

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.717>

<https://orcid.org/0009-0005-7098-736X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Laura Šiaulienė

Citogenetinių ir epigenetinių žymenų tyrimas diabetu sergančių pacientų limfocituose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija N 010

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2018–2023 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomokslai, biologija – N 010).

Mokslinė konsultantė

Doc. dr. Žydrūnė Visockienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

Prof. dr. Laima Ambrozaitytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Prof. dr. Vytautas Kasiulevičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

Doc. dr. Jurga Laurenčikienė (Karolinska institutas, Švedija, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. sausio mėn. 15 d. 13:00 val. Gyvybės mokslų centras R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva. tel. +37052234419; el. paštas info@gmc.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Laura Šiaulienė

Analysis of Cytogenetic and Epigenetic Markers in Lymphocytes of Patients with Diabetes

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology N 010

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2018 and 2023 at the at the Institute of Biosciences of the Life Sciences Center of Vilnius University

Academic supervisor

Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Academic consultant

Dr. Žydrūnė Visockienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Laima Ambrozaitytė (Vilnius University, Natural sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Vytautas Kasiulevičius (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Prof. Dr. Jurga Laurenčikienė (Karolinska Institute, Sweden, Natural Sciences, Biology - N 010),

Prof. Dr. Donatas Žvingila (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 PM on 15 January 2025 in meeting room R401 of the Life Sciences Center. Address: 7 Saulėtekio av., Vilnius, Lithuania. Tel. +37052234419; e-mail:info@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ALR – α -lipoinė rūgštis
AH – arterinė hipertenzija
AKRT – autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimas
AKS – arterinis kraujo spaudimas
BrdU – 5-bromo-2-deoksiuridinas
CA – chromosomų aberacijos
CBMN – mikrobranduolių dvibranduoliuose limfocituose tyrimo metodas
CD – cukrinis diabetas
CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas
CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas
CTA – chromatidinio tipo aberacijos
CSA – chromosominio tipo aberacijos
CTB – chromatidiniai trūkiai
CTE – chromatidiniai mainai
CSB – chromosominiai trūkiai
CSE – chromosominiai mainai
DN – diabetinė neuropatija
DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija
DTL – didelio tankio lipoproteinai
ENG – elektroneurografija
GGP – galiniai glikozilinimo produktai
GFG – glomerulų filtracijos greitis
IŠL – išeminė širdies liga
HbA1c – glikozilintas hemoglobinas
HFC (angl. *high frequency cells*) – aukšto seserinių chromatidžių mainų dažnio ląstelės,
KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija
KMI – kūno masės indeksas
KVL – kardiovaskulinės ligos
kPGR – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija
KV – kardiovaskulinis/ė
LR – laisvieji radikalai
MB – mikrobranduoliai
MB-IND – indukuoti mikrobranduoliai
MI – miokardo infarktas
MS – metabolinis sindromas

MTL – mažo tankio lipoproteinai

NM – neurometrija

NNS – Neuropatijos negalios skalė

NSS – Neuropatijos simptomų skalės klausimynas

PAH – pirminė arterinė hipertenzija

SCM – seserinių chromatidžių mainai

SCM-IND – mutagenu (4-nitrochinolino-1-oksidu) indukuoti seserinių chromatidžių mainai

ŠSD – širdies susitraukimų dažnis

4NQO – 4-nitrochinolino-1-oksidas

8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas

TURINYS

IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Cukrinis diabetas	14
1.2. Cukrinio diabeto komplikacijos.....	17
1.2.1. Makrovaskulinės komplikacijos ir jų rizikos veiksniai	17
1.2.2. Mikrovaskulinės komplikacijos, jų rizikos veiksniai ir diagnostika	18
1.2.3. Diabeto komplikacijų patogenezė.....	27
1.2.4. Diabeto komplikacijų gydymas	31
1.3. Citogenetiniai ir epigenetiniai diabeto ir jo komplikacijų žymenys	34
1.3.1. DNR pažaidos	35
1.3.2. Chromosomų pažaidos.....	42
1.3.3. MiRNR	45
2. METODAI.....	48
2.1. Įtraukimo kriterijai ir klinikinis ištyrimas	48
2.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino nustatymas kraujo plazmoje	53
2.3. Citogenetiniai tyrimai	53
2.4. MiRNR tyrimai.....	59
2.5. Statistinė analizė.....	61
3. REZULTATAI	63
3.1. Tiriamųjų charakteristika ir klinikinio ištyrimo rezultatai.....	63
3.2. Genetinių ir epigenetinių žymenų tyrimas.....	77
3.2.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino kiekio diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų DNR kraujo plazmoje tyrimų rezultatai	77
3.2.2. Sėserinių chromatidžių mainų dažnis diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose	85
3.2.3. Mikrobranduolių dažnis diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose.....	93

3.2.4. Jautrumo mutagenui tyrimas sergančiųjų diabetu ir kontrolinių asmenų grupėse	103
3.2.5. Chromosomų aberacijų dažnis diabetų sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose.....	110
3.3. Gydomo α -lipoine rūgštimi įtaka klinikiams rodikliams, genetiškai ir epigenetiškai žymenims.....	139
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	144
IŠVADOS.....	160
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	162
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	195
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ.....	196
PADĖKA.....	197
PRIEDAI	199
SANTRAUKA	228

IVADAS

Sergamumas cukriniu diabetu (CD) sparčiai didėja – šiuo metu pasaulyje vienas iš 10-ies suaugusiųjų serga CD [1]. CD ypač grėsmingas sukeliamomis komplikacijomis. Diabetinės mikrovaskulinės komplikacijos yra vienos dažniausių pacientų aklumo, inkstų funkcijos nepakankamumo ir dializės būtinybės, kojų opų ir netrauminių kojų amputacijų priežasčių [2–4]. Mirštamumas nuo pačios dažniausios diabeto komplikacijos - distalinės simetrinės polineuropatijos (DSPN) - dažnai lenkia onkologinių pacientų mirštamumą. Pavyzdžiui, diabetu sergančių pacientų su neuropatine, neuroišemine ir išemine opomis 5 metų mirštamumas atitinkamai siekia 45 %, 18 % ir 55 % [5], 10-ies metų mirštamumas su diabetine opa siekia 71 % [6]. Maždaug pusė pacientų po diabeto sąlygotos galūnės amputacijos neišgyvena 5-erių metų, ir šie skaičiai lenkia pacientų su prostatos, krūties, storosios žarnos vėžio, Hodžkino limfomos mirštamumą [7]. Išlaidos diabetinei pėdai gydyti taip pat dažnu atveju yra didesnės nei krūties, plaučių ir prostatos vėžio gydymą kartu sudėjus [8].

Pasaulinė sveikatos organizacija CD pripažino viena svarbiausių negalios ir mirties priežasčių ir įtraukė į prioritetinių neužkrečiamų ligų sąrašą, siekdama sumažinti sergamumą CD ir CD komplikacijomis, pasitelkiant mokslu pagrįstas rekomendacijas [9].

