyčiai CD ligonių grupės (n = 11) leukocitų mėginiuose prieš gydymą (pre-ALA) ir po gydymo ALA (post-ALA). 4NQO neveiktuose leukocituose tirtų miRNR raiškos skirtumų prieš ir po ALA gydymo nebuvo nustatyta, tik miR-106a atveju stebėta nežymi raiškos sumažėjimo tendencija post-ALA grupėje (visi $p > 0,0500$; 3.21 pav.). Tačiau po poveikio 4NQO miR-155 ir miR-210 raiška post-ALA mėginiuose buvo sumažėjusi palyginus su pre-ALA (atitinkamai $p = 0,0420$ ir $p = 0,0244$; 3.21 pav. I ir K), o miR-29a ir miR-499a atveju pastebėta silpna analogiška tendencija (abu $p > 0,0500$; 3.21 pav. D ir N). Be to, post-ALA mėginiuose 4NQO poveikis galimai turėjo įtakos miR-155 ir miR-210 raiškos sumažėjimui, palyginus su 4NQO

neveiktas mėginiais, tačiau skirtumai nepasiekė statistinio reikšmingumo lygmens (abu $p > 0,0500$; 3.21 pav. I ir K).



3.21 pav. MiRNR raiškos palyginimas cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose prieš ir po gydymo α -lipoine rūgštimi (ALA). A–N – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-106a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR195, miR-210, miR-222, miR-223 ir miR-499a raiška. 4NQO+/– – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Pre / post – ligonių leukocitai prieš ir po ALA gydymo. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

Toliau tirtų miRNR raiška buvo lyginama pagal ALA grupės klinikinius, biocheminius ir antropometrinius rodiklius. Išsamūs duomenys pateikti 3-6 prieduose.

Kai kurių miRNR raiška koreliavo su įvairiais antropometriniais ligonių rodikliais. Pre-ALA mėginiuose didesnė miR-27a raiška buvo susijusi su didesniu KMI bei liemens ir kaklo apimtimis (atitinkamai $p = 0,0085$, $r = 0,75$; $p = 0,0148$, $r = 0,71$ ir $p = 0,0023$, $r = 0,81$; 3.4 lentelė). Su pastaruoju rodikliu taip pat teigiamai koreliavo ir miR-16, miR-17, miR-29a ir miR-195 (atitinkamai $p = 0,0057$, $r = 0,77$; $p = 0,0104$, $r = 0,73$; $p = 0,0354$, $r = 0,64$ ir $p = 0,0220$, $r = 0,68$). MiR-16, miR-27a ir miR-195 raiškos sąsajos su kaklo apimtimi buvo stebimos ir post-ALA mėginiuose (atitinkamai $p = 0,0246$, $r = 0,67$; $p = 0,0354$, $r = 0,64$ ir $p = 0,0208$, $r = 0,68$). Be to, šioje grupėje nustatytos teigiamos miR-146a raiškos koreliacijos su KMI, liemens ir klubų apimtimi (atitinkamai $p = 0,0037$, $r = 0,79$; $p = 0,0099$, $r = 0,74$; $p = 0,0060$, $r = 0,77$; 3.4 lentelė).

3.4 lentelė. MiRNR raiškos palyginimas cukriniu diabetu sergančių ligonių, gydytų α -lipoine rūgštimi, 4-nitrochinolino-1-oksidu neveiktuose leukocituose su antropometriniais rodikliais.

miRNR		KMI		Liemens apimtis		Klubų apimtis		Kaklo apimtis	
		Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA
miR-16	r	0,49	0,59	0,47	0,56	0,12	0,27	0,77	0,67
	p	0,1252	0,0556	0,1488	0,0722	0,7287	0,4242	0,0057	0,0246
miR-17	r	0,46	0,35	0,53	0,45	0,15	0,12	0,73	0,44
	p	0,1509	0,2981	0,0938	0,1676	0,6493	0,7287	0,0104	0,1763
miR-27a	r	0,75	0,49	0,71	0,38	0,47	0,16	0,81	0,64
	p	0,0085	0,1252	0,0148	0,2442	0,141	0,6396	0,0023	0,0354
miR-29a	r	0,45	0,55	0,48	0,44	0,19	0,35	0,64	0,46
	p	0,1601	0,0827	0,1356	0,1775	0,573	0,2902	0,0354	0,1523
miR-106a	r	0,35	-0,04	0,59	0,04	0,23	-0,26	0,60	0,27
	p	0,2981	0,9155	0,0565	0,9151	0,5005	0,449	0,0512	0,4138
miR-128	r	0,52	0,55	0,45	0,45	0,48	0,45	-0,06	0,22
	p	0,1025	0,0767	0,1676	0,1676	0,1367	0,1686	0,862	0,5074
miR-146a	r	0,15	0,79	0,25	0,74	0,00	0,77	-0,15	0,22
	p	0,65	0,0037	0,4563	0,0099	0,9894	0,0060	0,6674	0,5253
miR-152	r	-0,29	0,15	-0,39	0,06	-0,59	-0,05	0,23	0,44
	p	0,3855	0,6696	0,2322	0,8624	0,0573	0,8732	0,4897	0,1763
miR-155	r	0,36	0,36	0,46	0,32	0,14	0,28	0,51	0,33
	p	0,2716	0,2716	0,158	0,3307	0,6787	0,4	0,1106	0,3295
miR-195	r	0,01	0,4	-0,04	0,39	-0,34	0,11	0,68	0,68
	p	0,9788	0,2229	0,9151	0,2322	0,3037	0,7388	0,0220	0,0208
miR-210	r	0,09	0,41	0,46	0,57	0,27	0,28	0,22	0,19
	p	0,7904	0,2115	0,1534	0,0694	0,4160	0,4080	0,5074	0,5712
miR-222	r	0,2	0,23	0,22	0,29	0,03	0,13	-0,1	-0,11
	p	0,5554	0,5015	0,5084	0,3910	0,9364	0,7086	0,7683	0,7376
miR-223	r	0,27	0,58	0,39	0,47	0,05	0,46	0,1	0,11
	p	0,4171	0,0604	0,2322	0,1488	0,8732	0,1544	0,7786	0,7581
miR-499a	r	0,45	0,04	0,45	0,01	0,38	0,09	0,18	0,22
	p	0,1601	0,9155	0,1627	0,9681	0,2454	0,7899	0,59	0,5253

Pre- / Post-ALA – prieš / po gydymo α -lipoine rūgštimi, KMI – kūno masės indeksas, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

Leukocitus paveikus 4NQO, aukštesnės miR-29a raiškos koreliacija su didesne kaklo apimtimi buvo nustatyta tiek pre-ALA, tiek post-ALA atveju (atitinkamai $p = 0,0274$, $r = 0,66$ ir $p =$

0,0233, R = 0,67; 3.5 lentelė). Po gydymo ALA (post-ALA) statistškai patikimos sąsajos su kaklo apimtimi nustatytos miR-16, miR-17, miR-27a ir miR-128 atveju (atitinkamai p = 0,0067, r = 0,76; p = 0,0062, r = 0,76; p = 0,0010, r = 0,85 ir p = 0,0260, r = 0,66). Sąsajų su kitais antropometriniais rodikliais nei vienos tirtos miRNR atveju nerasta (visi p > 0,0500; 3.5 lentelė).

3.5 lentelė. MiRNR raiškos palyginimas ligonių, gydytų α -lipoine rūgštimi, leukocituose po poveikio 4-nitrochinolino-1-oksidu su antropometriniais rodikliais.

miRNR		KMI		Liemens apimtis		Klubų apimtis		Kaklo apimtis	
		Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA	Pre-ALA	Post-ALA
miR-16	r	-0,21	0,35	-0,08	0,44	-0,34	0,23	0,51	0,76
	p	0,5372	0,2847	0,8101	0,1775	0,3107	0,5005	0,1106	0,0067
miR-17	r	-0,32	0,27	-0,27	0,23	-0,36	0,03	0,09	0,76
	p	0,3403	0,4171	0,4231	0,4907	0,2705	0,9258	0,789	0,0062
miR-27a	r	0,02	0,27	-0,09	0,20	0,08	-0,01	-0,18	0,85
	p	0,9577	0,4171	0,7894	0,5536	0,8106	0,9788	0,5900	0,0010
miR-29a	r	0,29	0,56	0,17	0,40	0,16	0,45	0,66	0,67
	p	0,3855	0,0710	0,6195	0,2206	0,6299	0,1686	0,0274	0,0233
miR-106a	r	-0,35	0,52	-0,28	0,57	-0,45	0,37	-0,09	0,59
	p	0,2981	0,1025	0,4069	0,0667	0,1686	0,2641	0,7993	0,0583
miR-128	r	-0,06	0,29	-0,14	0,56	-0,15	0,13	-0,4	0,66
	p	0,8525	0,3855	0,6780	0,0750	0,6689	0,6986	0,2252	0,0260
miR-146a	r	-0,33	0,10	-0,18	0,26	-0,45	0,18	-0,18	0,19
	p	0,3259	0,7699	0,6004	0,4313	0,1638	0,5918	0,59	0,5806
miR-152	r	0,04	0,08	-0,04	-0,23	-0,18	-0,34	0,30	0,44
	p	0,9155	0,8110	0,9151	0,4907	0,6012	0,3037	0,3743	0,1714
miR-155	r	-0,10	0,37	-0,01	0,05	-0,25	0,15	0,37	0,47
	p	0,7699	0,2589	0,9681	0,8729	0,4659	0,6689	0,2617	0,1477
miR-195	r	-0,15	0,22	-0,05	0,23	-0,33	0,13	0,48	0,56
	p	0,6696	0,5192	0,8939	0,4907	0,3176	0,7086	0,1389	0,0742
miR-210	r	-0,03	0,12	-0,08	0,47	-0,05	0,14	-0,05	0,43
	p	0,9366	0,7293	0,8101	0,1488	0,8942	0,6787	0,8831	0,1866
miR-222	r	-0,09	0,00	-0,11	-0,08	-0,40	-0,03	0,30	0,10
	p	0,7904	1,0000	0,7484	0,8205	0,2217	0,9258	0,3666	0,7786
miR-223	r	-0,26	0,46	-0,12	0,50	-0,22	0,38	-0,3	0,55
	p	0,4334	0,1509	0,7180	0,1193	0,5183	0,2515	0,3743	0,0801
miR-499a	r	0,01	0,2	-0,15	0,09	-0,15	-0,03	0,38	0,47
	p	0,9788	0,5554	0,6681	0,7998	0,6493	0,9258	0,243	0,1433

Pre- / Post-ALA – prieš / po gydymo α -lipoine rūgštimi, KMI – kūno masės indeksas, Spearman koreliacijos koeficientas, p – patikimumo lygmuo. Statistiškai patikimos p vertės paryškintos.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

CD yra medžiagų apykaitos sutrikimas, kuris pasižymi hiperglikemija. Lėtinė hiperglikemija skatina ROS susidarymą ir ląstelės patiria OS. Dėl OS sutrinka svarbūs viduląsteliai reguliavimo mechanizmai, dėl to gali pasireikšti įvairios CD komplikacijos, pažeidžiančios periferinius nervus, inkstus, akies tinklainę, širdį ir kraujagysles bei kitus organus (Bhatti et al., 2022). Siekiant išsiaiškinti molekulinis CD patogenezės mechanizmus, yra ieškoma įvairių biožymenų, susijusių su ligos patogenezė. MiRNR raiškos skirtumai yra plačiai aprašomi CD patogenezėje, tačiau jų klinikinio pritaikymo galimybės dar nėra iki galo išaiškintos. Šio tyrimo metu buvo įvertinti keturių miRNR (miR-16, miR-17, miR-106a, miR-223) raiškos pokyčiai pažengusios formos CD1 ir CD2 ligonių leukocitų mėginiuose ir susieti su 4NQO poveikiu, imituojančiu OS ląstelėse, bei klinikiniais rodikliais. Siekiant geriau suprasti ALA, kaip antioksidanto, poveikį epigenetiniams mechanizmomams, buvo įvertinti keturiolikos miRNR (miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-106a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR-195, miR-210, miR-222, miR-223, miR-499a) raiškos pokyčiai CD ligonių leukocitų mėginiuose ir susieti su 4NQO poveikiu bei klinikiniais ligonių rodikliais.

MiR-16 yra viena iš pagrindinių reguliatorių insulino signaliniame kelyje. Tiksliniai miR-16 taikiniai yra genų *IRS1*, *IRS2* bei *INSR* transkriptai (Geng et al., 2014; Hubal et al., 2017). Jų koduojami baltymai yra svarbūs insulino signalinio kelio veiksniai; sumažėjęs jų kiekis sukelia atsparumą insulinui ir medžiagų apykaitos sutrikimus. Ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyti miR-16 raiškos pokyčiai sergant CD1 ir CD2; Garcia-Contreras ir kolegos (2017) nustatė mažesnę šios miR-16 raišką CD1 ligonių plazmos mėginiuose lyginant su sveikais asmenimis. CD2 sergančių asmenų mioblastuose nustatyta mažesnė šios miRNR raiška esant ilgalaikiai hiperglikemijai (Bork-Jensen et al., 2015). Šio tyrimo metu statistiškai patikimų miR-16 raiškos pokyčių CD1 ir CD2 leukocituose lyginant su ASP nenustatyta. Tačiau aptikta mažesnė jos raiška CD1 grupėje esant blogai glikemijos kontrolei ir koreliacija su jos trukme, patvirtinant ankstesniuose tyrimuose parodytą potencialų šios miRNR vaidmenį glikemijos kontrolėje. Taip pat po poveikio 4NQO nustatyta teigiama koreliacija tarp miR-16 ir bendro cholesterolio kiekio. Šią asociaciją galima paaiškinti miR-16 poveikiu genų, dalyvaujančių riebalų rūgščių sintezėje ir oksidacijoje, reguliavimui (Xu et al., 2019). Be to, sergant CD1, cholesterolio absorbcija padidėja, o jo sintezė sumažėja (Semova et al., 2019). CD2 grupėje nustatyta neigiama koreliacija tarp miR-16 raiškos ir HbA1c koncentracijos, ką galima paaiškinti miR-16 įtaka atsparumo insulinui išsivystymui.

Šiame tyrime nustatyta mažesnė miR-16 raiška ligonių, kuriems pasireiškusios inkstų patologijos, leukocituose. Po poveikio 4NQO nustatyta mažesnė šios miRNR raiška CD1 ligonių,

sergančių LIL leukocituose lyginant juos su šios komplikacijos neturinčiais CD ligoniais. Vienas iš miR-16 taikinių yra *VEGFA* (Duan et al., 2021). *VEGFA* dalyvauja angiogenezės, ląstelių migracijos ir išgyvenamumo procesuose, o nenormali jo raiška lemia inkstų ligas (Stevens & Oltean, 2018). Tiksliai miR-16 funkcija *VEGFA* reguliavime nėra žinoma, tačiau manoma, kad dideli gliukozės kiekiai slopina miR-16 raišką, taip skatinant didesnę *VEGFA* raišką. Šio tyrimo metu CD2 grupėje nustatyta didesnė miR-16 raiška ligonių su LIL leukocituose. Tokius rezultatus galima paaiškinti remiantis Duan ir kolegų (2021) tyrimo rezultatais: per didelė miR-16 raiška slopina *VEGFA*, tuo pačiu skatindama podocitų proliferaciją ir slopindama apoptozę, taip apsaugant podocitus nuo inkstų patologijų daromos žalos. Kitų autorių darbuose didesnė miR-16 raiška siejama su padidėjusiu OS ir didesne širdies ir kraujagyslių ligų rizika (Badacz et al., 2021; D’Oria et al., 2020; M. Wang et al., 2020). Šio tyrimo metu, leukocitus paveikus 4NQO, CD2 grupėje nustatyta mažesnė miR-16 raiška ligoniams su PAH. Kadangi patikimas skirtumas nustatytas tik po poveikio 4NQO, gali būti, kad sumažėjusi miR-16 raiška apsaugo kardiomioblastus nuo OS. Taip pat po poveikio 4NQO nustatyta didesnė šios miRNR raiška CD2 ligonių su diabetine neuropatija leukocituose lyginant su ligoniais be šios komplikacijos. Literatūroje nėra pateikiama duomenų apie miR-16 vaidmenį neuropatijoje, tačiau keletas tyrimų nustatė, kad CD2 ligoniuose su diabetine neuropatija miR-16 taikinio *TNF-A* raiška yra didesnė lyginant su sveikais asmenimis (Festa et al., 2002; Sheikh et al., 2019). *TNF-α* sukelia toksiškumą oligodendrocitams ir demielinizaciją, be to, jis padidina IL-1β ir IL-6 bei kitų uždegiminių faktorių sekreciją iš monocitų ir endotelio ląstelių, kurios netiesiogiai sustiprina jo poveikį. Padidėjusi miR-16 raiška didina *TNF-A* raišką, o tai rodo potencialų miR-16 vaidmenį diabetinės neuropatijos patogenezėje.

Kitų autorių darbuose miR-17 raiškos pokyčiai buvo susieti su medžiagų apykaitos ligomis, pavyzdžiui, nustatyta mažesnė šios miRNR raiška CD2 sergančių ligonių riebaliniame audinyje lyginant su sveikais asmenimis (Klötting et al., 2009). Taip pat nustatyta mažesnė miR-17 raiška žmogaus riebaliniame audinyje ir nutukusių ligonių kraujyje (Heneghan et al., 2011). Šio tyrimo metu miR-17 raiška buvo mažesnė ligonių, sergančių CD1 ir kuriems nustatyta bloga glikemijos kontrolė, mėginiuose. Taip pat CD1 grupėje ši miRNR neigiamai koreliavo su liemens apimtimi, ir teigiamai su DTL ir bendru cholesterolio kiekiu. Nors nutukimas dažniau siejamas su CD2 patogenezė ir didesne CD2 rizika, tačiau literatūroje pateikiama vis daugiau įrodymų, kad nutukimas yra ir CD1 rizikos veiksnys. Nutukimas gali prisidėti prie blogos CD1 ligonių glikemijos kontrolės, be to, padidina kai kurių rimtų CD komplikacijų išsivystymo riziką (Dubose et al., 2015). Šio tyrimo rezultatai netiesiogiai patvirtina, kad miR-17 gali būti su nutukimu susijusio uždegimo ir CD1 vystymosi jungtis.

Paveikus leukocitus 4NQO, CD1 grupėje nustatyta mažesnė miR-17 raiška esant nefropatijai. Ši miRNR dalyvauja reguliuojant inkstų ląstelių procesus, glomerulų hemodinamiją bei skysčių ir

elektrolitų pusiausvyrą (Marrone et al., 2014). Šio tyrimo metu gautus rezultatus patvirtinta ir Nandakumar ir kt. tyrime (2017) nustatyta mažesnė miR-17 raiška LIL sergančių asmenų kraujyje. Manoma, kad šios miRNR raiškos sumažėjimas lemia sutrikusią imuninių ląstelių veiklą ir gali prisidėti prie inkstų patologijų progresavimo (Nandakumar et al., 2017). Kaip ir miR-16 atveju, CD2 grupėje miR-17 raiška buvo didesnė sergant LIL bei atitinkami skirtumai nustatyti nefropatijos atveju. Šiuos rezultatus patvirtina keletas anksčiau atliktų tyrimų (X. Fan et al., 2020; Ye et al., 2018). Taip pat CD2 ligonių su retinopatija leukocituose po poveikio 4NQO nustatyta didesnė miR-17 raiška lyginant su ligoniais, neturinčiais šios diagnozės. Vienas iš miR-17 taikinių yra jau minėtas *VEGFA*, kuris laikomas diabetinės retinopatijos iniciatoriumi ir yra susijęs su neuropatijos ir nefropatijos vystymusi. MiR-17 reguliuodama *VEGFA* raišką slopina akies tinklainės ląstelių proliferaciją ir angiogenezę (Guo et al., 2021). CD2 grupėje nustatyta mažesnė miR-17 raiška asmenims, kuriems diagnozuota PAH. Literatūroje tikslus šios miRNR vaidmuo širdies ir kraujagyslių ligų vystymesi nėra pilnai žinomas, tačiau Chen ir kolegos (2015) nustatė, kad miR-17 svarbi kardiomiocitų proliferacijai. Yang ir kt. (2018) parodė, kad padidėjusi šios miRNR raiška lemia antiapoptozinio baltymo Bcl-2 sumažėjimą ir apoptozės baltymų kiekio padidėjimą, taip sukeldami širdies ir kraujagyslių pažeidimus. CD1 grupėje buvo nustatyta mažesnė miR-17 raiška sergant AŠN ir 4NQO poveikis buvo susijęs su šios miRNR raiškos sumažėjimu. Remiantis literatūros duomenimis, sumažėjusi šios miRNR raiška apsaugo širdį ir kraujagysles nuo didesnių pažeidimų, slopindama apoptozę ir uždegimą. Tačiau pastebėtas miR-17 sumažėjimas dėl 4NQO gali būti susijęs su ROS poveikiu šios miRNR raiškai. Sumažėjusi miR-17 raiška skatina *PTEN* raišką, taip netiesiogiai aktyvindama PTEN/Akt signalo perdavimą ir padidina nervinių ląstelių pažeidimus (Zhan et al., 2020). Šiai hipotezei patvirtinti reikėtų išsamių funkcinių miR-17 tyrimų, kurie, tikėtina, taip pat padėtų įvertinti ir prognostinį potencialą.

MiR-106a nėra plačiai tyrinėtą CD patogenezėje, tačiau literatūroje yra duomenų apie šios miRNR raiškos pokyčius esant OS ir CD komplikacijoms. Zapała ir kolegos (2023) nustatė mažesnę miR-106a raišką CD2 ligoniuose lyginant su sveikais asmenimis. Šio tyrimo metu taip pat nustatyta mažesnė miR-106a raiška CD2 ligonių leukocituose lyginant su ASP. CD1 grupėje miR-106a raiška buvo mažesnė esant blogai glikemijos kontrolei bei nustatytos sąsajos tarp šios miRNR ir liemens, klubų apimties, cholesterolio ir MTL koncentracija. Kitų autorių tyrimai parodė, kad miR-106a skatina preadipocitų proliferaciją, reguliuoja įvairių citokinų kiekį, taip valdydama hiperglikemijos sukeltą uždegimą (K. Huang et al., 2019; H. Li et al., 2013; J. Yang et al., 2019). Be to, nustatyta mažesnė raiška diabetinių pelių serume (Platania et al., 2019). Po 4NQO poveikio CD1 grupėje, sergant nefropatija, nustatyta mažesnė šios miR-106a raiška, lyginant su CD1 ligoniais be šios diagnozės. He ir Zeng (2020) nustatė, kad didelis gliukozės kiekis lėmė mažesnę miR-106a raišką diabetine nefropatija sergančių ligonių podocitų serume. CD2 grupėje raiška buvo

didesnė sergant nefropatija nei neturint šios diagnozės. Be to, miR-106a raiškos padidėjimas susietas su 4NQO poveikiu CD2 su nefropatija sergančių asmenų grupėje. Manoma, kad didesnė šios miRNR raiška turi apsauginį poveikį podocitams, nes slopina hiperglikemijos sukeltą Bcl-2 baltymo kiekio mažėjimą, ROS padidėjimą, apoptozę (X. He & Zeng, 2020). CD1 grupėje, sergant neuropatija ar AŠN, po poveikio 4NQO nustatyta mažesnė šios miRNR raiška lyginant su ligoniais be atitinkamų diagnozių. Šio tyrimo rezultatai atitinka Wu ir kt. (2017) tyrimą, kuriame nustatyta mažesnė miR-106a raiška sergant diabetine periferine neuropatija. OS metu miR-106 raiška sumažėja, o tai sukelia priešlaikinį senėjimą, nes slopinamas ląstelės ciklo G1 / S fazės perėjimas, moduluojant *E2F1* raišką (Tai ir kt., 2020). Kita vertus, tyrimai su gestacine hipertenzija sergančiomis pelėmis parodė, kad padidėjęs miR-106a kiekis apsaugo nuo OS sukeltų pažaidų ir uždegimo (Z. Wang et al., 2021). Šio tyrimo metu gauti rezultatai parodo potencialų miR-106a vaidmenį hiperglikemijos sukeltame OS, tačiau siekiant pilnai suprasti šios miRNR reikšmę yra reikalingi papildomi funkciniai tyrimai.

Šio tyrimo metu CD1 grupėje nustatytas miR-223 raiškos sumažėjimas po poveikio 4NQO, esant blogai glikemijos kontrolei. Manoma, kad dėl hiperglikemijos susidarantys per dideli ROS kiekiai slopina miR-223 raišką, taip aktyvinant *NLRP3* raišką. NLRP3 baltymas slopina endotelio ląstelių apoptozę, reguliuodamas su apoptoze susijusius baltymus Bax, kaspazę 3 ir Bcl-2 (Deng et al., 2020). Šio tyrimo metu buvo nustatyta mažesnė šios miRNR raiška sergant CD1 su nefropatija bei jos raiškos sumažėjimas po poveikio 4NQO. Ankstesni tyrimai parodė, kad miR-223 raiškos slopinimas sumažino hiperglikemijos sukeltus pažeidimus žmogaus inkstų glomerulų endotelio ląstelėse, o per didelė miR-223 raiška parodė priešingą poveikį (P. Tang et al., 2023). Šio tyrimo metu, leukocitus paveikus 4NQO, miR-223 raiška buvo mažesnė CD1 grupėje su neuropatija lyginant su šios diagnozės neturinčiais ligoniais. MiR-223 dalyvauja įgimtuose imuniniuose atsakuose reguliuodama mieloidų diferenciaciją ir granulocitų funkcijas (Aziz, 2016). Vienas iš šios miRNR taikinių yra *MKNK2*, kuris yra MAPK kelio substratas ir dalyvauja neuropatinio skausmo patogenezėje (B. Huang et al., 2022). Tikėtina, kad dėl hiperglikemijos sumažėjusi miR-223 raiška lėmė periferinių nervų pažeidimus ir prisidėjo prie neuropatijų vystymosi. Be to, ši miRNR dalyvauja įvairiuose signaliniuose keliuose, kurie yra būtini ląstelių proliferacijai, migracijai, apoptozei, o jų disfunkcija lemia širdies ir kraujagyslių sutrikimus. Šio tyrimo metu miR-223 raiškos sumažėjimas buvo susijęs su 4NQO poveikiu CD1 asmenų su AŠN leukocituose. Tyrimais parodyta, kad esant OS, miR-223 raiška slopinama, taip skatinant kardiomiocitų apoptozę ir uždegimą (M. W. Zhang et al., 2021). Įdomu tai, kad kitų autorių darbuose miR-223 yra įvardinama kaip potencialus biožymuo diagnozuojant CD2, tačiau šio tyrimo metu tik 4NQO poveikis buvo susijęs su miR-223 padidėjimu ligonių su retinopatija leukocituose. Tikėtina, kad šis raiškos

padidėjimas yra susijęs su ROS kaupimusi, todėl yra skatinamas uždegiminis atsakas ir apoptozė, kuri galiausiai pažeidžia akies tinklaines ląsteles.

ALA yra natūraliai susidarantis antioksidantas, kuris pašalina ROS, gerina jautrumą insulinui ir pasižymi priešuždegiminiu poveikiu. Tyrimai *in vitro* ir *in vivo* atskleidė, kad ALA reguliuoja antioksidacinių genų raišką (Arambašić et al., 2013; Ponnampalam et al., 2019; Ying et al., 2011). Šio tyrimo metu nebuvo nustatyta tirtų miRNR raiškos skirtumų prieš ir po gydymo ALA. Tačiau leukocitus paveikus 4NQO, nustatyta mažesnė miR-155 ir miR-210 raiška post-ALA grupėje lyginant su pre-ALA. MiR-155 yra svarbi įvairiuose fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose. Padidėjusi šios miRNR raiška stebima asmenims, sergantiems įvairiomis onkologinėmis ligomis ir diabetine geltonosios dėmės (makulos) edema (J. He et al., 2021). MiR-155 slopina kaspazės 3 raišką, taip sukeliant ląstelių apoptozę (De Santis et al., 2016). Chen ir kolegos (2019) pademonstravo, kad žmogaus virkštelės venos endotelio ląsteles (angl. *Human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) paveikus vandenilio peroksidu, sumažėja miR-155 raiška. Be to, slopinant miR-155 raišką, sumažėja ROS aktyvacija ir padidėja ląstelių proliferacija (H. Chen et al., 2019). Remiantis kitų kolegų darbais, tikėtina, kad ALA gydymas prisidėjo prie miR-155 raiškos slopinimo po poveikio 4NQO, taip apsaugant ligonių leukocitus nuo ROS sukulto OS.