Nepaisant daugelio tyrimų, CD komplikacijų rizikos veiksniai ir patogenezė lieka nepilnai išaiškinti. Pavyzdžiui, nors klasikinių rizikos veiksnių (hiperglikemijos, diabeto trukmės) reikšmė diabeto komplikacijų išsivystymui įrodyta, apie kai kuriuos kitus rizikos veiksnius trūksta duomenų arba jie prieštaringi: nutukimas didina pirmojo tipo cukriniu diabetu (CD1) ir antrojo tipo cukriniu diabetu (CD2) sergantiems pacientams diabetinės nefropatijos [10,11] ir distalinės simetrinės polineuropatijos (DSPN) [12–15] riziką, tačiau nutukimo ir diabetinės retinopatijos ryšys CD pacientams nepatvirtintas [16]; dislipidemija didina diabetinės nefropatijos riziką CD1 ir CD2 pacientams [17, 18]. Tyrimų duomenys dėl dislipidemijos ryšio su DSPN skiriasi – vienuose tyrimuose nustatyta teigiama DSPN sąsaja su dislipidemija CD1 [12] ir CD2 pacientams [12, 14, 19–21], o kituose – ši sąsaja nepatvirtinta [22–25]. Viena tyrimuose nustatyta teigiama dislipidemijos ir diabetinės retinopatijos sąsaja CD1 ir CD2 pacientams [26], tačiau kituose tyrimuose ši sąsaja nestebėta [27,28]. Arterinės hipertenzijos ir DSPN ryšys vieningai patvirtintas CD1 pacientams [12, 29], bet ne CD2 pacientams [22, 23, 30, 31].

Minėti rizikos veiksniai kartu su hiperglikemija didina laisvųjų radikalų kiekį (LR) organizme, o oksidacinis stresas (OS) pažeidžia ląstelių

mitochondrijas, endoplazminį tinklą ir baltymus, sukelia oksidacines DNR pažaidas ir genomo nestabilumą [32]. Tačiau duomenys apie įvairaus pobūdžio DNR pažaidų žymenis (seserinių chromatidžių mainų (SCM), chromosomų aberacijų (CA), mikrobranduolių (MB) dažnį CD pacientams, palyginti su sveikais asmenimis, ir DNR pažaidų dažnio sąsajas su klinikiniais rodikliais yra prieštaringi: vienuose tyrimuose CD pacientams, palyginti su kontroline grupe, nustatytas didesnis SCM dažnis [33, 33, 34], tačiau kituose tyrimuose tokio skirtumo nestebėta [35]; kai kuriuose tyrimuose stebėta teigiama sąsaja tarp SCM ir glikozilinto hemoglobino (HbA1c) [36], tačiau kituose, priešingai, toks ryšys nenustatytas [33]; vienuose tyrimuose nustatytas didesnis CA dažnis CD pacientams, palyginti su kontroline grupe [37–39], tačiau kituose toks skirtumas nenustatytas [33, 35, 40]. Klinikinių tyrimų, vertinančių SCM ir CA ryšį su klinikiniais CD rodikliais, trūksta, o vertinančių šių žymenų sąsajas su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis apskritai nėra atlikta [41]. MB dažnis iš visų DNR pažaidų daugiausiai ištirtas CD pacientų populiacijoje. Palyginus su sveikais asmenimis, CD2 pacientams nustatytas didesnis MB dažnis [32, 42], taip pat nustatytas teigiamas ryšys tarp MB dažnio ir CD progresavimo [43], CD trukmės [44, 45] ir blogos glikemijos kontrolės [42, 44, 46, 47], diabetinės nefropatijos [45] ir DSPN [44]. Didžioji dalis MB tyrimų atlikti su CD2 pacientais, o tyrimų, patvirtinančių MB dažnio sąsajas su CD1, taip pat platesnių tyrimų su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis, trūksta [32, 48].

Daugėja duomenų apie epigenetinių veiksnių įtaką CD ir diabeto komplikacijų išsivystymui. Tyrimuose nustatytos tam tikros miRNR, susijusios su likutine kasos β -ląstelių funkcija, prediabeto ir CD rizika [49–53], diabeto kontrole [54] ir diabetinėmis komplikacijomis [55]. MiRNR galėtų būti taikomos kaip biožymenys ankstyvai diabeto diagnostikai, ligos kontrolės, gydymo ir diabeto komplikacijų vertinimui, tačiau tam reikalingi tolesni tyrimai.

Nors DSPN yra dažniausia mikrovaskulinė diabeto komplikacija, duomenų apie DSPN sąsajas su DNR pažaidomis CD pacientams yra mažiausiai, palyginti su kitomis komplikacijomis [44], nes iki šiol nėra standartizuoto ištyrimo diagnozuojant šią komplikaciją [56]. Tyrimų apie kardiovaskulinės autonominės neuropatijos (KAN) sąsajas su DNR pažaidomis CD pacientams apskritai nėra atlikta, nes pacientų ištyrimas imlus laikui, reikalinga speciali įranga ir personalas, mokantis ja naudotis [57].

Simptominis DSPN gydymas menkai sėkmingas, o patogenetiniame gydyme naudojamos α -lipinės rūgštys (ALR) efektyvumas įvairių tyrimų

duomenimis skiriasi. Taip pat nėra aiškių gairių dėl ALR vartojimo trukmės.

Šiame darbe siekiama detaliai įvertinti CD pacientų klinikinę būklę, instrumentiniais tyrimais įvertinti DSPN ir KAN ir susieti su genetinių ir epigenetinių tyrimų rezultatais, taip pat įvertinti infuzinės ALR poveikį CD pacientų skausmo jutimui ir įtaką DNR pažeidimams.

Tyrimo tikslas

Įvertinti ir palyginti CD sergančių pacientų ir kontrolinių diabetu nesergančių asmenų (kontrolinės grupės) DNR pažeidimų biožymenis ir juos susieti su tiriamųjų klinikiniais rodikliais.

Tyrimo uždaviniai

1. CD pacientus ištirti instrumentiniais metodais dėl diabetinės distalinės simetrinės polineuropatijos, atliekant diabetinės pėdos ištyrimą, neurometriją (NM), elektroneurografiją (ENG) ir kardiovaskulinės autonominės neuropatijos, atliekant autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimą (AKRT).
2. CD pacientams ir kontrolinei grupei ištirti DNR pažeidimas – chromosomų aberacijų (CA), mikrobranduolių (MB) ir seserinių chromatidžių mainų (SCM) dažnį ir oksidacinių pažeidimų žymenis
3. CD pacientams ištirti 4 miRNR raišką – miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223
4. Susieti pacientų anamnezinius, klinikinius rodiklius ir diabetinės neuropatijos tyrimų rezultatus su citogenetinių ir epigenetinių tyrimų rezultatais
5. Įvertinti klinikinius, citogenetinius ir oksidacinių žymenų pokyčius po gydymo intraveniniu antioksidantu – α -lipoine rūgštimi (ALR)

Tyrimo naujumas

Šiame moksliniame tyrime CD pacientai ištirti įvairiais instrumentiniais metodais dėl iki šiol mažiausiai ištirtos mikrovaskulinės diabeto komplikacijos, diabetinės neuropatijos (DN), ir tie metodai palyginti tarpusavyje ir tarp skirtingų CD tipų. Pirmą kartą Lietuvoje CD pacientų grupei atlikti citogenetiniai tyrimai – CA, SCM ir MB dažnis, o daliai pacientų ištirtas visas genetinių rodiklių rinkinys – oksidaciniai ir citogenetiniai žymenys ir miRNR. Genetinių ir epigenetinių tyrimų rezultatai susieti su klinikiniais rodikliais, gautos naujos, iki šiol neaprašytos sąsajos. Mūsų tyrime pirmą kartą CD pacientams atliktas jautrumo mutagenui tyrimas ir įvertintos sąsajos su klinikiniais rodikliais.