MiR-210 yra siejamas su hipoksijos indukuojamu faktoriumi (angl. *Hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1), kuris tarpininkauja atsake į OS, reguliuodamas įvairių genų raišką. *HIF-1* raiška aptinkama esant hipoksinėms sąlygomis, kurios gali prisidėti prie įvairių ligų, įskaitant diabetą, patogenezės. Tyrimai rodo, kad hipoksinėje ir OS aplinkoje nustatoma didesnė šios miRNR raiška lyginant su kontrolėmis, kurios nėra hipoksinės (X. Huang et al., 2009; Narayanan et al., 2020). Šio tyrimo metu buvo nustatyta mažesnė miR-210 raiška po gydymo ALA. Taip pat pastebėta su 4NQO poveikiu susijęs miR-223 raiškos sumažėjimas ligonių leukocituose po ALA gydymo. Tokius rezultatus galima paaiškinti tuo, kad ALA sumažina ROS kiekį leukocituose, todėl sumažėja OS ir hipoksinė aplinka, atitinkamai sumažinant *HIF-1* ir miR-223 raišką. Tačiau reikalingi išsamesni, didesnių tiriamųjų grupių bei ROS kiekio įvertinimo ląstelėse tyrimai siekiant patvirtinti teigiamą ALA poveikį molekuliniam lygmenyje.

Taip pat šio tyrimo metu buvo nustatytos sąsajos tarp ALA gydymo ir įvairių antropometrinių ligonių rodiklių. Prieš ALA gydymą KMI ir liemens apimtis teigiamai koreliavo su miR-27a, kaklo apimtis – su miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a ir miR-195 4NQO neveiktuose leukocituose. Po gydymo ALA miR-146a raiška teigiamai koreliavo su KMI, liemens ir klubų apimtimis, o miR-16, miR-27a ir miR-195 – su kaklo apimtimi. Prieš gydymą ALA surinktus leukocitus paveikus 4NO, nustatyta sąsaja tarp miR-29a ir kaklo apimties, o po gydymo ALA – tarp miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-128 ir kaklo apimties. MiR-27a dalyvauja insulino signaliniame kelyje, reguliuojant gliukozės metabolizmą ir atsparumą insulinui (T. Chen et al., 2019). Abd El-Jawad ir

kolegų (2022) tyrime ši miRNR teigiamai koreliavo su KMI, juosmens apimtimi, be to, didesnė jos raiška nustatyta nutukusių moterų kraujo plazmoje. Didesnė miR-29a raiška nustatoma CD sergančiuose asmenyse ir ši miRNR laikoma potencialiu vaikų nutukimo ir su juo susijusių komplikacijų patogenezės, pavyzdžiui, CD2, biožymeniu (Mohany et al., 2021). Padidėjusi miR-195 raiška aptinkama sergant medžiagų apykaitos sutrikimais, o miR-128 – nutukusių pelių adipocituose, taip slopinant gliukozės įsisavinimą ir skatinant IR (Arcidiacono et al., 2020; Xia et al., 2022). Šio tyrimo rezultatai parodė galimą teigiamą ALA poveikį reguliuojant medžiagų apykaitą. Papildomai nustatyta teigiama koreliacija tarp KMI ir miR-146a rodo potencialų teigiamą ALA poveikį. Tyrimuose su diabetinėmis pelėmis padidėjusi šios miRNR raiška slopina uždegimą ir dietos sukeltą nutukimą bei reguliuoja medžiagų apykaitos procesus (Runtsch et al., 2019). Kiti tyrėjai taip pat pastebėjo teigiamą ALA poveikį: po gydymo ALA sumažėjo ligonių KMI ir svoris (Vajdi & Abbasalizad Farhangi, 2020). Nustatytos sąsajos su kaklo apimtimi po gydymo ALA gali būti susijusios ne tik su nutukimu, bet ir su skydliaukės veiklos sutrikimais, širdies ir kraujagyslių ligomis. Be to, kakle esančiuose adipocituose greičiau negu liemens ir klubų srityje kaupiasi FFA, kurios gali sukelti medžiagų apykaitos sutrikimus, įskaitant IR (Saneei et al., 2019).

Apibendrinant, šio tyrimo metu nustatyti patikimi tirtų miRNR raiškos skirtumai pagal komplikacijų pasireiškimą rodo potencialų šių miRNR, kaip CD biožymenų, pritaikomumą klinikinėje praktikoje. CD1 grupėje visos tirtos miRNR buvo susijusios su inkstų patologijomis, CD2 grupėje nustatytos sąsajos su trimis miRNR (miR-16, miR-17 ir miR-106a). Mažesni miR-16 ir miR-17 raiškos kiekiai nustatyti sergant CD2 ir pasireiškus PAH. Su periferinių nervų patologijomis buvo susijusios trys miRNR – CD1 grupėje miR-106a raiška buvo susijusi su neuropatijos ir AŠN pasireiškimu, o miR-17 raiška susijusi tik su AŠN; CD2 grupėje nustatytas ryšys tarp neuropatijos ir miR-16 raiškos. Be to, CD2 grupėje nustatyta didesnė miR-17 ir miR-106a raiška esant retinopatijai. Nustatytas ryšys su poveikiu 4NQO rodo potencialų CD komplikacijų vystymosi mechanizmą, priklausomą nuo ROS. Tačiau tiksliesiems miRNR reguliaciniams mechanizms ir jų vaidmeniui CD vystymesi nustatyti būtini funkciniai tyrimai. Šio tyrimo metu pirmą kartą tirtas ALA poveikis epigenetiniame lygmenyje. Nustatyti patikimi miR-155 ir miR-210 raiškos skirtumai po ALA gydymo ir patikimos sąsajos su tam tikrais klinikiniais rodikliais rodo šio medikamento kaip terapinio vaisto potencialą. Tačiau norint pilnai išaiškinti ALA svarbą epigenetiniams reguliaciniams mechanizms reikalingi didesnių grupių ir funkciniai tyrimai.

IŠVADOS

1. MiR-106a raiška CD2 ligonių leukocituose buvo mažesnė nei ASP ($p = 0,0287$). MiR-16, miR-17 ir miR-223 raiška tarp CD1, CD2 ir ASP grupių nesiskyrė (visi $p > 0,0500$).
2. CD1 grupėje mažesnė miR-17, miR-106a ir miR-223 raiška 4NQO neveiktuose leukocituose koreliavo su didesne liemens apimtimi, o miR-17 – ir su klubų apimtimi (visi $p < 0,0500$). Mažesnė miR-16, miR-17 ir miR-106a raiška buvo būdinga blogai glikemijos kontrolės būklei, o miR-16 atveju koreliavo ir su jos trukme (visi $p < 0,0500$). Taip pat miR-17 koreliavo su cholesterolio ir DTL koncentracija, miR-106a – su MTL, o miR-223 – su sistoliniu kraujospūdžiu (visi $p < 0,0500$).
3. CD2 grupėje ligonių rodiklių sąsajos nustatytos tik su miRNR raiška leukocituose po poveikio 4NQO: miR-17 teigiamai koreliavo su diabeto trukme, o miR-16 buvo neigiamai susijusi su HbA1c koncentracija (abu $p < 0,0500$).
4. CD1 grupėje miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 raiškos skirtumai buvo susiję su inkstų ligomis (LIL ir / ar nefropatija), miR-17, miR-106 ir miR-223 – su širdies ir kraujagyslių ligomis (AŠN ir / ar PAH), o miR-106 ir miR-223 – su neuropatija (visi $p < 0,0500$). Poveikis 4NQO indukavo miR-223 raiškos sumažėjimą esant nefropatijai, neuropatijai ar AŠN, o miR-17 – tik esant AŠN (visi $p < 0,0500$).
5. CD2 grupėje miR-16, miR-17 ir miR-106a raiškos skirtumai buvo susiję su inkstų ligomis ir PAH, miR-16 ir miR-17 – su neuropatija, miR-17 ir miR-106a – su retinopatija (visi $p < 0,0500$). Poveikis 4NQO sukėlė miR-106a raiškos padidėjimą esant LIL ($p = 0,0312$), o miR-223 – esant retinopatijai ($p = 0,0245$).
6. 4NQO neveiktuose leukocituose tirtų miRNR (miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-106a, miR-128, miR-146a, miR-152, miR-155, miR-195, miR-210, miR-222, miR-223, miR-499a) raiškos skirtumų prieš ir po ALA gydymo nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$). Po poveikio 4NQO miR-155 ir miR-210 raiška post-ALA mėginiuose buvo sumažėjusi palyginus su pre-ALA (abu $p < 0,0500$). Taip pat nustatytos miR-16, miR-17, miR-27a, miR-29a, miR-128, miR-146a ir miR-195 raiškos sąsajos su įvairiais kūno apimčių rodikliais ALA gydytų CD ligonių grupėje.

ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Magistro baigiamojo darbo idėja suformuluota doc. dr. Kristinos Daniūnaitės, kartu su VU ligoninės „Santaros klinikų“ Endokrinologijos centro (vadovė – Ž. Visockienė) ir VU GMC BMI citogenetikos laboratorijos tyrėjais (vadovas – prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka). Eksperimentus ir tyrimo eigą planavo doc. dr. Kristina Daniūnaitė ir Bernadeta Kaminskaitė. Bernadeta Kaminskaitė dalyvavo atrenkant tiriamąsias miRNR. Bernadeta Kaminskaitė atliko visus eksperimentus (RNR skyrimas, kDNR sintezė, kPGR), literatūros analizę, duomenų statistinę analizę ir vizualizavimą (konsultuojant doc. dr. Kristinai Daniūnaitei).

Tarpiniai tyrimo rezultatai buvo pristatyti 4 konferencijose:

1. Kaminskaitė B., Šiaulienė L., Visockienė Ž., Daniūnaitė K. *MicroRNA Expression in 4NQO-Treated Leukocytes of Type 1 Diabetes Mellitus Patients*. The VIII Baltic Genetics Congress (BGC). March 22-24, 2023. Kaunas, Lithuania.
2. Kaminskaitė B., Šiaulienė L., Visockienė Ž., Daniūnaitė K. *Quantitative analysis of micrnas in INQO-treated leukocytes of patients with type 1 diabetes mellitus*. The 66th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open Readings 2023“. April 18-21, Vilnius, Lithuania.
3. Kaminskaitė B., Šiaulienė L., Visockienė Ž., Daniūnaitė K. *Quantitative analysis of micrnas in 4nqo-treated leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus*. International Conference of Life Sciences „The COINS 2023“. April 24-27, Vilnius, Lithuania Vilnius, Lithuania.
4. Kaminskaitė B., Šiaulienė L., Visockienė Ž., Daniūnaitė K. *4NQO-induced miRNA expression changes in leukocytes of type 2 diabetes mellitus are associated with cardiovascular complications*. Jędrzej Sniadecki's Memorial Conference „Frontiers in Molecular Life Sciences“. May 23-25, 2023, Vilnius, Lithuania. (Stendinis pranešimas buvo įvertintas tarp 4 geriausių).

PADĖKA

Už tyrimo idėją, konsultacijas ir nuoširdų įtraukimą baigiamojo darbo eigą dėkoju darbo vadovei doc. dr. Kristinai Daniūnaitei. Už tyrimo dalyvių įtraukimą, kraujo mėginių ir klinikinių duomenų surinkimą – Vilniaus universiteto ligoninės „Santaros klinikų“ Endokrinologijos centro tyrėjams (vadovė – Ž. Visockienė) ir L. Šiaulienei. Už leukocitų paruošimą dėkoju VU GMC BMI citogenetikos laboratorijos tyrėjams (vadovas – prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. (2021). *Diabetes Care*, 44. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. (2022). *Diabetes Care*, 45. <https://doi.org/10.2337/dc22-S012>
- Abd El-Jawad, A. M., Ibrahim, I. H., Zaki, M. E., Elias, T. R., Rasheed, W. I., & Amr, K. S. (2022). The potential role of miR-27a and miR-320a in metabolic syndrome in obese Egyptian females. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00348-x>
- Abuelezz, N. Z., Shabana, M. E., Rashed, L., & Morcos, G. N. B. (2021). Nanocurcumin modulates mir-223-3p and nf- κ b levels in the pancreas of rat model of polycystic ovary syndrome to attenuate autophagy flare, insulin resistance and improve β cell mass. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.2147/JEP.S323962>
- Aguirre, G. A., Ita, J. R., Garza, R. G., & Castilla-Cortazar, I. (2016). Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0762-z>
- Al-Aubaidy, H. A., & Jelinek, H. F. (2014). Oxidative stress and triglycerides as predictors of subclinical atherosclerosis in prediabetes. *Redox Report*, 19(2). <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000080>
- Alló, M., Agirreb, E., Bessonovc, S., Bertucci, P., Acuña, L. G., Buggiano, V., Bellorab, N., Singhb, B., Petrillo, E., Blaustein, M., Miñana, B., Dujardin, G., Pozzi, B., Pelisch, F., Bechara, E., Agafonov, D. E., Srebrow, A., Lührmann, R., Valcárcel, J., ... Kornblihtt, A. R. (2014). Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.1416858111>
- Anderson, G. (2023). Type I Diabetes Pathoetiology and Pathophysiology: Roles of the Gut Microbiome, Pancreatic Cellular Interactions, and the ‘Bystander’ Activation of Memory CD8+ T Cells. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043300>
- Annese, T., Tamma, R., De Giorgis, M., & Ribatti, D. (2020). microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.581007>
- Arambašić, J., Mihailović, M., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Marković, J., Poznanović, G., Bajec, D., & Vidaković, M. (2013). Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene

- expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *European Journal of Nutrition*, 52(5). <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0452-z>
- Arcidiacono, B., Chiefari, E., Foryst-Ludwig, A., Currò, G., Navarra, G., Brunetti, F. S., Mirabelli, M., Corigliano, D. M., Kintscher, U., Britti, D., Mollace, V., Foti, D. P., Goldfine, I. D., & Brunetti, A. (2020). Obesity-related hypoxia via miR-128 decreases insulin-receptor expression in human and mouse adipose tissue promoting systemic insulin resistance. *EBioMedicine*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102912>
- Armstrong, D. G., Boulton, A. J. M., & Bus, S. A. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *New England Journal of Medicine*, 376(24). <https://doi.org/10.1056/nejmra1615439>
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 24, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
- Assmann, T. S., Recamonde-Mendoza, M., Puñales, M., Tschiedel, B., Canani, L. H., & Crispim, D. (2018). MicroRNA expression profile in plasma from type 1 diabetic patients: Case-control study and bioinformatic analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.03.044>
- Awadalla, N. J., Hegazy, A. A., El-Salam, M. A., & Elhady, M. (2017). Environmental factors associated with type 1 diabetes development: A case control study in Egypt. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060615>
- Aziz, F. (2016). The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. In *Cellular Immunology* (Vol. 303). <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.04.003>
- Badacz, R., Kleczyński, P., Legutko, J., Żmudka, K., Gacoń, J., Przewłocki, T., & Kabłak-Ziembicka, A. (2021). Expression of mir-1-3p, mir-16-5p and mir-122-5p as possible risk factors of secondary cardiovascular events. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081055>
- Bagge, A., Clausen, T. R., Larsen, S., Ladefoged, M., Rosenstjerne, M. W., Larsen, L., Vang, O., Nielsen, J. H., & Dalgaard, L. T. (2012). MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.082>
- Banday, M. Z., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10(04). https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20

- Bek, T. (2017). Diameter Changes of Retinal Vessels in Diabetic Retinopathy. In *Current Diabetes Reports* (Vol. 17, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0909-9>
- Bensellam, M., Laybutt, D. R., & Jonas, J. C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 364, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.003>
- Bhatti, J. S., Sehrawat, A., Mishra, J., Sidhu, I. S., Navik, U., Khullar, N., Kumar, S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2022). Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 184). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.019>
- Bork-Jensen, J., Scheele, C., Christophersen, D. V., Nilsson, E., Friedrichsen, M., Fernandez-Twinn, D. S., Grunnet, L. G., Litman, T., Holmstrøm, K., Vind, B., Højlund, K., Beck-Nielsen, H., Wojtaszewski, J., Ozanne, S. E., Pedersen, B. K., Poulsen, P., & Vaag, A. (2015). Glucose tolerance is associated with differential expression of microRNAs in skeletal muscle: results from studies of twins with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*, 58(2). <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3434-2>
- Butkowski, E. (2020). Oxidative stress markers in diabetes. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 3–11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815776-3.00001-2>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Chen, H., Gao, M. Y. L., Zhang, L. I., He, F. L., Shi, Y. K., Pan, X. H., & Wang, H. (2019). MicroRNA-155 affects oxidative damage through regulating autophagy in endothelial cells. *Oncology Letters*, 17(2). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9860>
- Chen, J., Xu, L., Hu, Q., Yang, S., Zhang, B., & Jiang, H. (2015). MiR-17-5p as circulating biomarkers for the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.06.037>
- Chen, T., Zhang, Y., Liu, Y., Zhu, D., Yu, J., Li, G., Sun, Z., Wang, W., Jiang, H., & Hong, Z. (2019). miR-27a promotes insulin resistance and mediates glucose metabolism by targeting PPAR- γ -mediated PI3K/AKT signaling. *Aging*, 11(18). <https://doi.org/10.18632/aging.102263>
- Chen, Y. H., Heneidi, S., Lee, J. M., Layman, L. C., Stepp, D. W., Gamboa, G. M., Chen, B. S., Chazenbalk, G., & Azziz, R. (2013). Mirna-93 inhibits glut4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*, 62(7). <https://doi.org/10.2337/db12-0963>

- Chen, Y., Tian, L., Wan, S., Xie, Y., Chen, X., Ji, X., Zhao, Q., Wang, C., Zhang, K., Hock, J. M., Tian, H., & Yu, X. (2016). MicroRNA-17-92 cluster regulates pancreatic beta-cell proliferation and adaptation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 437. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.037>
- Cheng, Y., Peng, L., Deng, X., Li, T., Guo, H., Xu, C., Fang, T., Liu, X., Sun, B., & Chen, L. (2021). Prostaglandin F2 α protects against pericyte apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Annals of Translational Medicine*, 9(12). <https://doi.org/10.21037/atm-21-2717>
- Chuang, T. Y., Wu, H. L., Chen, C. C., Gamboa, G. M., Layman, L. C., Diamond, M. P., Azziz, R., & Chen, Y. H. (2015). MicroRNA-223 expression is upregulated in insulin resistant human adipose tissue. *Journal of Diabetes Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/943659>
- Ciccacci, C., Latini, A., Greco, C., Politi, C., D'Amato, C., Lauro, D., Novelli, G., Borgiani, P., & Spallone, V. (2018). Association between a MIR499A polymorphism and diabetic neuropathy in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 32(1). <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.10.011>
- Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
- Cui, C., Cui, Y., Fu, Y., Ma, S., & Zhang, S. (2018). Microarray analysis reveals gene and microRNA signatures in diabetic kidney disease. *Molecular Medicine Reports*, 17(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8177>
- Cui, J., & Placzek, W. J. (2018). Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic BCL2 family members. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010308>
- Dahl, A., & Kumar, S. (2020). Recent advances in neonatal diabetes. In *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Vol. 13). <https://doi.org/10.2147/DMSO.S198932>
- Daniels, M. C., McClain, D. A., & Crook, E. D. (2020). Transcriptional Regulation of Transforming Growth Factor β 1 by Glucose: Investigation into the Role of the Hexosamine Biosynthesis Pathway. *American Journal of the Medical Sciences*, 359(2). <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.12.013>
- de Brito Oliveira, A. L., Monteiro, V. V. S., Navegantes-Lima, K. C., Reis, J. F., de Souza Gomes, R., Rodrigues, D. V. S., de França Gaspar, S. L., & Monteiro, M. C. (2017). Resveratrol role in autoimmune disease—a mini-review. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/nu9121306>

- De Santis, R., Liepelt, A., Mossanen, J. C., Dueck, A., Simons, N., Mohs, A., Trautwein, C., Meister, G., Marx, G., Ostareck-Lederer, A., & Ostareck, D. H. (2016). miR-155 targets caspase-3 mRNA in activated macrophages. *RNA Biology*, *13*(1).
<https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1109768>
- Deng, B., Hu, Y., Sheng, X., Zeng, H., & Huo, Y. (2020). miR-223-3p reduces high glucose and high fat-induced endothelial cell injury in diabetic mice by regulating NLRP3 expression. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *20*(2). <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8864>
- Diane, A., Mahmoud, N., Bensmail, I., Khattab, N., Abunada, H. A., & Dehbi, M. (2020). Alpha lipoic acid attenuates ER stress and improves glucose uptake through DNAJB3 cochaperone. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77621-x>
- Diedisheim, M., Carcarino, E., Vandiedonck, C., Roussel, R., Gautier, J. F., & Venticlef, N. (2020). Regulation of inflammation in diabetes: From genetics to epigenomics evidence. In *Molecular Metabolism* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101041>
- Dieter, C., Lemos, N. E., Corrêa, N. R. de F., Assmann, T. S., & Crispim, D. (2021). The Impact of lncRNAs in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and In Silico Analyses. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.602597>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. In *The Lancet* (Vol. 391, Issue 10138, pp. 2449–2462). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- D’Oria, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2020). The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). <https://doi.org/10.1155/2020/5732956>
- Downes, D. J., Chonofsky, M., Tan, K., Pfannenstiel, B. T., Reck-Peterson, S. L., & Todd, R. B. (2014). Characterization of the mutagenic spectrum of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in *Aspergillus nidulans* by whole genome sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *4*(12). <https://doi.org/10.1534/g3.114.014712>
- Duan, Y. R., Chen, B. P., Chen, F., Yang, S. X., Zhu, C. Y., Ma, Y. L., Li, Y., & Shi, J. (2021). Exosomal microRNA-16-5p from human urine-derived stem cells ameliorates diabetic nephropathy through protection of podocyte. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *25*(23). <https://doi.org/10.1111/jcmm.14558>
- Dubose, S. N., Hermann, J. M., Tamborlane, W. V., Beck, R. W., Dost, A., DiMeglio, L. A., Schwab, K. O., Holl, R. W., Hofer, S. E., & Maahs, D. M. (2015). Obesity in Youth with Type 1 Diabetes in Germany, Austria, and the United States. *Journal of Pediatrics*, *167*(3). <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.05.046>

- Dugbartey, G. J., Alornyo, K. K., N'guessan, B. B., Atule, S., Mensah, S. D., & Adjei, S. (2022). Supplementation of conventional anti-diabetic therapy with alpha-lipoic acid prevents early development and progression of diabetic nephropathy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *149*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112818>
- Ebada, M. A., Fayed, N., Fayed, L., Alkanj, S., Abdelkarim, A., Farwati, H., Hanafy, A., Negida, A., Ebada, M., & Noser, Y. (2019). Efficacy of alpha-lipoic acid in the management of diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *18*(4). <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100842>
- Eid, S., Sas, K. M., Abcouwer, S. F., Feldman, E. L., Gardner, T. W., Pennathur, S., & Fort, P. E. (2019). New insights into the mechanisms of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism. In *Diabetologia* (Vol. 62, Issue 9). <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4959-1>
- Estrella-Ibarra, P., García-Solís, P., Solís-Sáinz, J. C., & Cruz-Hernández, A. (2021). Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review. In *Endokrynologia Polska* (Vol. 72, Issue 1). <https://doi.org/10.5603/EP.a2021.0002>
- Fan, B., Chopp, M., Zhang, Z. G., & Liu, X. S. (2020). Emerging Roles of microRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Diabetic Neuropathy. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.558758>
- Fan, X., Hao, Z., Li, Z., Wang, X., & Wang, J. (2020). Inhibition of miR-1792 Cluster Ameliorates High Glucose-Induced Podocyte Damage. *Mediators of Inflammation*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/6126490>
- Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>
- Feng, J., Xing, W., & Xie, L. (2016). Regulatory roles of microRNAs in diabetes. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101729>
- Festa, A., D'Agostino, R., Tracy, R. P., & Haffner, S. M. (2002). Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: The insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, *51*(4). <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1131>
- Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., & Folli, F. (2013). Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(32). <https://doi.org/10.2174/1381612811319320005>

- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. In *Circulation Research* (Vol. 122, Issue 6). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Garcia-Contreras, M., Shah, S. H., Tamayo, A., Robbins, P. D., Golberg, R. B., Mendez, A. J., & Ricordi, C. (2017). Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05787-y>
- Garla, V., Kanduri, S., Yanes-Cardozo, L., & Lién, L. F. (2019). Management of diabetes mellitus in chronic kidney disease. In *Minerva Endocrinologica* (Vol. 44, Issue 3). <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.19.03015-3>
- Geng, Y., Ju, Y., Ren, F., Qiu, Y., Tomita, Y., Tomoeda, M., Kishida, M., Wang, Y., Jin, L., Su, F., Wei, C., Jia, B., Li, Y., & Chang, Z. (2014). Insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/2) regulates Wnt/ β -Catenin signaling through blocking autophagic degradation of dishevelled. *Journal of Biological Chemistry*, 289(16). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544999>
- Grieco, G. E., Fignani, D., Formichi, C., Nigi, L., Licata, G., Maccora, C., Brusco, N., Sebastiani, G., & Dotta, F. (2021). Extracellular Vesicles in Immune System Regulation and Type 1 Diabetes: Cell-to-Cell Communication Mediators, Disease Biomarkers, and Promising Therapeutic Tools. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682948>
- Guo, Y., Du, F., Tan, Y. L., Luo, J., Xiong, D., & Song, W. T. (2021). VEGF-mediated angiogenesis in retinopathy of prematurity is co-regulated by miR-17-5p and miR-20a-5p. *Biochemistry and Cell Biology*, 99(4). <https://doi.org/10.1139/bcb-2020-0357>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Haghighatdoost, F., & Hariri, M. (2019). Does alpha-lipoic acid affect lipid profile? A meta-analysis and systematic review on randomized controlled trials. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 847). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.001>
- Haliyur, R., Tong, X., Sanyoura, M., Shrestha, S., Lindner, J., Saunders, D. C., Aramandla, R., Poffenberger, G., Redick, S. D., Bottino, R., Prasad, N., Levy, S. E., Blind, R. D., Harlan, D. M., Philipson, L. H., Stein, R. W., Brissova, M., & Powers, A. C. (2019). Human islets

- expressing HNF1A variant have defective β cell transcriptional regulatory networks. *Journal of Clinical Investigation*, 129(1). <https://doi.org/10.1172/JCI121994>
- He, J., Zhang, R., Wang, S., Xie, L., Yu, C., Xu, T., Li, Y., & Yan, T. (2021). Expression of microRNA-155-5p in patients with refractory diabetic macular edema and its regulatory mechanism. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(3). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10407>
- He, X., & Zeng, X. (2020). Lncrna snhg16 aggravates high glucose-induced podocytes injury in diabetic nephropathy through targeting mir-106a and thereby up-regulating klf9. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 13. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S271290>
- Heneghan, H. M., Miller, N., McAnena, O. J., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2011). Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(5). <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2701>
- Hippisley-Cox, J., & Coupland, C. (2016). Diabetes treatments and risk of amputation, blindness, severe kidney failure, hyperglycaemia, and hypoglycaemia: Open cohort study in primary care. *BMJ (Online)*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1450>
- Huang, B., Guo, S., Zhang, Y., Lin, P., Lin, C., Chen, M., Zhu, S., Huang, L., He, J., Zhang, L., Zheng, Y., & Wen, Z. (2022). MiR-223-3p alleviates trigeminal neuropathic pain in the male mouse by targeting MKNK2 and MAPK/ERK signaling. *Brain and Behavior*, 12(7). <https://doi.org/10.1002/brb3.2634>
- Huang, H., He, J., Johnson, D., Wei, Y., Liu, Y., Wang, S., Luty, G. A., Duh, E. J., & Semba, R. D. (2015). Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition. *Diabetes*, 64(1). <https://doi.org/10.2337/db14-0016>
- Huang, K., Shi, X., Wang, J., Yao, Y., Peng, Y., Chen, X., Li, X., & Yang, G. (2019). Upregulated microRNA-106a promotes porcine preadipocyte proliferation and differentiation by targeting different genes. *Genes*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/genes10100805>
- Huang, X., Ding, L., Bennewith, K. L., Tong, R. T., Welford, S. M., Ang, K. K., Story, M., Le, Q. T., & Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Molecular Cell*, 35(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.006>
- Hubal, M. J., Nadler, E. P., Ferrante, S. C., Barberio, M. D., Suh, J. H., Wang, J., Dohm, G. L., Pories, W. J., Mietus-Snyder, M., & Freishtat, R. J. (2017). Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity*, 25(1). <https://doi.org/10.1002/oby.21709>

- Huerta, A. E., Navas-Carretero, S., Prieto-Hontoria, P. L., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2015). Effects of α -lipoic acid and eicosapentaenoic acid in overweight and obese women during weight loss. *Obesity*, 23(2). <https://doi.org/10.1002/oby.20966>
- Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., & Akinloye, O. A. (2017). Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 53, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.medic.2018.02.001>
- Improta-Caria, A. C., de Sousa, R. A. L., Roeber, L., Fernandes, T., de Oliveira, E. M., Júnior, R. A., & de Freitas Souza, B. S. (2022). MicroRNAs in type 2 diabetes mellitus: potential role of physical exercise. In *Reviews in Cardiovascular Medicine* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.31083/j.rcm2301029>
- Iwakawa, H. oki, & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>
- Jamor, P., Ahmadvand, H., Ashoory, H., & Babaeenezhad, E. (2019). Effect of alpha-lipoic acid on antioxidant gene expression and kidney injury in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Nephropathology*, 8(1). <https://doi.org/10.15171/jnp.2019.06>
- Jha, J. C., Banal, C., Chow, B. S. M., Cooper, M. E., & Jandeleit-Dahm, K. (2016). Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 25, Issue 12). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Kallinikou, D., Soldatou, A., Tsentidis, C., Louraki, M., Kanaka-Gantenbein, C., Kanavakis, E., & Karavanaki, K. (2019). Diabetic neuropathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Diagnosis, pathogenesis, and associated genetic markers. In *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3178>
- Kapłon-Cieślicka, A., Postuła, M., Rosiak, M., Peller, M., Kondracka, A., Serafin, A., Trzepla, E., Opolski, G., & Filipiak, K. J. (2015). Association of adipokines and inflammatory markers with lipid control in type 2 diabetes. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 125(6). <https://doi.org/10.20452/pamw.2880>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kawanami, D., Matoba, K., & Utsunomiya, K. (2016). Dyslipidemia in diabetic nephropathy. In *Renal Replacement Therapy* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s41100-016-0028-0>

- Kesavadev, J., Jawad, F., Deeb, A., Coetzee, A., Jalil Ansari, M. A., Shrestha, D., Somasundaram, N., & Kalra, S. (2019). Pathophysiology of Type 2 Diabetes. In *The Diabetes Textbook* (pp. 101–116). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11815-0_8
- Klötting, N., Berthold, S., Kovacs, P., Schön, M. R., Fasshauer, M., Ruschke, K., Stumvoll, M., & Blüher, M. (2009). MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS ONE*, *4*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004699>
- Koike, R., Uchiyama, T., Arimoto-Kobayashi, S., Okamoto, K., & Negishi, T. (2018). Increase of somatic cell mutations in oxidative damage-sensitive drosophila. *Genes and Environment*, *40*(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-017-0090-z>
- Konovalova, J., Gerasymchuk, D., Parkkinen, I., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2019). Interplay between MicroRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms20236055>
- Kosova, A. A., Khodyreva, S. N., & Lavrik, O. I. (2017). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 82, Issue 6). <https://doi.org/10.1134/S0006297917060013>
- Krupa, A., Jenkins, R., Luo, D. D., Lewis, A., Phillips, A., & Fraser, D. (2010). Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, *21*(3). <https://doi.org/10.1681/ASN.2009050530>
- Lan, A., Li, W., Liu, Y., Xiong, Z., Zhang, X., Zhou, S., Palko, O., Chen, H., Kapita, M., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., Chen, X., Sun, Z., & Chen, X. L. (2016). Chemoprevention of oxidative stress-associated oral carcinogenesis by sulforaphane depends on NRF2 and the isothiocyanate moiety. *Oncotarget*, *7*(33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10609>
- Larrue, R., Fella, S., Van der Hauwaert, C., Hennino, M. F., Perrais, M., Lionet, A., Glowacki, F., Pottier, N., & Cauffiez, C. (2022). The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases. In *Cells* (Vol. 11, Issue 21). <https://doi.org/10.3390/cells11213525>
- Li, G., Fu, J., Zhao, Y., Ji, K., Luan, T., & Zang, B. (2015). Alpha-Lipoic Acid Exerts Anti-Inflammatory Effects on Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Mesangial Cells via Inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Signaling Pathway. *Inflammation*, *38*(2). <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9957-3>
- Li, H., Li, T., Wang, S., Wei, J., Fan, J., Li, J., Han, Q., Liao, L., Shao, C., & Zhao, R. C. (2013). MiR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, *10*(3). <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.11.007>
- Li, N., Yan, W., Hu, X., Huang, Y., Wang, F., Zhang, W., Wang, Q., Wang, X., & Sun, K. (2017). Effects of oral α -lipoic acid administration on body weight in overweight or obese subjects: a

- crossover randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Endocrinology*, 86(5).
<https://doi.org/10.1111/cen.13303>
- Li, X. (2014). MiR-375, a microRNA related to diabetes. In *Gene* (Vol. 533, Issue 1).
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.105>
- Lim, A. K. H. (2014). Diabetic nephropathy – Complications and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 7. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S40172>
- Ling, S., Birnbaum, Y., Nanhwan, M. K., Thomas, B., Bajaj, M., & Ye, Y. (2013). MicroRNA-dependent cross-talk between VEGF and HIF1 α in the diabetic retina. *Cellular Signalling*, 25(12). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.039>
- Liu, S., Tang, G., Duan, F., Zeng, C., Gong, J., Chen, Y., & Tan, H. (2021). MiR-17-5p Inhibits TXNIP/NLRP3 Inflammasome Pathway and Suppresses Pancreatic β -Cell Pyroptosis in Diabetic Mice. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.768029>
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J. Y., Widmann, C., Abderrahmani, A., & Regazzi, R. (2008). Alterations in MicroRNA expression contribute to fatty Acid-Induced pancreatic β -Cell dysfunction. *Diabetes*, 57(10). <https://doi.org/10.2337/db07-1252>
- Luna Buitrago, D., Lovering, R. C., & Caporali, A. (2023). Insights into Online microRNA Bioinformatics Tools. *Non-Coding RNA*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/ncrna9020018>
- Ma, E., Fu, Y., & Garvey, W. T. (2018). Relationship of Circulating miRNAs with Insulin Sensitivity and Associated Metabolic Risk Factors in Humans. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(2). <https://doi.org/10.1089/met.2017.0101>
- Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2019). Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? In *Pediatric Diabetes* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/pedi.12787>
- Mambiya, M., Shang, M., Wang, Y., Li, Q., Liu, S., Yang, L., Zhang, Q., Zhang, K., Liu, M., Nie, F., Zeng, F., & Liu, W. (2019). The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes. In *Frontiers in Public Health* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00349>
- Margaritis, K., Margioulas-ziarkou, G., Giza, S., Kotanidou, E. P., Tsinopoulou, V. R., Christoforidis, A., & Galli-tsinopoulou, A. (2021). Micro-rna implications in type-1 diabetes mellitus: A review of literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22).
<https://doi.org/10.3390/ijms222212165>
- Marrone, A. K., Stolz, D. B., Bastacky, S. I., Kostka, D., Bodnar, A. J., & Ho, J. (2014). MicroRNA-17 ~ 92 is required for nephrogenesis and renal function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7). <https://doi.org/10.1681/ASN.2013040390>

- McRae, M., & Low Wang, C. C. (2022). Macrovascular Complications. In *Primary Care - Clinics in Office Practice* (Vol. 49, Issue 2, pp. 255–273). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.pop.2021.11.012>
- Michael Kim, & Xiaokan Zhang. (2019). The Profiling and Role of miRNAs in Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes and Clinical Research*, 1(1). <https://doi.org/10.33696/diabetes.1.003>
- Mohany, K. M., Al Rugaie, O., Al-Wutayd, O., & Al-Nafeesah, A. (2021). Investigation of the levels of circulating miR-29a, miR-122, sestrin 2 and inflammatory markers in obese children with/without type 2 diabetes: a case control study. *BMC Endocrine Disorders*, 21(1).
<https://doi.org/10.1186/s12902-021-00829-z>
- Moresco, R. N., Sangoi, M. B., De Carvalho, J. A. M., Tatsch, E., & Bochi, G. V. (2013). Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 421).
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.019>
- Mousavi, S. M., Shab-Bidar, S., Kord-Varkaneh, H., Khorshidi, M., & Djafarian, K. (2019). Effect of alpha-lipoic acid supplementation on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. In *Nutrition* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.08.004>
- Müller, J. A., Groß, R., Conzelmann, C., Krüger, J., Merle, U., Steinhart, J., Weil, T., Koepke, L., Bozzo, C. P., Read, C., Fois, G., Eiseler, T., Gehrman, J., van Vuuren, J., Wessbecher, I. M., Frick, M., Costa, I. G., Breunig, M., Grüner, B., ... Kleger, A. (2021). SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nature Metabolism*, 3(2).
<https://doi.org/10.1038/s42255-021-00347-1>
- Nandakumar, P., Tin, A., Grove, M. L., Ma, J., Boerwinkle, E., Coresh, J., & Chakravarti, A. (2017). MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in chronic kidney disease with hypertension. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176734>
- Narayanan, S., Eliasson Angelstig, S., Xu, C., Grünler, J., Zhao, A., Zhu, W., Xu Landén, N., Ståhle, M., Zhang, J., Ivan, M., Maltesen, R. G., Botusan, I. R., Rajamand Ekberg, N., Zheng, X., & Catrina, S. B. (2020). HypoxamiR-210 accelerates wound healing in diabetic mice by improving cellular metabolism. *Communications Biology*, 3(1).
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01495-y>
- Nellaiappan, K., Preeti, K., Khatri, D. K., & Singh, S. B. (2021). Diabetic Complications: An Update on Pathobiology and Therapeutic Strategies. *Current Diabetes Reviews*, 18(1).
<https://doi.org/10.2174/1573399817666210309104203>
- Noble, J. A., & Valdes, A. M. (2011). Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 11(6). <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0223-x>

- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Ohiagu, F. O., Chikezie, P. C., & Chikezie, C. M. (2021). Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control. *Biomedical Research and Therapy*, 8(3). <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i3.663>
- Packer, L., & Cadenas, E. (2011). Lipoic acid: Energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. In *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (Vol. 48, Issue 1). <https://doi.org/10.3164/jcbrn.11-005FR>
- Pang, H., Luo, S., Huang, G., Xia, Y., Xie, Z., & Zhou, Z. (2020). Advances in Knowledge of Candidate Genes Acting at the Beta-Cell Level in the Pathogenesis of T1DM. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00119>
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. In *Endocrine Connections* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
- Pasupuleti, V. R., Arigela, C. S., Gan, S. H., Salam, S. K. N., Krishnan, K. T., Rahman, N. A., & Jeffree, M. S. (2020). A review on oxidative stress, diabetic complications, and the roles of honey polyphenols. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). <https://doi.org/10.1155/2020/8878172>
- Patel, K., Horak, H., & Tiryaki, E. (2021). Diabetic neuropathies. *Muscle and Nerve*, 63(1). <https://doi.org/10.1002/mus.27014>
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. K. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/jcp.25854>
- Petry, C. J. (2010). Gestational diabetes: Risk factors and recent advances in its genetics and treatment. In *British Journal of Nutrition* (Vol. 104, Issue 6). <https://doi.org/10.1017/S0007114510001741>
- Pitocco, D., Tesouro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G., & Cardillo, C. (2013). Oxidative stress in diabetes: Implications for vascular and other complications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms141121525>
- Platania, C. B. M., Maisto, R., Trotta, M. C., D'Amico, M., Rossi, S., Gesualdo, C., D'Amico, G., Balta, C., Herman, H., Hermenean, A., Ferraraccio, F., Panarese, I., Drago, F., & Bucolo, C. (2019). Retinal and circulating miRNA expression patterns in diabetic retinopathy: An in silico and in vivo approach. *British Journal of Pharmacology*, 176(13). <https://doi.org/10.1111/bph.14665>

- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Ponnampalam, E. N., Vahedi, V., Giri, K., Lewandowski, P., Jacobs, J. L., & Dunshea, F. R. (2019). Muscle antioxidant enzymes activity and gene expression are altered by diet-induced increase in muscle essential fatty acid (α -linolenic acid) concentration in sheep used as a model. *Nutrients*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040723>
- Pop-Busui, R., Boulton, A. J. M., Feldman, E. L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R. A., Sosenko, J. M., & Ziegler, D. (2017). Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*, *40*(1). <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>
- Portnoy, V., Lin, S. H. S., Li, K. H., Burlingame, A., Hu, Z. H., Li, H., & Li, L. C. (2016). SaRNA-guided Ago2 targets the RITA complex to promoters to stimulate transcription. *Cell Research*, *26*(3). <https://doi.org/10.1038/cr.2016.22>
- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., & Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.0810550106>
- Prasad, K. (2018). Does HbA1cc Play a Role in the Development of Cardiovascular Diseases? *Current Pharmaceutical Design*, *24*(24). <https://doi.org/10.2174/1381612824666180903121957>
- Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D. M., Sevastyanova, T., Harmsen, M. C., & Kzhyshkowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. In *Immunobiology* (Vol. 224, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.11.010>
- Roos, J., Dahlhaus, M., Funcke, J. B., Kustermann, M., Strauss, G., Halbgebauer, D., Boldrin, E., Holzmann, K., Möller, P., Trojanowski, B. M., Baumann, B., Debatin, K. M., Wabitsch, M., & Fischer-Posovszky, P. (2021). miR-146a regulates insulin sensitivity via NPR3. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(6). <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03699-1>
- Rorbach, G., Unold, O., & Konopka, B. M. (2018). Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25578-3>
- Runtsch, M. C., Nelson, M. C., Lee, S. H., Voth, W., Alexander, M., Hu, R., Wallace, J., Petersen, C., Panic, V., Villanueva, C. J., Evason, K. J., Bauer, K. M., Mosbrugger, T., Boudina, S., Bronner, M., Round, J. L., Drummond, M. J., & O'Connell, R. M. (2019). Anti-inflammatory microRNA-146a protects mice from diet-induced metabolic disease. *PLoS Genetics*, *15*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007970>