Daliai tiriamųjų įvertintas trumpalaikio gydymo ALR poveikis citogenetinėms pažaidoms ir oksidaciniams žymenims.

Ginamieji teiginiai

1. Nustatomas DSPN dažnis priklauso nuo naudoto diagnostikos metodo. Asmenims, sergantiems antrojo tipo CD, skausminė DSPN ir kardiovaskulinė autonimė neuropatija išsivysto dažniau
2. CD1 ir CD2 pacientams palyginus su kontroline grupe dažniau nustatytos DNR pažaidos, CD2 pacientams būdingas didesnis chromosominio tipo aberacijų dažnis palyginus su CD1
3. DNR pažaidų išsivystymo rizika didėja vyresniems tiriamiesiems su didesniu kūno masės indeksu (KMI), diabeto komplikacijomis ir lydinčiomis ligomis, o gydymas antidiabetiniais preparatais ir statinais DNR pažaidų riziką sumažina
4. CD pacientai su mikrovaskulinėmis komplikacijomis jautresni mutageno poveikiui
5. MiR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223 raiškos pokyčiai gali būti susiję su diabeto rizika.
6. Pacientams, kuriems pasireiškia neuropatinis skausmas, yra tikslinga skirti trumpalaikę intraveninę terapiją α -lipoine rūgštimi

Autorės indėlis

Autorė paruošė tyrimo protokolą bei reikalingus dokumentus Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimams gauti. Įtraukė, surinko anamnezinius duomenis ir kliniškai ištyrė pacientus, sergančius CD, ir kontrolinę grupę. Diabetu sergančius pacientus taip pat ištyrė dėl DSPN, atlikdama klinikinį neurologinį ištyrimą ir NM dėl KAN – atlikdama AKRT. Koordinavo mokslinio darbo eigą, analizavo klinikinius duomenis, siejo juos su genetiniais ir epigenetiniais duomenimis, statistiškai apdorojo, susistemino ir aprašė gautus rezultatus. Darbą viešino skaitydama pranešimus nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose, kartu su bendraautoriais rengė mokslines publikacijas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Cukrinis diabetas

CD – lėtinė liga, atsirandanti dėl absoliutaus insulino deficito arba sutrikusio insulino veikimo ir pasireiškianti hiperglikemija. Du tūkstančiai dvidešimt pirmais metais CD sergančiųjų saugusiųjų skaičius pasaulyje siekė pandemines aukštumas – 537 mln gyventojų [1]. Sergamumas CD sparčiai didėja, skaičiuojama, kad 2030 m. šis skaičius išaugs iki 643 mln., o 2045 m. – net iki 783 mln [1]. Lietuvos statistikos departamento duomenimis sergamumas CD išaugo nuo 4,4 % 2014 m. iki 5,3 % 2019 m. [58]. Didžiąją dalį sergančiųjų CD sudaro CD2: LR SAM Higienos instituto duomenimis 2022 m. užregistruoti 8751 sergantieji CD1 ir 144712 – CD2 [59].

Didėjantis sergamumas CD – finansinis iššūkis pasaulio sveikatos priežiūros sistemai: per paskutinius 15 metų išlaidos CD gydymui išaugo 316 % ir šiuo metu pasaulyje siekia 966 milijardų dolerių [1].

Cukrinio diabeto klasifikacija pagrįsta ligos etiologija ir patogeneze. Išskiriami keturi pagrindiniai CD tipai: CD1, CD2, nėščiųjų diabetas ir kiti specifiniai cukrinio diabeto tipai (pvz., monogeninis diabetas, pankreatogeninis, vaistų ar cheminių medžiagų sukeltas diabetas) [60]. Du dažniausi cukrinio diabeto tipai yra CD1 ir CD2 [60].

CD1 sudaro apie 5–10 % visų diabeto atvejų [60], ir yra būdingesnis jauniems, iki 40 metų, asmenims. Tai autoimuninis susirgimas, pasireiškiantis hiperglikemija dėl organizmo T ląstelių sukeltos kasos β-ląstelių destruktijos ir absoliutaus insulino deficito. Autoimuninės reakcijos į kasos β-ląsteles priežastys nėra iki galo žinomos, tačiau svarbi yra genetinių ir aplinkos veiksnių sąveika. Genų regionai, susiję su CD1 rizika, yra atsakingi už imuninį organizmo atsaką. Atliekant viso genomo sąsajų tyrimus (angl. GWAS – *genome wide association studies*), nustatyta apie 50 genų lokusų, sąlygojančių CD1 riziką [61]. Stipriausios sąsajos nustatytos tarp *HLA-DR3*, *HLA-DR4* ir *DR4-DQB* haplotipų ir autoimuninės kasos β-ląstelių destruktijos [62]. Šie *HLA* genai nulemia apie 40–50 % CD1 paveldumo [63]. Ne *HLA* sistemos genai, susiję su CD1 rizika, yra insulino genas *INS*, kurio IDDM 2 regiono promotoriaus tandeminiai pasikartojimai ir sąlygoja polinkį susirgti CD1 [64]. *CTLA-4*, *PTPN-22* ir *CD25* yra kiti, ne *HLA* genai, svarbūs CD1 išsivystymo rizikai [65].

Organizmo autoimunizacija į kasos ląsteles pasireiškia per gaminamus autoantikūnus, t. y. glutamo rūgšties dekarboksilazės autoantikūnus (GADA), kasos salelių autoantikūnus (ICA), autoantikūnus prieš tirozinfosfatazes IA-2

ir IA-2a arba kasos salelėms specifinę cinko transporterio 8 izoformą (ZnT8), insulino autoantikūnus ir kitus. Bent vienas iš šių autoantikūnų yra nustatomas 85–90 % naujai diagnozuotų CD1 atvejų [7]. Autoantikūnų sukelta kasos β -ląstelių destruktija sąlygoja absoliutų insulino deficitą ir dažniausiai pasireiškia ūminiais ir ryškiais klinikiniais simptomais, kurie gali atsirasti spontaniškai arba išprovokuoti išorinio veiksnio, pvz., streso, infekcijos ir pan. Tipiški CD1 simptomai yra poliurija, polidipsija, dehidratacija ir svorio mažėjimas, taip pat gana dažnai pasireiškia CD dekompenzacija – diabetinė ketoacidozė. CD1 pacientams dažniau gali pasireikšti ir kitos autoimuninės ligos, pvz., lėtinis autoimuninis tiroiditas, Greivso, Adisono liga, miastenija, celiakija, vitiligo ir pan. [66]. Gydomui skiriama insulino terapija.

CD2 yra dažniausia CD forma, sudaranti apie 90–95 % visų diabeto atvejų [60]. Šis diabetas būdingas vyresniems nei 40 metų amžiaus pacientams, tačiau didėjant nutukimo atvejams jauniems asmenims CD2 vis dažniau pasireiškia ir jaunesniame amžiuje. CD2 yra heterogeniška liga, etiologiniai veiksniai nėra iki galo išaiškinti. Kaip ir CD1 atveju, svarbi genetinių ir aplinkos veiksnių sąveika. CD2 pacientams būdinga ryški genetinė predispozicija – individams, kurių vienas iš tėvų serga CD2, rizika susirgti yra 40 %, jei abu tėvai serga CD2, rizika susirgti išauga iki 70 % [67]. CD2 pasireiškimo rizika monozigotiniams dvyniams – 70 % [68]. CD2 – poligeninė liga, genetiniai mechanizmai yra menkai žinomi, nors, priešingai nei CD1 atveju, nenustatyta CD2 sąsajų su genais, reguliuojančiais imuninį atsaką, ir nėra imuninės sistemos sukeltos kasos β -ląstelių destruktijos. CD2 išsivystymo riziką sąlygojančių genų poveikis dažniausiai nedidelis, todėl tokių genų lokusų nustatymui reikalingi platūs asociacijų tyrimai [69]. Paskutinį dešimtmetį atliekant GWAS, identifikuota virš 100 genų lokusų, susijusių su CD2 rizika, tačiau suminis jų poveikis paaiškina tik 20 % CD2 paveldumo [70], ir kol kas genetinė analizė nėra pranašesnė CD2 predikcijai, palyginti su klinikiniais rodikliais, tokiais kaip amžius, KMI, alkio glikemija ar dislipidemija [71]. Dauguma genų, susijusių su CD2 rizika, reguliuoja insulino sekreciją, ir tik nedidelė dalis – insulino veikimą, pvz., receptorių jautrumą, ląstelių signalų perdavimą ir lipidų metabolizmą [72, 73]. Dažniausiai aprašomi genai, susiję su CD2 rizika, yra *PPARG*, *IRS1*, *IRS2*, *KCNJ11*, *WFS1*, *TCF7L2* ir *IGF2BP2* [74]. CD genų tyrimų konsorciūmų pagalba nustatyta daugybė vieno nukleotido polimorfizmų, susijusių su CD2 rizika, o dažniausiai atsikartojantys yra *FTO*, *TCF7L2*, *IRS1*, *GCKR*, *SLC30A8* ir *RREB1* genuose [74].

Nutukimas ar antsvoris yra vienas iš pagrindinių rizikos veiksnių ir būdingas apie 90 % CD2 pacientų. Tiems CD2 pacientams, kurie yra

nenutukę, dažniausiai būdingas riebalinio audinio persiskirstymas į pilvo sritį [60]. Kiti CD2 rizikos veiksniai yra amžius, fizinio krūvio stoka, vakarų dieta, nėščiujų diabetas, policistinių kiaušidžių sindromas. Šiems pacientams taip pat dažniau nustatomos su nutukimu susijusios gretutinės ligos, pvz., dislipidemija ar pirminė arterinė hipertenzija. Šios būklės sąlygoja periferinių audinių, pvz., raumenų, kepenų, riebalinio audinio, sumažėjusį jautrumą insulinui. Insulino rezistencija ligos pradžioje dažnai aktyvina kasos β -ląstelių funkciją ir sukelia hiperinsulinemiją, kad organizme būtų palaikoma normoglikemija. Tačiau ilgainiui kasos β -ląsteles nepajėgia kompensuoti insulino rezistencijos, jų funkcija palaipsniui išsenka, ir pasireiškia insulino deficitinė būklė. Todėl pažengusiu CD2 sergantiesiems būdinga insulino rezistencija ir kasos β -ląstelių disfunkcija. Priešingai nei CD1, CD2 atveju hiperglikemija, ypač ligos pradžioje, dažnai būna nedidelė, progresuoja pamažu, todėl kliniškai liga dažniausiai ilgai nepasireiškia, simptomai būna neišreikšti, ligos eiga vangė. CD2 progresuojant pasireiškia simptomai, analogiškai CD1, tačiau diabetinė ketoacidozė pasireiškia retai dėl likutinio endogeninio insulino. CD2, ypač ligos pradžioje, gali būti sėkmingai gydomas geriamaisiais antidiabetiniais preparatais, kurie didina jautrumą insulinui, ir tik ligai progresuojant ir mažėjant endogeninio insulino koncentracijai prireikia insulino terapijos.

CD1 ir CD2 klinikinės eigos skirtumai pateikti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Pirmojo tipo cukriniu diabetu (CD1) ir antrojo tipo cukriniu diabetu (CD2) sergančiųjų pacientų klinikinės eigos ypatumai [75]

	CD1	CD2
Svorio mažėjimas	Dažniausiai taip	Nebūdingas
Ketonurija, ketoacidozė	Dažniausiai taip	Nebūdinga
Simptomų progresavimas	Dienos / savaitės	Mėnesiai / metai
Simptomai	Išreikšti	Neženklaus
Šeiminė anamnezė	Autoimuninės ligos šeimoje	30 % atvejų teigiama CD2 anamnezė šeimoje
Amžius	Dažniau iki 40 metų amžiaus	Dažniau virš 40 metų amžiaus

1.2. Cukrinio diabeto komplikacijos

CD grėsmingas sukeliamomis komplikacijomis, kurios pasireiškia tiek CD1, tiek CD2 atveju. Diabeto komplikacijos klasifikuojamos į dvi pagrindines grupes: 1) stambiųjų kraujagyslių pažeidimus, vadinamus makrovaskulinėmis komplikacijomis, 2) smulkiųjų kraujagyslių pažeidimus – mikrovaskulinėmis komplikacijomis. Diabetinių komplikacijų riziką didintys veiksniai gali būti modifikuojami (hiperglikemija, dislipidemija, hipertenzija, rūkymas, alkoholio vartojimas) ir nemodifikuojami (paciento amžius, lytis, diabeto trukmė, genetiniai veiksniai).