- Sagheer, S. H., Whitaker-Menezes, D., Han, J. Y. S., Curry, J. M., Martinez-Outschoorn, U., & Philp, N. J. (2021). 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 163, pp. 93–111). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.01.001>
- Sánchez-Ceinos, J., Rangel-Zuñiga, O. A., Clemente-Postigo, M., Podadera-Herreros, A., Camargo, A., Alcalá-Díaz, J. F., Guzmán-Ruiz, R., López-Miranda, J., & Malagón, M. M. (2021). miR-223-3p as a potential biomarker and player for adipose tissue dysfunction preceding type 2 diabetes onset. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 23.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.014>
- Saneei, P., Shahdadian, F., Moradi, S., Ghavami, A., Mohammadi, H., & Rouhani, M. H. (2019). Neck circumference in relation to glycemic parameters: A systematic review and meta-analysis of observational studies. In *Diabetology and Metabolic Syndrome* (Vol. 11, Issue 1).
<https://doi.org/10.1186/s13098-019-0445-7>
- Sanyoura, M., Philipson, L. H., & Naylor, R. (2018). Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. In *Current Diabetes Reports* (Vol. 18, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1024-2>
- Scoville, D. W., & Jetten, A. M. (2021). GLIS3: A critical transcription factor in islet β -cell generation. In *Cells* (Vol. 10, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/cells10123471>
- Semova, I., Levenson, A. E., Krawczyk, J., Bullock, K., Williams, K. A., Wadwa, R. P., Shah, A. S., Khoury, P. R., Kimball, T. R., Urbina, E. M., de Ferranti, S. D., Bishop, F. K., Maahs, D. M., Dolan, L. M., Clish, C. B., & Biddinger, S. B. (2019). Type 1 diabetes is associated with an increase in cholesterol absorption markers but a decrease in cholesterol synthesis markers in a young adult population. *Journal of Clinical Lipidology*, 13(6).
<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2019.09.008>
- Sheikh, W. M. E., Alahmar, I. E., Salem, G. M., & El-Sheikh, M. A. (2019). Tumor necrosis factor alpha in peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 55(1). <https://doi.org/10.1186/s41983-019-0080-0>
- Shi, R., Niu, Z., Wu, B., Zhang, T., Cai, D., Sun, H., Hu, Y., Mo, R., & Fan, H. (2020). Nomogram for the risk of diabetic nephropathy or diabetic retinopathy among patients with type 2 diabetes mellitus based on questionnaire and biochemical indicators: A cross-sectional study. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 13.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S244061>
- Siddiqui, K., George, T. P., Joy, S. S., & Alfadda, A. A. (2022). Risk factors of chronic kidney disease among type 2 diabetic patients with longer duration of diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1079725>

- Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9).
<https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 7).
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh, U., & Jialal, I. (2008). Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes (Retracted article. See vol. 70, pg. 482, 2012). *Nutrition Reviews*, 66(11).
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. In *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 18, Issue 1).
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>
- Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., Groop, L., Groop, P. H., Handelsman, Y., Insel, R. A., Mathieu, C., McElvaine, A. T., Palmer, J. P., Pugliese, A., Schatz, D. A., Sosenko, J. M., Wilding, J. P. H., & Ratner, R. E. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. In *Diabetes* (Vol. 66, Issue 2).
<https://doi.org/10.2337/db16-0806>
- Spallone, V., Ciccacci, C., Latini, A., & Borgiani, P. (2021). What Is in the Field for Genetics and Epigenetics of Diabetic Neuropathy: The Role of MicroRNAs. *Journal of Diabetes Research*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5593608>
- Stevens, M., & Oltean, S. (2018). Modulation of VEGF-A alternative splicing as a novel treatment in chronic kidney disease. In *Genes* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/genes9020098>
- Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A., Gardiner, T. A., Lyons, T. J., Hammes, H. P., Simó, R., & Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 51).
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.08.001>
- Størling, J., & Pociot, F. (2017). Type 1 diabetes candidate genes linked to pancreatic islet cell inflammation and beta-cell apoptosis. In *Genes* (Vol. 8, Issue 2).
<https://doi.org/10.3390/genes8020072>
- Sun, H. J., Wu, Z. Y., Nie, X. W., & Bian, J. S. (2020). Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The link between inflammation and hydrogen sulfide. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>
- Tai, L., Huang, C. J., Choo, K. B., Cheong, S. K., & Kamarul, T. (2020). Oxidative stress down-regulates mir-20b-5p, mir-106a-5p and E2F1 expression to suppress the G1/S transition of the cell cycle in multipotent stromal cells. *International Journal of Medical Sciences*, 17(4).
<https://doi.org/10.7150/ijms.38832>

- Tan, H. Y., Qing, B., Luo, X. M., & Liang, H. X. (2021). Downregulation of miR-223 promotes HMGB2 expression and induces oxidative stress to activate JNK and promote autophagy in an in vitro model of acute lung injury. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12950-021-00295-3>
- Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Tang, P., Xu, Y., Zhang, J., Nan, J., Zhong, R., Luo, J., Xu, D., Shi, S., & Zhang, L. (2023). miR-223-3p mediates the diabetic kidney disease progression by targeting IL6ST/STAT3 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.01.045>
- Tang, Q., Li, M. Y., Su, Y. F., Fu, J., Zou, Z. Y., Wang, Y., & Li, S. N. (2018). Absence of miR-223-3p ameliorates hypoxia-induced injury through repressing cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress by targeting KLF15. *European Journal of Pharmacology*, 841. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.10.014>
- Tobon-Velasco, J., Cuevas, E., & Torres-Ramos, M. (2014). Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF-κB Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(9). <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806144831>
- Toro, R., Pérez-Serra, A., Mangas, A., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Quezada-Feijoo, M., Ramos, M., Alcalá, M., Carrera, E., García-Padilla, C., Franco, D., & Bonet, F. (2022). miR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031036>
- Traversi, D., Rabbone, I., Scaioli, G., Vallini, C., Carletto, G., Racca, I., Ala, U., Durazzo, M., Collo, A., Ferro, A., Carrera, D., Savastio, S., Cadario, F., Siliquini, R., & Cerutti, F. (2020). Risk factors for type 1 diabetes, including environmental, behavioural and gut microbial factors: a case–control study. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74678-6>
- Vajdi, M., & Abbasalizad Farhangi, M. (2020). Alpha-lipoic acid supplementation significantly reduces the risk of obesity in an updated systematic review and dose response meta-analysis of randomised placebo-controlled clinical trials. *International Journal of Clinical Practice*, 74(6). <https://doi.org/10.1111/ijcp.13493>

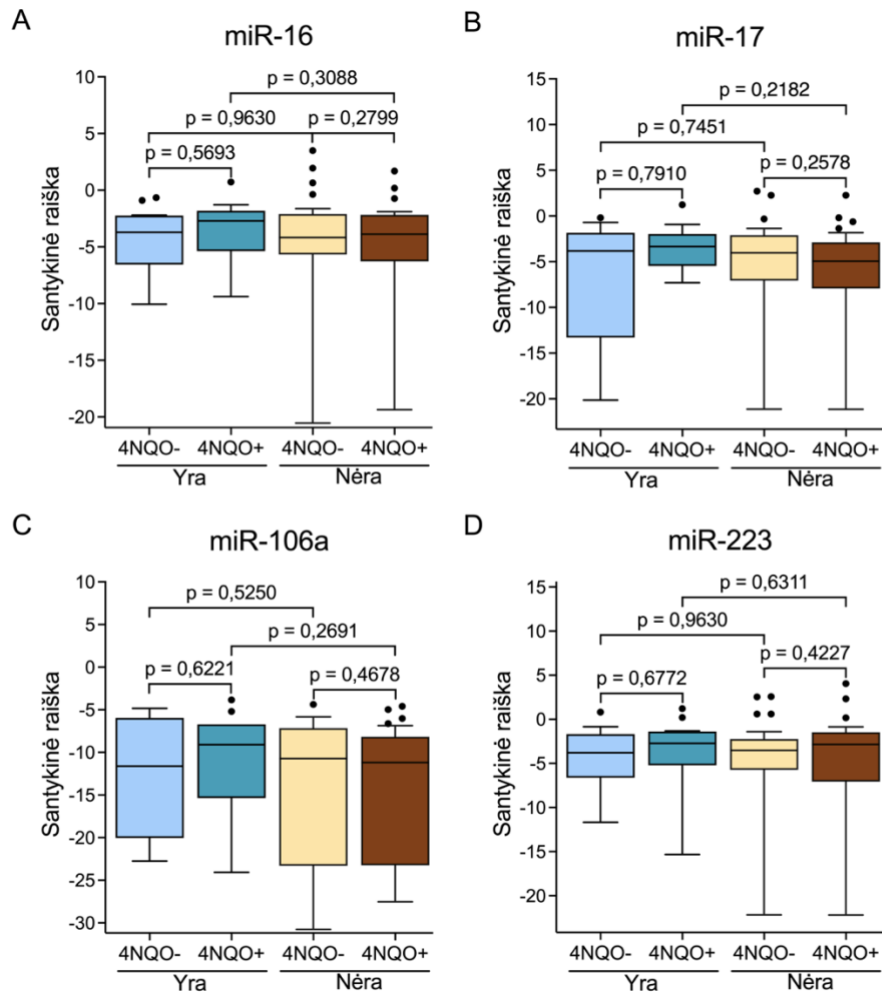
- Verma, P. (2018). Effect of alpha-lipoic acid and its Nano-formulation on streptozotocin induced diabetic neuropathy in Rats. ~ 482 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 7(1), 482–485.
www.thepharmajournal.com
- Vujosevic, S., Aldington, S. J., Silva, P., Hernández, C., Scanlon, P., Peto, T., & Simó, R. (2020). Screening for diabetic retinopathy: new perspectives and challenges. In *The Lancet Diabetes and Endocrinology* (Vol. 8, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30411-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30411-5)
- Wang, H., Zhang, L., Guo, X., Bai, Y., Li, Y. X., Sha, J., Peng, C., Wang, Y. L., & Liu, M. (2018). MiR-195 modulates oxidative stress-induced apoptosis and mitochondrial energy production in human trophoblasts via flavin adenine dinucleotide-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1 and pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit. *Journal of Hypertension*, 36(2). <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001529>
- Wang, J., Jia, Z., Zhang, C., Sun, M., Wang, W., Chen, P., Ma, K., Zhang, Y., Li, X., & Zhou, C. (2014). miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pdc4 and Pacs2. *RNA Biology*, 11(4). <https://doi.org/10.4161/rna.28300>
- Wang, L., Lin, J., Yu, T., Zuo, Q., Shen, B., Zhang, H., Liu, B., Cai, D., Mao, H., Zhao, H., Zou, Q., & Xiao, B. (2020). Identification of plasma miR-106a-5p and miR-30a-5p as potential biomarkers for mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clinical Biochemistry*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.07.001>
- Wang, M., Li, J., Cai, J., Cheng, L., Wang, X., Xu, P., Li, G., & Liang, X. (2020). Overexpression of MicroRNA-16 Alleviates Atherosclerosis by Inhibition of Inflammatory Pathways. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8504238>
- Wang, W., & Lo, A. C. Y. (2018). Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061816>
- Wang, X., Li, Z., Bai, J., Song, W., & Zhang, F. (2019). MiR-17-5p regulates the proliferation and apoptosis of human trabecular meshwork cells by targeting phosphatase and tensin homolog. *Molecular Medicine Reports*, 19(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9973>
- Wang, Z., Bao, X., Song, L., Tian, Y., & Sun, P. (2021). Role of miR-106-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oxidative stress injury and inflammatory infiltration in the liver of the mouse with gestational hypertension. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(9). <https://doi.org/10.1002/jcb.29552>
- Wei, J., Hao, Q., Chen, C., Li, J., Han, X., Lei, Z., Wang, T., Wang, Y., You, X., Chen, X., Li, H., Ding, Y., Huang, W., Hu, Y., Lin, S., Shen, H., & Lin, Y. (2020). Epigenetic repression of miR-17 contributed to di(2-ethylhexyl) phthalate-triggered insulin resistance by targeting

- Keap1-Nrf2/miR-200a axis in skeletal muscle. *Theranostics*, *10*(20).
<https://doi.org/10.7150/thno.45253>
- World Health Organization. (2020). Diagnosis and management of type 2 diabetes. *Atencion Primaria*, *42*(SUPPL. 1).
- Wu, C. T., Lidsky, P. v., Xiao, Y., Lee, I. T., Cheng, R., Nakayama, T., Jiang, S., Demeter, J., Bevacqua, R. J., Chang, C. A., Whitener, R. L., Stalder, A. K., Zhu, B., Chen, H., Goltsev, Y., Tzankov, A., Nayak, J. v., Nolan, G. P., Matter, M. S., ... Jackson, P. K. (2021). SARS-CoV-2 infects human pancreatic β cells and elicits β cell impairment. *Cell Metabolism*, *33*(8).
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.05.013>
- Wu, Y., Xu, D., Zhu, X., Yang, G., & Ren, M. (2017). MiR-106a Associated with Diabetic Peripheral Neuropathy Through the Regulation of 12/15-LOX-mediated Oxidative/Nitrative Stress. *Current Neurovascular Research*, *14*(2).
<https://doi.org/10.2174/1567202614666170404115912>
- Xia, H., Zhao, H., Yang, W., Luo, X., Wei, J., & Xia, H. (2022). MiR-195-5p represses inflammation, apoptosis, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress in sepsis-induced myocardial injury by targeting activating transcription factor 6. *Cell Biology International*, *46*(2). <https://doi.org/10.1002/cbin.11726>
- Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., Zhang, L., Ding, C., Luo, H., Li, Y., Peng, L., Zhao, L., Peng, S., Xiao, Y., Dong, S., Cao, J., & Yu, W. (2017). MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biology*, *14*(10).
<https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1112487>
- Xourgia, E., Papazafiropoulou, A., & Melidonis, A. (2018). Circulating microRNAs as biomarkers for diabetic neuropathy: A novel approach. *World Journal of Experimental Medicine*, *8*(3).
<https://doi.org/10.5493/wjem.v8.i3.18>
- Xu, J., Zhang, L., Shu, G., & Wang, B. (2019). microRNA-16-5p promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through regulating EPT1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *514*(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.179>
- Yamada, M., Kaibori, M., Tanaka, H., Habara, K., Hijikawa, T., Tanaka, Y., Oishi, M., Okumura, T., Nishizawa, M., & Kwon, A. H. (2012). A-lipoic acid prevents the induction of inos gene expression through destabilization of its mrna in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *Digestive Diseases and Sciences*, *57*(4), 943–951. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-2012-4>
- Yan, S. T., Li, C. L., Tian, H., Li, J., Pei, Y., Liu, Y., Gong, Y. P., Fang, F. S., & Sun, B. R. (2014). MiR-199a is overexpressed in plasma of type 2 diabetes patients which contributes to type 2