1.2.1. Makrovaskulinės komplikacijos ir jų rizikos veiksniai

Makrovaskulinės komplikacijos, tokios kaip koronarinė širdies liga, išeminiis smegenų infarktas ir periferinių arterijų liga, CD sergančių pacientų mirštamumą padidina 2–4 kartus, palyginti su diabetu nesergančiais bendraamžiais, ir sąlygoja iki 80 % su diabetu susijusio mirštamumo [5, 6]. Miokardo infarkto (MI) rizika sergantiems diabetu prilygsta pakartotinio infarkto rizikai pacientams, persirgusiems MI; išeminiu smegenų insultu diabetu sergantys pacientai serga 5 kartus, o periferine arterijų liga – 2 kartus dažniau nei diabetu nesergantys pacientai [76, 77]. CD taip pat turi neigiamos įtakos intervencinio kardiovaskulinių ligų (KVL) gydymo rezultatui – didina stentų trombozės ar intraoperacinio mirštamumo riziką [78].

Pagrindiniai rizikos veiksniai, sąlygojantys makrovaskulinių komplikacijų pasireiškimą sergant CD, yra hiperglikemija, nutukimas, pirminė arterinė hipertenzija, dislipidemija ir rūkymas.

Mažesnis HbA1c kiekis neabejotinai mažina mikrovaskulinių komplikacijų riziką [79, 80], tačiau įtaka makrovaskulinėms komplikacijoms yra labiau kompleksinė. DCCT (angl. *Diabetes Control and Complications Trial Group*) tyrime CD1 pacientams ir UKPDS (angl. *U.K. Prospective Diabetes Study*) tyrime naujai diagnozuotiems CD2 pacientams HbA1c sumažėjimas sumažino makrovaskulinių komplikacijų riziką [81, 82]. Kituose tyrimuose, su didesnės KVL rizikos CD2 pacientais, HbA1c kontrolės nauda KVL rizikos mažinimui neįrodyta (ADVANCE, angl. *Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation*; ACCORD, angl. *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*; VADT, angl. *Veterans Affairs diabetes trial*) [83–86]. Priešingai, ACCORD tyrime, kuriame dalyvavo 35 % labai didelės KVL rizikos pacientų, anamnezėje

turėjusių KVL įvyki, stebėtas padidėjęs pacientų mirštamumas intensyvios glikemijos kontrolės grupėje (siektinas HbA1c – 6,5 %) [86]. Stebimuosiuose tyrimuose taip pat nustatyta U formos sąsaja tarp HbA1c ir klinikinių išeičių. Asociacija parodo, kad žemesnis HbA1c didelės KVL rizikos pacientams gali dar labiau padidinti riziką [87, 88]. Taip pat yra duomenų, kad dažnos hipoglikemijos, glikemijos variabilumas padidina KVL riziką [83]. Nutukimas, būdingas CD2 pacientams, yra pagrindinis metabolinio sindromo (MS) ir KVL rizikos veiksnys. Nustatyta, kad netekus >5 % svorio pagerėja glikemijos, lipidų ir AKS kontrolė nutukusiems ar turintiems anstsvorį CD2 asmenims [89], o netekusiems >10% kūno svorio stebėta sumažėjusi KVL mirštamumo rizika [90]. Didesnis fizinis krūvis taip pat susijęs su mažesne KVL mirštamumo rizika, palyginti su mažesniu krūviu [91]. AKS kontrolė reikšmingai sumažina pacientų, sergančių CD2, išemine širdies liga (IŠL), širdies nepakankamumu (ŠN) ir insultu, bendro mirštamumo riziką, taip pat insulto riziką CD2 pacientams, tačiau nemažina kitų KVL įvykių rizikos CD2 pacientams [92]. Epidemiologiniuose tyrimuose patvirtinta, kad padidėjusi mažo tankio lipoproteinų (MTL) ir žema didelio tankio lipoproteinų (DTL) koncentracija yra susijusi su padidėjusia KV ligų rizika CD pacientams [93]. Klinikiniuose tyrimuose priešlipidinis gydymas susijęs su KVL rizikos sumažėjimu CD pacientams. Pavyzdžiui, gydymas statinais sumažina MTL koncentraciją 40–63 % ir reikšmingai sumažina cerebrovaskulinių ir KVL komplikacijų riziką [94]. Teigiamas efektas stebimas tiek CD1 tiek CD2 pacientams. Rūkymas ženkliai padidina KVL komplikacijų riziką, o rūkymo nutraukimas 36 % sumažina KVL mirštamumo riziką CD2 pacientams [95].

Apibendrinant, CD1 pacientams makrovaskulinėms komplikacijoms išsivystyti svarbiausias rizikos veiksnys yra hiperglikemija. CD2 pacientams makrovaskulinių komplikacijų patogenezė dėl dažnesnės lydinčiosios patologijos yra sudėtingesnė, ir efektyviai prevencijai reikalinga visų rizikos veiksnių korekcija [96, 97].

1.2.2. Mikrovaskulinės komplikacijos, jų rizikos veiksniai ir diagnostika

Mikrovaskulinės komplikacijos – smulkiųjų tinklainės, inkstų ir nervų kraujagyslių pažeidimai, priklausomai nuo lokalizacijos atitinkamai pasireiškiantys diabetine retinopatija, nefropatija ir neuropatija. Nors dėl gerėjančios diabeto priežiūros mikrovaskulinių komplikacijų rizika atskiram pacientui mažėja, bendrai pasaulyje dėl didėjančio sergančiųjų skaičiaus didėja ir sunkių mikrovaskulinių komplikacijų skaičius [98].

Diabetinė nefropatija pasireiškia apie 40 % pacientų, sergančių CD1 arba CD2 [2]. Keturiasdešimčiai procentų šių pacientų komplikacija progresuoja iki terminalinio inkstų nepakankamumo, kuomet reikalinga hemodializė arba inksto transplantacija [13, 20]. Išsivysčius terminaliniam inkstų nepakankamumui, pacientų mirštamumas padidėja 14 kartų, palyginti su pacientais be nefropatijos [100].

Diabetinė retinopatija – viena dažniausių aklumo priežasčių pasaulyje, išsivystanti apie 30 % pacientų, sergančių CD2, ir 50–80 % pacientų, sergančių CD1 [100]. Apie 25–30 % retinopatijos atvejų progresuoja į apakimą galinčią sukelti makulos edemą, kuri 5–8% koreguojama lazerio terapija ir 5 % – vitrektomija [22–24].

Diabetinė neuropatija (DN) – pati dažniausia mikrovaskulinė komplikacija. DN taip pat labai heterogeniška komplikacija, kurios metu gali būti pažeistos skirtingos nervų sistemos dalys ir pasireikšti įvairūs klinikiniai simptomai [101]. Dažniausios ir geriausiai ištirtos diabetinės neuropatijos formos yra distalinė simetrinė polineuropatija (DSPN) ir kardiovaskulinė autonominė neuropatija (KAN) [19], kurios detaliau bus aprašytos 1.2.2.1 ir 1.2.2.2 skyriuose.

DN dažnis ženkliai varijuoja priklausomai nuo tiriamosios populiacijos, pasirinktų diagnostikos metodų ir diagnostikos kriterijų [102]. Apibendrinant, CD sergančiųjų populiacijoje DSPN dažnis svyruoja nuo 7 % iki 69 %, KAN – nuo 5 % iki 65 %, o kai kurių autorių duomenimis nuo 2,5 % iki 90 % [103], nes komplikacijų nustatymas priklauso nuo daugelio tiriamųjų ir tyrimo atlikimo veiksnių.

Lietuvoje DSPN paplitimas atsitiktinai atrinktiems CD1 ir CD2 pacientams nustatytas atitinkamai 54,3 % ir 70,7 % [104]. Kitame tyrime ambulatoriškai tirtiems CD2 pacientams, atlikus klinikinį pėdos ištyrimą, DSPN dažnis sergantiems iki 5-erių metų siekė 30 %, 5–9 metus – 56,4 %, 10–14 metų – 70,5 % [105]. Klinikinį pėdos tyrimą derinant su didesnio jautrumo elektroneurografija (ENG), DSPN dažnis net trumpai diabetu sergantiems pacientams (iki 5 metų) siekė 59 % CD1 ir 50 % CD2 atveju [104].

Svarbiausias rizikos veiksnys, didinantis mikrovaskulinių komplikacijų riziką, yra hiperglikemija. HbA1c padidėjimas neabejotinai susijęs su didesne nefropatijos [10, 17, 106, 107], retinopatijos [108, 109] ir KAN [110, 111] rizika CD1 ir CD2 pacientams. HbA1c pakilus 1 %, DSPN rizika padidėja 10–15 % [112, 113], o diabetinės retinopatijos – 22 % [114]. Hiperglikemijos korekcija ženkliai sumažina diabetinės retinopatijos, nefropatijos ir DN atsiradimo ir progresavimo riziką CD1 pacientams. DCCT tyrime intensyvi

glikemijos kontrolė sumažino retinopatijos išsivystymo riziką 76 %, progresavimo riziką – 54 %, nefropatijos atsiradimo riziką – 39 %, makroalbuminurijos riziką – 54 %, neuropatijos riziką – 60 % ir KAN riziką – 50 % [80, 115]. Mažesnė mikrovaskulinių komplikacijų rizika CD1 pacientams išliko dar 10–18 metų tęstiniame stebimajame DCCT/EDIC tyrime (angl. *Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*), kuriame intensyvaus ir įprastinio gydymo grupėse glikemijos kontrolė išsilygino [116–119]. Stokholmo Diabeto Intervenciniame tyrime retinopatija išsivystė 63 % vs 33 %, nefropatija – 26 % vs 7 %, neuropatija – 32 % vs 14 %, palyginus konservatyvaus ir intensyvaus CD1 gydymo grupes [120]. Tačiau glikemijos kontrolės nauda mažinant mikrovaskulinių komplikacijų riziką CD2 pacientams nėra pilnai įrodyta. UKPDS tyrime intensyvaus gydymo grupėje stebėtas mažesnis diabetinės retinopatijos, nefropatijos ir 25 % mažesnis bendras mikrovaskulinių komplikacijų dažnis, tačiau DSPN ir KAN rizika, palyginti su konservatyvaus gydymo grupe, nesiskyrė [79]. ADVANCE tyrime taip pat stebėtas diabetinės nefropatijos (4,1 % vs 5,2 %) ir bendro mikrovaskulinių komplikacijų (9,4 % vs 10,9%) dažnio sumažėjimas, palyginus intensyvaus ir konservatyvaus gydymo grupes, tačiau palyginus diabetinės retinopatijos ir neuropatijos dažnį reikšmingo skirtumo nenustatyta [84]. VADT tyrime nestebėta reikšmingo mikrovaskulinių komplikacijų rizikos sumažėjimo palyginus konservatyvaus ir intensyvaus gydymo grupes, išskyrus makroalbuminurijos rizikos sumažėjimą [85].

Ilgėjanti CD trukmė neabejotinai didina nefropatijos [10, 11], retinopatijos [108, 121], DSPN [29, 112, 122, 123] ir KAN [124] riziką tiek CD1 tiek CD2 pacientams ir išlieka įvertinus amžiaus kriterijų. Pavyzdžiui, tęstiniame tyrime, CD1 ir CD2 kohortoje, DSPN dažnis padidėjo nuo 21 %, sergantiems CD 5 metus, iki 37 % – sergant virš 10 metų [125]. Paskaičiuota, kad KAN atvejų dažnis kasmet padidėja 6 % CD1 ir 2 % – CD2 pacientams [124], o retinopatijos dažnis CD2 pacientams – 8 % [114]. DCCT tyrimo pabaigoje KAN atvejų dažnis CD1 pacientams siekė 9 %, o tęstiniame EDIC tyrime po 13–14 metų padidėjo iki 31 % [126]. Ta pati KAN atvejų didėjimo tendencija ilgėjant ligos stažui stebima ir CD2 pacientų tyrimuose [127–129].

Amžius – dar vienas svarbus rizikos veiksnys, didinantis nefropatijos [10, 17, 107], makulopatijos [121], neuropatijos [112, 113, 122, 125, 130] ir KAN [131] išsivystymo riziką CD pacientams. DSPN atveju svarbu žinoti, kad senstant natūraliai mažėja jutimų slenkstis ir sveikiems asmenims, todėl tiriant pacientus svarbu naudoti su amžium susietas tyrimų normas [132, 133].

Be aukščiau minėtų klasikinių rizikos veiksnių, vis daugiau atsiranda duomenų, patvirtinančių MS komponentų įtaką mikrovaskulinių komplikacijų išsivystymui. Metabolinį sindromą sudaro kelių sutrikimų, t. y. hiperglikemijos, arterinės hipertenzijos (AH), nutukimo, hipertrigliceridemijos ir sumažėjusio DTL koncentracijos, derinys [134].

AH didina diabetinės nefropatijos [10, 11, 106], retinopatijos [16] ir KAN [135, 136] riziką CD1 ir CD2 pacientams. DSPN ir arterinės hipertenzijos ryšys vieningai patvirtintas CD1 pacientams [12, 29], bet ne CD2 pacientams [22, 23, 30, 31].

Nutukimas didina CD1 ir CD2 pacientams diabetinės nefropatijos [10, 11], DSPN [12–15] ir KAN [136, 137] riziką. Nutukimas didina DSPN riziką ne tik CD pacientams, bet ir asmenims su normoglikemija ar tarpine hiperglikemija [22]. Nutukimo ir diabetinės retinopatijos ryšys CD pacientams nepatvirtintas [16].

Dislipidemija didina diabetinės nefropatijos riziką CD1 ir CD2 pacientams [17, 18], o gydymas statiniais gali sukelti albuminurijos regresiją [138]. Tyrimų duomenys dėl dislipidemijos ryšio su DSPN skiriasi. Vienuose tyrimuose nustatyta teigiama DSPN sąsaja su hipertrigliceridemija CD1 [12] ir CD2 pacientams [14, 19–21], kituose – ši sąsaja nepatvirtinta [22–25]. Sumažėjusios DTL arba padidėjusios MTL koncentracijos sąsaja su DSPN taip pat vienareikšmiškai nepatvirtinta: dalyje tyrimų ryšys nustatytas CD1 [12, 29] ir CD2 pacientams [14, 19, 139], kituose tyrimuose – nepatvirtintas [22, 22, 25]. Prieštaringi ir dislipidemijos sąsajos su diabetine retinopatija rezultatai: jei vieni autoriai nustatė teigiamą diabetinės retinopatijos ir hipercholesterolemijos ryšį CD1 ir CD2 pacientams [26], tai kituose tyrimuose ši sąsaja nestebėta [27, 28]. Taip pat viename tyrime stebėta teigiama sąsaja tarp diabetinės retinopatijos ir hipercholesterolemijos [140], tačiau kituose – tokia sąsaja nestebėta [13, 27, 28].