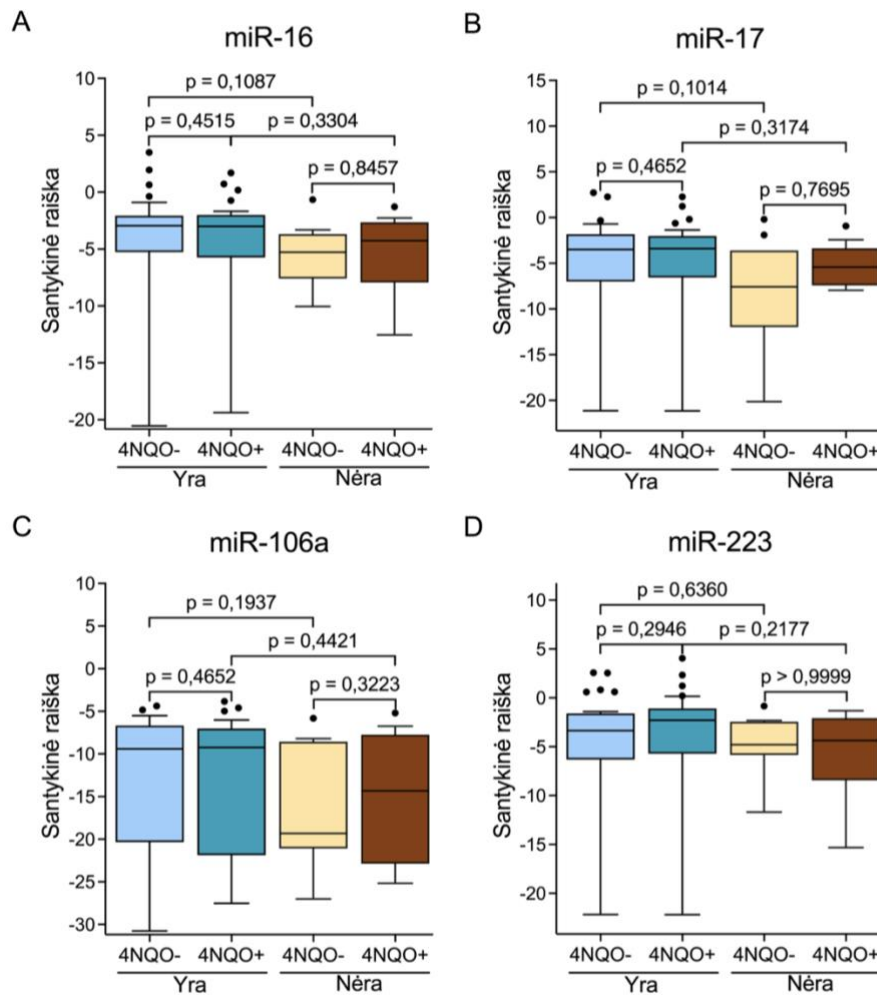
- diabetes by targeting GLUT4. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 397(1–2).
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2170-8>
- Yang, G. H., Fontaine, D. A., Lodh, S., Blumer, J. T., Roopra, A., & Davis, D. B. (2021). Tcf19 impacts a network of inflammatory and dna damage response genes in the pancreatic β -cell. *Metabolites*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/metabo11080513>
- Yang, J., Chen, Y., Jiang, K., Yang, Y., Zhao, G., Guo, S., & Deng, G. (2019). MicroRNA-106a provides negative feedback regulation in lipopolysaccharide-induced inflammation by targeting tlr4. *International Journal of Biological Sciences*, 15(11).
<https://doi.org/10.7150/ijbs.33432>
- Yang, S., Fan, T., Hu, Q., Xu, W., Yang, J., Xu, C., Zhang, B., Chen, J., & Jiang, H. (2018). Downregulation of microRNA-17-5p improves cardiac function after myocardial infarction via attenuation of apoptosis in endothelial cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(4).
<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1426-5>
- Yao, X., Pei, X., Yang, Y., Zhang, H., Xia, M., Huang, R., Wang, Y., & Li, Z. (2021). Distribution of diabetic retinopathy in diabetes mellitus patients and its association rules with other eye diseases. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96438-w>
- Yau, J. W. Y., Rogers, S. L., Kawasaki, R., Lamoureux, E. L., Kowalski, J. W., Bek, T., Chen, S.-J., Dekker, J. M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R. F., Kamran Ikram, M., Kayama, T., Klein, B. E. K., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O 'hare, J. P., ... Wong, T. Y. (2012). Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy FOR THE META-ANALYSIS FOR EYE DISEASE (META-EYE) STUDY GROUP*. *Diabetes Care*, 35(3).
- Ye, D., Zhang, T., Lou, G., Xu, W., Dong, F., Chen, G., & Liu, Y. (2018). Plasma miR-17, miR-20a, miR-20b and miR-122 as potential biomarkers for diagnosis of NAFLD in type 2 diabetes mellitus patients. *Life Sciences*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.029>
- Ying, Z., Kampfrath, T., Sun, Q., Parthasarathy, S., & Rajagopalan, S. (2011). Evidence that α -lipoic acid inhibits NF- κ B activation independent of its antioxidant function. *Inflammation Research*, 60(3). <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0256-7>
- Zajec, A., Trebušak Podkrajšek, K., Tesovnik, T., Šket, R., Čugalj Kern, B., Jenko Bizjan, B., Šmigoc Schweiger, D., Battelino, T., & Kovač, J. (2022). Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. In *Genes* (Vol. 13, Issue 4). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/genes13040706>
- Zand, H., Morshedzadeh, N., & Naghashian, F. (2017). Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.03.006>

- Zapała, B., Kamińska, A., Piwowar, M., Paziewska, A., Gala-Błądzińska, A., & Stepień, E. (2023). miRNA Signature of Urine Extracellular Vesicles Shows the Involvement of Inflammatory and Apoptotic Processes in Diabetic Chronic Kidney Disease. *Pharmaceutical Research*.
<https://doi.org/10.1007/s11095-023-03481-5>
- Zhan, Y., Guo, Z., Zheng, F., Zhang, Z., Li, K., Wang, Q., Wang, L., Cai, Z., Chen, N., Wu, S., & Li, H. (2020). Reactive oxygen species regulate miR-17-5p expression via DNA methylation in paraquat-induced nerve cell damage. *Environmental Toxicology*, 35(12).
<https://doi.org/10.1002/tox.23001>
- Zhang, H., Colclough, K., Gloyn, A. L., & Pollin, T. I. (2021). Monogenic diabetes: A gateway to precision medicine in diabetes. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 131, Issue 3).
<https://doi.org/10.1172/JCI142244>
- Zhang, M. W., Shen, Y. J., Shi, J., & Yu, J. G. (2021). MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases: A Biomarker and Potential Therapeutic Target. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.610561>
- Zhao, L., & Hu, F. X. (2014). α -Lipoic acid treatment of aged type 2 diabetes mellitus complicated with acute cerebral infarction. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(23).
- Zhou, S. S., Jin, J. P., Wang, J. Q., Zhang, Z. G., Freedman, J. H., Zheng, Y., & Cai, L. (2018). MiRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges review-article. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 39, Issue 7).
<https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>
- Zhou, Z., Wan, J., Hou, X., Geng, J., Li, X., & Bai, X. (2017). MicroRNA-27a promotes podocyte injury via PPAR γ -mediated β -catenin activation in diabetic nephropathy. *Cell Death and Disease*, 8(3). <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.74>
- Ziegler, D., Papanas, N., Schnell, O., Nguyen, B. D. T., Nguyen, K. T., Kulkantrakorn, K., & Deerochanawong, C. (2021). Current concepts in the management of diabetic polyneuropathy. In *Journal of Diabetes Investigation* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/jdi.13401>
- Ziegler, D., Papanas, N., Zhivov, A., Allgeier, S., Winter, K., Ziegler, I., Brüggemann, J., Strom, A., Peschel, S., Köhler, B., Stachs, O., Guthoff, R. F., & Roden, M. (2014). Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes*, 63(7). <https://doi.org/10.2337/db13-1819>

PRIEDAI



1 priedas. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal išeminės širdies ligos (IŠL) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - – 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškusių komplikacijų. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.



2 priedas. MiRNR raiškos palyginimas II tipo cukriniu diabetu sergančių ligonių leukocituose pagal širdies nepakankamumo (ŠN) pasireiškimą. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. 4NQO+ / - - 4-nitrochinolino 1-oksidu veikti / neveikti leukocitai. Yra / Nėra – ligoniai su / be pasireiškiosios komplikacijos. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje. Statistiškai patikimų p verčių nebuvo.

3 priedas. MiRNR raiškos sąsajos cukriniu diabetu sergančiųjų leukocituose prieš gydymą α -lipoine rūgštimi ir 4-nitrochinolino 1-oksido poveikį su klinikiniais ir biocheminiais rodikliais.

Rodiklis		miR-16	miR-17	miR-27a	miR-29a	miR-106a	miR-128	miR-146a	miR-152	miR-155	miR-195	miR-210	miR-222	miR-223	miR-499a
Klinikiniai rodikliai															
Diabeto trukmė	r	-0,17	-0,19	-0,30	-0,18	0,01	0,33	0,24	0,25	0,01	0,02	0,31	0,44	0,19	-0,37
	p	0,6107	0,5824	0,3689	0,6012	0,9788	0,3247	0,4831	0,4659	0,9788	0,9470	0,3465	0,1736	0,5824	0,2578
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,44	-0,50	-0,19	-0,25	-0,40	0,06	-0,31	-0,16	-0,34	-0,38	0,25	0,28	-0,34	-0,37
	p	0,2009	0,1394	0,5897	0,4776	0,2559	0,8694	0,3759	0,6643	0,3408	0,2759	0,4776	0,4382	0,3408	0,2863
Sistolinis kraujo spaudimas	r	-0,16	-0,15	0,14	-0,11	-0,18	-0,20	-0,12	-0,29	-0,30	-0,49	0,23	0,16	-0,16	0,04
	p	0,6283	0,6674	0,6873	0,7478	0,5900	0,5619	0,7275	0,3820	0,3743	0,1222	0,4985	0,6478	0,6478	0,9149
Diastolinis kraujo spaudimas	r	0,16	0,10	0,32	0,08	0,07	-0,02	-0,14	-0,22	0,02	-0,06	0,72	0,07	0,07	-0,37
	p	0,6407	0,7635	0,3333	0,8163	0,8270	0,9565	0,6910	0,5254	0,9456	0,8591	0,0117	0,8270	0,8484	0,2637
Pulsas	r	-0,06	-0,13	-0,02	-0,23	-0,38	-0,11	0,21	0,18	-0,33	-0,29	-0,27	0,38	0,10	-0,06
	p	0,8624	0,7079	0,9469	0,4995	0,2442	0,7586	0,5263	0,5909	0,3165	0,3910	0,4231	0,2504	0,7688	0,8624
Biocheminiai rodikliai															
HbA1c	r	0,05	0,05	-0,07	0,28	-0,23	0,00	0,22	0,12	0,13	0,07	0,00	0,51	0,19	-0,12
	p	0,8939	0,8939	0,8413	0,4339	0,5208	1,0000	0,5321	0,7379	0,7253	0,8413	1,0000	0,1315	0,5902	0,7379
Bendras cholesterolis	r	0,21	0,32	0,29	0,11	0,04	-0,32	0,32	-0,07	0,07	-0,07	-0,39	-0,32	0,21	0,57
	p	0,6445	0,4821	0,5345	0,8192	0,9394	0,4821	0,4821	0,8790	0,8790	0,8790	0,3833	0,4821	0,6445	0,1802
Trigliceridai	r	-0,14	0,00	0,00	-0,04	-0,07	-0,32	0,29	0,25	-0,14	-0,32	-0,43	0,04	0,14	0,61
	p	0,7599	1,0000	1,0000	0,9394	0,8790	0,4821	0,5345	0,5887	0,7599	0,4821	0,3374	0,9394	0,7599	0,1482
DTL	r	0,25	0,36	0,07	0,36	0,29	-0,32	-0,04	-0,36	0,36	0,43	0,54	-0,54	-0,07	-0,18
	p	0,5887	0,4316	0,8790	0,4316	0,5345	0,4821	0,9394	0,4316	0,4316	0,3374	0,2152	0,2152	0,8790	0,7017
MTL	r	0,18	0,21	0,21	-0,07	-0,14	-0,39	0,18	-0,21	-0,07	-0,14	-0,54	-0,46	0,07	0,46
	p	0,7017	0,6445	0,6445	0,8790	0,7599	0,3833	0,7017	0,6445	0,8790	0,7599	0,2152	0,2939	0,8790	0,2939
Kreatininas	r	0,28	0,19	0,03	0,17	0,03	-0,43	-0,25	0,61	0,11	0,61	-0,35	-0,37	-0,09	-0,19
	p	0,4011	0,5739	0,9366	0,6115	0,9366	0,1899	0,4669	0,0467	0,7495	0,0467	0,2981	0,2589	0,7904	0,5739
GFG	r	-0,68	-0,66	-0,39	-0,56	-0,45	-0,27	-0,42	-0,20	-0,67	-0,71	-0,01	-0,12	-0,59	-0,11
	p	0,0204	0,0269	0,2393	0,0758	0,1638	0,4242	0,1994	0,5637	0,0242	0,0142	0,9788	0,7287	0,0573	0,7388

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, GFG – glomerulų filtracijos greitis, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p reikšmės paryškintos.

4 priedas. MiRNR raiškos sąsajos cukriniu diabetu sergančiųjų leukocituose prieš gydymą α -lipoine rūgštimi ir po 4-nitrochinolino 1-oksido poveikio su klinikiniais ir biocheminiais rodikliais.