Vertinant MS komponentus kartu, nustatyta, kad DSPN [141] ir retinopatijos [140] rizika didėja, didėjant MS komponentų skaičiui.

Moteriška lytis susijusi su mažesne DSPN rizika CD1 ir CD2 pacientams [17, 18, 106]. Tyrimų su diabetine retinopatija rezultatai yra prieštaringi: vienuose CD1 ir CD2 pacientų tyrimuose nustatyta, kad vyriška lytis susijusi su didesne retinopatijos rizika [114, 142, 143], kituose – skirtumo nenustatyta [13, 27]. Vyriška lytis susijusi su DSPN išsivystymo rizika CD 2 [23, 144], bet ne CD1 pacientams [12]. Lyties įtaka KAN išsivystymui išlieka kontraversiška. ACCORD tyrime nustatytas didesnis KAN dažnis moterims, palyginus su vyrais [145], tačiau kituose tyrimuose ši sąsaja nepatvirtinta [135, 146, 147].

Rūkymas susijęs su albuminurijos padidėjimu ir GFR sumažėjimu CD1 ir CD2 pacientams [10, 107, 148]. Tyrimų duomenys dėl rūkymo ir diabetinės retinopatijos sąsajų išlieka prieštaringi: vienuose tyrimuose nustatyta diabetinės retinopatijos rizikos padidėjimo tendencija rūkantiems pacientams (statistiškai nereikšminga) [27, 149], tačiau UKPDS tyrime nustatytas protekcinis rūkymo poveikis, kuomet rūkantiems pacientams nustatytas mažesnis diabetinės retinopatijos dažnis ir progresavimo rizika [143]. Rūkymas beveik dvigubai padidina DSPN riziką CD1 pacientams [29, 122], tačiau duomenys su CD2 pacientais yra prieštaringi – viename tyrime nustatytas teigiamas stiprus ir nepriklausomas nuo kitų rizikos veiksnių rūkymo ir DSPN ryšys [150], kitame, priešingai – neigiamas rūkymo ir DSPN ryšys [112]. Tyrimų duomenimis rūkymas neabejotinai padidina KAN riziką [151, 152].

Alkoholio vartojimas siejamas su DSPN rizika CD1 ir CD2 pacientams, tačiau epidemiologiniuose tyrimuose sunku diferencijuoti alkoholinę neuropatiją nuo diabetinės neuropatijos, todėl alkoholio, kaip atskiro diabetinės neuropatijos rizikos veiksnio (nepriklausomai nuo alkoholinės neuropatijos), reikšmė lieka neaiški [153].

DSPN būdingas dar vienas specifinis rizikos veiksnys – pacientų ūgis. Nustatyta, kad aukštesnis pacientų ūgis susijęs su didesne DSPN rizika, kadangi DSPN prasideda distaliniuose nervų galuose, ir ilgiausios nervinės skaidulos nukenčia pirmiausiai [154]. DSPN sąsaja su ūgiu įrodyta ne viename tyrime, ypač CD1 pacientams [29, 112, 122, 123].

Apibendrinant, hiperglikemija yra neabejotinas mikrovaskulinių ir makrovaskulinių komplikacijų rizikos veiksnys. Be hiperglikemijos yra daug kitų modifikuojamų ir nemodifikuojamų rizikos veiksnių, ypač būdingų CD2 pacientams, kurių korekcija ne mažiau svarbi siekiant išvengti mikrovaskulinių ir makrovaskulinių diabeto komplikacijų.

1.2.2.1. Distalinė simetrinė polineuropatija (DSPN) ir jos diagnostika

DSPN gali būti simptominė ar besimptomė. Simptominė DSPN pasireiškia apie 50 % atvejų, o 25–30 % iš jų – skausminė DSPN [154]. Kaip ir minėta patogenezės aprašyme, pirmiausiai nukenčia ilgiausių periferinių nervų distalinės dalys, todėl DSPN pasireiškia distalinėse galūnių dalyse, pirmiausia – pėdose, vėliau ir plaštakose, kliniškai sukeldama „kojinių ir pirštinių“ fenomeną [155]. Ligai progresuojant pažaida kyla aukštyn, sąlygodama vis proksimaliau pasireiškiančius simptomus. Simptomų pobūdis priklauso nuo

to, kurių nervinių skaidulų pažeida vyrauja [154, 156]. Dažniausiai ligos pradžioje pasireiškia smulkiųjų nervinių skaidulų pažeida, kuri kliniškai sukelia aštraus, deginančio, dilgčiojančio, šaudančio, elektros šoko pobūdžio skausmus kojose, kurie paūmėja naktį. Kartu su skausmu gali pasireikšti dizestezijos, pvz., hiperalgezija – stipresnis skausmo pojūtis į skausmingą stimulą arba alodinija – skausminė reakcija į neskausminį stimulą (kojines, batus, patalynę) [157, 158]. Stambių nervinių skaidulų pažeida pasireiškia galūnių stingimu, tirpimu, nejautra, o pažengusiose stadijose – pusiausvyros sutrikimu, silpnumu [155, 158]. Simptominė DSPN dažnai žekliai pablogina pacientų miegą, psichologinę būseną, darbingumą ir gyvenimo kokybę.

Apie 50 % pacientų su DSPN simptomai nepasireiškia [101]. Asimptominė DSPN gali pasireikšti nuo komplikacijos pradžios arba pereiti iš simptominės DSPN, ligai progresuojant ir gilėjant nervų pažeidai. Kodėl vieniems CD pacientams pasireiškia simptominė, kitiems asimptominė DSPN, nėra žinoma [98]. Nors tokių pacientų nevargina kojų skausmai ar kiti simptomai, laiku nediagnozuotas sutrikimas dėl nejautos ypač padidina pėdų išopėjimo ir amputacijos riziką [101].