Rodiklis		miR-16	miR-17	miR-27a	miR-29a	miR-106a	miR-128	miR-146a	miR-152	miR-155	miR-195	miR-210	miR-222	miR-223	miR-499a
Klinikiniai rodikliai															
Diabeto trukmė	r	-0,27	0,18	-0,15	-0,07	0,24	0,12	0,40	-0,29	0,20	-0,13	0,49	0,30	0,36	0,36
	p	0,4242	0,6012	0,6689	0,8313	0,4744	0,7287	0,2275	0,3921	0,5545	0,7086	0,1283	0,3766	0,2769	0,2705
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,69	-0,19	-0,04	-0,15	-0,30	-0,37	-0,58	-0,38	-0,56	-0,63	-0,02	-0,44	-0,29	-0,25
	p	0,0275	0,5897	0,9019	0,6795	0,4003	0,2863	0,0761	0,2759	0,0910	0,0513	0,9509	0,2009	0,4127	0,4776
Sistolinis kraujo spaudimas	r	-0,57	-0,54	0,15	-0,36	-0,65	-0,34	-0,33	-0,49	-0,75	-0,65	-0,40	-0,44	-0,39	-0,59
	p	0,0659	0,0896	0,6674	0,2746	0,0320	0,3014	0,3153	0,1304	0,0084	0,0289	0,2194	0,1763	0,2370	0,0558
Diastolinis kraujo spaudimas	r	-0,04	0,01	-0,20	-0,08	-0,02	-0,61	-0,27	0,20	-0,10	0,06	-0,13	-0,27	-0,13	-0,24
	p	0,9131	0,9782	0,5629	0,8057	0,9565	0,0473	0,4200	0,5534	0,7635	0,8699	0,7115	0,4283	0,7115	0,4714
Pulsas	r	-0,57	-0,43	0,36	-0,51	-0,45	0,10	0,26	-0,43	-0,53	-0,59	-0,10	0,08	-0,14	-0,20
	p	0,0694	0,1825	0,2758	0,1116	0,1676	0,7688	0,4479	0,1825	0,0972	0,0565	0,7688	0,8101	0,6879	0,5536
Biocheminiai rodikliai															
HbA1c	r	-0,29	0,26	0,18	-0,19	0,22	-0,11	-0,22	0,13	-0,27	-0,24	0,23	-0,16	0,04	-0,50
	p	0,4133	0,4765	0,6141	0,5902	0,5436	0,7635	0,5321	0,7126	0,4444	0,5096	0,5208	0,6505	0,9203	0,1369
Bendras cholesterolis	r	0,39	-0,25	0,18	-0,50	0,04	0,29	0,36	0,39	0,07	0,39	-0,46	0,07	0,11	-0,32
	p	0,3833	0,5887	0,7017	0,2532	0,9394	0,5345	0,4316	0,3833	0,8790	0,3833	0,2939	0,8790	0,8192	0,4821
Trigliceridai	r	0,00	-0,36	0,07	-0,64	-0,18	0,29	0,39	0,14	-0,14	-0,07	-0,54	0,07	0,25	-0,71
	p	1,0000	0,4316	0,8790	0,1194	0,7017	0,5345	0,3833	0,7599	0,7599	0,8790	0,2152	0,8790	0,5887	0,0713
DTL	r	0,79	0,68	0,43	0,29	0,50	-0,46	-0,18	0,07	0,36	0,57	0,29	-0,29	-0,04	0,21
	p	0,0362	0,0938	0,3374	0,5345	0,2532	0,2939	0,7017	0,8790	0,4316	0,1802	0,5345	0,5345	0,9394	0,6445
MTL	r	0,36	-0,39	0,14	-0,57	-0,07	0,32	0,32	0,36	-0,07	0,43	-0,57	0,00	-0,11	-0,21
	p	0,4316	0,3833	0,7599	0,1802	0,8790	0,4821	0,4821	0,4316	0,8790	0,3374	0,1802	1,0000	0,8192	0,6445
Kreatininas	r	0,78	0,47	-0,17	0,35	0,45	-0,08	0,14	0,73	0,54	0,71	-0,03	0,42	0,15	0,23
	p	0,0045	0,1420	0,6115	0,2847	0,1601	0,8110	0,6893	0,0112	0,0890	0,0146	0,9366	0,2006	0,6696	0,5015
GFG	r	-0,66	-0,53	0,17	-0,26	-0,73	-0,21	-0,28	-0,80	-0,72	-0,84	-0,25	-0,42	-0,26	-0,32
	p	0,0269	0,0947	0,6107	0,4406	0,0109	0,5272	0,4080	0,0030	0,0117	0,0011	0,4574	0,1941	0,4490	0,3391

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, GFG – glomerulų filtracijos greitis, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p reikšmės paryškintos.

5 priedas. MiRNR raiškos sąsajos cukriniu diabetu sergančiųjų leukocituose po gydymo α -lipoine rūgštimi ir prieš 4-nitrochinolino 1-oksido poveikį su klinikiniais ir biocheminiais rodikliais.

Rodiklis		miR-16	miR-17	miR-27a	miR-29a	miR-106a	miR-128	miR-146a	miR-152	miR-155	miR-195	miR-210	miR-222	miR-223	miR-499a
Klinikiniai rodikliai															
Diabeto trukmė	r	0,06	0,39	-0,04	0,21	0,56	0,27	0,13	0,38	0,16	0,11	0,27	0,22	0,21	0,50
	p	0,8522	0,2334	0,9047	0,5454	0,0702	0,4160	0,6986	0,2515	0,6299	0,7490	0,4160	0,5183	0,5272	0,1163
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,25	-0,03	-0,17	0,04	-0,11	0,30	0,06	-0,15	-0,19	-0,11	0,05	-0,15	-0,04	0,07
	p	0,4776	0,9345	0,6341	0,9182	0,7573	0,4003	0,8694	0,6795	0,6044	0,7573	0,8856	0,6795	0,9019	0,8370
Sistolinis kraujo spaudimas	r	-0,08	-0,10	-0,08	-0,16	-0,43	0,12	0,01	-0,60	-0,40	-0,25	0,14	-0,17	-0,10	-0,30
	p	0,8201	0,7683	0,8097	0,6478	0,1866	0,7174	0,9680	0,0512	0,2194	0,4552	0,6773	0,6091	0,7683	0,3666
Diastolinis kraujo spaudimas	r	0,09	0,15	-0,04	-0,07	0,02	0,15	0,13	-0,21	-0,21	0,14	0,13	-0,25	-0,03	0,35
	p	0,7845	0,6607	0,9022	0,8377	0,9565	0,6506	0,7115	0,5347	0,5440	0,6707	0,7115	0,4626	0,9239	0,2974
Pulsas	r	0,10	-0,02	0,06	-0,09	-0,14	0,08	-0,09	-0,35	-0,37	-0,30	0,11	0,00	0,04	-0,21
	p	0,7688	0,9575	0,8519	0,7998	0,6879	0,8101	0,7998	0,2890	0,2566	0,3754	0,7484	0,9894	0,9151	0,5444
Biocheminiai rodikliai															
HbA1c	r	-0,02	0,12	0,12	0,06	0,21	-0,15	-0,16	-0,12	-0,05	0,16	0,14	0,07	-0,18	-0,34
	p	0,9601	0,7507	0,7507	0,8675	0,5551	0,6876	0,6628	0,7379	0,8807	0,6505	0,7001	0,8413	0,6141	0,3358
Bendras cholesterolis	r	0,07	-0,18	-0,04	-0,36	-0,32	-0,29	-0,18	-0,54	-0,32	-0,14	-0,11	0,04	-0,07	-0,46
	p	0,8790	0,7017	0,9394	0,4316	0,4821	0,5345	0,7017	0,2152	0,4821	0,7599	0,8192	0,9394	0,8790	0,2939
Trigliceridai	r	-0,21	-0,07	0,00	-0,36	-0,36	-0,29	-0,25	-0,75	-0,64	-0,36	0,14	0,14	-0,07	-0,71
	p	0,6445	0,8790	1,0000	0,4316	0,4316	0,5345	0,5887	0,0522	0,1194	0,4316	0,7599	0,7599	0,8790	0,0713
DTL	r	0,14	-0,25	-0,07	-0,07	0,18	-0,61	-0,14	0,29	0,50	0,39	-0,32	-0,39	-0,61	0,36
	p	0,7599	0,5887	0,8790	0,8790	0,7017	0,1482	0,7599	0,5345	0,2532	0,3833	0,4821	0,3833	0,1482	0,4316
MTL	r	0,00	-0,32	-0,21	-0,50	-0,46	-0,25	-0,29	-0,57	-0,36	-0,25	-0,25	-0,04	-0,11	-0,50
	p	1,0000	0,4821	0,6445	0,2532	0,2939	0,5887	0,5345	0,1802	0,4316	0,5887	0,5887	0,9394	0,8192	0,2532
Kreatininas	r	-0,03	-0,07	0,17	-0,11	0,14	-0,38	-0,57	0,15	-0,15	0,13	-0,38	-0,30	-0,29	0,07
	p	0,9366	0,8317	0,6115	0,7495	0,6893	0,2466	0,0655	0,6696	0,6500	0,7092	0,2466	0,3701	0,3855	0,8317
GFG	r	-0,47	-0,35	-0,37	-0,25	-0,55	0,08	-0,18	-0,54	-0,44	-0,62	-0,17	-0,31	-0,16	-0,09
	p	0,1410	0,2969	0,2578	0,4659	0,0818	0,8106	0,5918	0,0881	0,1736	0,0401	0,6203	0,3614	0,6299	0,8002

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, GFG – glomerulų filtracijos greitis, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p reikšmės paryškintos.

6 priedas. MiRNR raiškos sąsajos cukriniu diabetu sergančiųjų leukocituose po gydymo α -lipoine rūgštimi ir 4-nitrochinolino 1-oksido poveikio su klinikiniais ir biocheminiais rodikliais.

Rodiklis		miR-16	miR-17	miR-27a	miR-29a	miR-106a	miR-128	miR-146a	miR-152	miR-155	miR-195	miR-210	miR-222	miR-223	miR-499a
Klinikiniai rodikliai															
Diabeto trukmė	r	0,28	0,09	0,10	-0,01	-0,09	-0,05	0,48	0,10	0,08	0,39	0,04	0,13	0,21	0,37
	p	0,4000	0,8002	0,7796	0,9682	0,7899	0,8837	0,1324	0,7591	0,8209	0,2334	0,9153	0,7086	0,5454	0,2578
Blogos glikemijos kontrolės trukmė	r	-0,09	0,11	-0,13	0,32	-0,03	-0,04	0,10	0,15	0,16	-0,07	0,09	0,24	0,50	0,11
	p	0,8049	0,7573	0,7103	0,3640	0,9345	0,9182	0,7890	0,6795	0,6643	0,8532	0,8049	0,5047	0,1394	0,7573
Sistolinis kraujo spaudimas	r	-0,27	-0,11	-0,28	-0,01	-0,11	0,04	-0,13	-0,06	-0,25	-0,46	0,02	0,11	0,13	-0,18
	p	0,4219	0,7376	0,3978	0,9787	0,7376	0,9149	0,7073	0,8620	0,4638	0,1523	0,9468	0,7581	0,6973	0,5995
Diastolinis kraujo spaudimas	r	0,29	0,23	0,04	0,08	0,28	0,46	-0,22	-0,25	-0,22	0,03	0,47	-0,32	0,22	0,09
	p	0,3873	0,4981	0,9131	0,8057	0,4035	0,1517	0,5254	0,4539	0,5071	0,9348	0,1426	0,3408	0,5162	0,7845
Pulsas	r	-0,44	-0,24	-0,31	-0,33	-0,48	-0,44	-0,29	0,39	-0,17	-0,56	-0,54	0,13	-0,33	0,12
	p	0,1775	0,4734	0,3527	0,3236	0,1314	0,1775	0,3910	0,2322	0,6195	0,0722	0,0841	0,7079	0,3236	0,7281
Biocheminiai rodikliai															
HbA1c	r	-0,22	0,27	-0,05	0,11	0,09	0,09	-0,15	0,47	0,30	-0,24	0,21	0,41	0,14	-0,01
	p	0,5436	0,4444	0,8939	0,7635	0,8152	0,8022	0,6876	0,1725	0,3932	0,5096	0,5667	0,2427	0,7001	0,9867
Bendras cholesterolis	r	-0,43	-0,36	-0,29	-0,68	-0,25	-0,11	-0,54	-0,39	-0,57	-0,64	-0,25	-0,29	-0,75	-0,43
	p	0,3374	0,4316	0,5345	0,0938	0,5887	0,8192	0,2152	0,3833	0,1802	0,1194	0,5887	0,5345	0,0522	0,3374
Trigliceridai	r	-0,61	-0,39	-0,54	-0,64	-0,21	-0,07	-0,50	-0,50	-0,68	-0,71	-0,07	-0,11	-0,50	-0,79
	p	0,1482	0,3833	0,2152	0,1194	0,6445	0,8790	0,2532	0,2532	0,0938	0,0713	0,8790	0,8192	0,2532	0,0362
DTL	r	0,36	0,32	0,46	0,04	0,00	0,25	0,32	0,21	0,18	0,14	0,32	0,39	-0,14	0,36
	p	0,4316	0,4821	0,2939	0,9394	1,0000	0,5887	0,4821	0,6445	0,7017	0,7599	0,4821	0,3833	0,7599	0,4316
MTL	r	-0,50	-0,46	-0,32	-0,75	-0,43	-0,25	-0,61	-0,36	-0,61	-0,71	-0,46	-0,39	-0,86	-0,36
	p	0,2532	0,2939	0,4821	0,0522	0,3374	0,5887	0,1482	0,4316	0,1482	0,0713	0,2939	0,3833	0,0137	0,4316
Kreatininas	r	0,11	0,30	0,29	-0,05	0,09	0,11	-0,43	0,25	0,08	0,12	0,06	-0,12	-0,27	-0,02
	p	0,7495	0,3701	0,3855	0,8944	0,7904	0,7495	0,1899	0,4500	0,8110	0,7293	0,8525	0,7293	0,4171	0,9577
GFG	r	-0,36	-0,33	-0,41	-0,04	-0,46	-0,46	0,11	-0,21	-0,22	-0,33	-0,31	0,26	0,01	-0,28
	p	0,2705	0,3176	0,2049	0,9047	0,1591	0,1498	0,7490	0,5454	0,5094	0,3176	0,3614	0,4324	0,9682	0,4000

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, GFG – glomerulų filtracijos greitis, r – Spearman koreliacijos koeficientas. Statistiškai patikimos p reikšmės paryškintos.