Nėra vieningo sutarimo dėl DSPN diagnostikos. Klinikinėje praktikoje atliekamas klinikinis pacientų ištyrimas kamertonu, monofilamentu, adata, tip-term lazdele ar Achilo refleksų vertinimas. Toks ištyrimas leidžia nustatyti tik vėlyvą ir dažniausiai negrįžtamą periferinių nervų pažeidą, kuomet pėdų išopėjimo rizika jau yra didelė. Epidemiologiniuose ir klinikinuose tyrimuose dažnai naudojamos klinikinio ištyrimo skalės, kurių dėka klinikinių simptomų ir (ar) požymių visuma įvertinama balu, atspindinčiu diabetinės neuropatijos (DN) sunkumą. Tai standartizuotas, kiekybinis, objektyvus ir atkartojamas pacientų tyrimo metodas, dažnai naudojamas pacientų atrankai, diagnozės nustatymui ir DN dinamikos vertinimui [98]. Skales lengva ir patogiu naudoti, ištyrimas neužima daug laiko ir nereikalauja sudėtingos įrangos, tačiau šių skalių pagalba taip pat diagnozuojami tik gana vėlyvi nervinių skaidulų pokyčiai ir nustatoma tik galima arba tikėtina DSPN diagnozė (1.2 lentelė). Vienos dažniausiai klinikinuose tyrimuose naudojamų DSPN vertinimo skalių yra Neuropatijos simptomų skalės klausimynas (NSS, angl. *neuropathy symptom score*) ir Neuropatijos negalios skalė (NNS; angl. *neuropathy disability score*, NDS).

Palyginus su klinikinio ištyrimu, jautresnę ir ankstyvesnę nervinių skaidulų pažeidą rodo instrumentinis tyrimas – neurometrija (NM). NM – tai neinvazinis, dvigubai aklas tyrimas, naudojamas diabetinei ir kitoms periferinėms neuropatijoms diagnozuoti. Tyrimo metu, atliekant periferinių nervų stimuliaciją elektros impulsu, registruojamas sensorinių (jutiminių)

nervų atsakas. Neurometras generuoja skirtingo dažnio (2000 Hz, 250 Hz ir 5 Hz) elektros impulsus, kurių dėka atitinkamai stimuliuojami 3 pagrindiniai sensorinių periferinių nervinių skaidulų tipai: Aβ (stambios mielinizuotos), Aδ (smulkios mielinizuotos) ir C (smulkios nemielinizuotos) skaidulos [159–161]. Tokiu būdu selektyviai nustatoma mielinizuotų ir nemielinizuotų sensorinių nervinių skaidulų būklė, jų pažeidos laipsnis ir pobūdis. Atliekant NM pacientas turi būti kontaktiškas ir orientuotas. Paciento nesugebėjimas bendradarbiauti ir vykdyti paliepiamus procedūros metu yra absoliuti kontraindikacija tyrimui. Tyrimas taip pat negali būti atliekamas pacientui su sunkiomis odos ar paodžio ligomis, pažeidžiančiomis odos vientisumą (pvz., paprastoji pūslelinė, rožė, *pemphigus vulgaris*). Klinikinėje praktikoje NM naudojama ankstyvai ligos diagnostikai, ligos eigos ir atsako į gydymą vertinimui. Tyrimų duomenimis NM jautrumas siekia 60–94 %, o specifiškumas – 95–100 % [162].

Elektroneurografija (ENG) Toronto neuropatijos ekspertų sutarime 2011 m. rekomenduota kaip „auksinis standartas“ DSPN diagnostikai klinikiniuose tyrimuose [163]. ENG metodu galima ne tik patvirtinti DSPN diagnozę, bet ir nustatyti ankstyvus subklinikinius nervų pokyčius (1.2 lentelė). Tačiau ENG tyrimas taip pat pasižymi svarbiais apribojimais. Pirma, iki šiol nėra aiškaus sutarimo dėl ENG diagnostikos kriterijų neuropatijai nustatyti. Antra, ENG leidžia nustatyti tik stambiųjų skaidulų pažeidimą, o hiperglikemijos atveju, ypač ankstyvoje CD stadijoje, dažniau pažeidžiamos smulkiosios skaidulos [158, 164]. Trečia, ENG atlikimas imlus laikui, reikalauja specialios ir sudėtingos įrangos, apmokyto personalo, todėl negali būti ir nėra naudojamas įprastoje klinikinėje praktikoje [165].

Dėl DSPN CD2 pacientai tiriami iš karto nustatčius diagnozę, CD1 – po 5-erių metų nuo diagnozės nustatymo pradžios, vėliau – CD1 ir CD2 – kasmet [166].

1.2 lentelė. Diabetinės simetrinės polineuropatijos (DSPN) klasifikacija pagal Toronto susitarimą [163]

Galima DSPN	nustatomi klinikiniai simptomai arba požymiai
Tikėtina DSPN	nustatomi ir klinikiniai simptomai ir požymiai
Patvirtinta DSPN	nustatomi simptomai, požymiai ir ENG nuokrypiai arba pakitimai validuotame smulkiųjų skaidulų pažeidos tyrime
Subklinikinė DSPN	nustatomi nuokrypiai ENG arba smulkiųjų skaidulų tyrime

DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; ENG - elektroneurografija.

1.2.2.2. Kardiovaskulinė autonominė neuropatija (KAN) ir jos diagnostika

KAN gali būti subklinikinė ir simptominė. [111]. Subklinikinė KAN forma pasireiškia ligos pradžioje, atsiradus pirmiesiems parasimpatinės NS pokyčiams, kuomet sumažėja širdies susitraukimų dažnis (ŠSD) variabilumas [167]. ŠSD variabilumas – tai širdies gebėjimas padažninti arba suretinti ŠSD priklausomai nuo organizmo poreikių [168, 169]. Sumažėjusio ŠSD pacientai kliniškai nejaučia, ir pokyčiai nustatomi tik autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimo (AKRT) metu. Ligai progresuojant pasireiškia simptominė KAN forma, kuriai būdinga ramybės tachikardija, sumažėjusi fizinio krūvio tolerancija, AKS cirkadinio ritmo sutrikimas, kardiovaskulinės sistemos nestabilumas chirurginių intervencijų metu, ortostatinė hipotenzija, nebyli miokardo išemija ir staigi mirtis [111, 167, 170].

Ramybės tachikardija – vienas ankstyviausių KAN požymių, kuomet nustatomas ŠSD apie 90–100 k/min, retesniais atvejais – apie 130 k/min. [167, 170]. Tačiau tai ir labai nespecifinis požymis, dažnai būdingas pacientams su bloga fizine būkle, nutukimu, anemija, kitomis širdies ligomis [110]. Progresuojant KAN, ramybės tachikardija pereina į visišką širdies denervaciją, kuomet ŠSD nereaguoja į fizinį krūvį, stresą ar miegą [167]. Ramybės tachikardija – ne tik svarbus KAN simptomas, bet ir prognostinis rodiklis: prospektyvinių tyrimų duomenimis ŠSD >78 k/min., palyginti su ŠSD <58 k/min., ir dinamikoje didėjantis ŠSD yra stiprus ir nepriklausomi kardiovaskulinio ir bendro mirštamumo rizikos veiksniai [171]. Todėl ramybės ŠSD gali būti naudojamas kardiovaskulinės rizikos ir terapinių tikslų nustatymui didelės rizikos pacientams [172–174].

Sumažėjusi fizinio krūvio tolerancija – simptomas, atsiradęs dėl sumažėjusio ŠSD ir kraujospūdžio atsako į fizinį krūvį. Pacientams, sergantiems diabetu ir turintiems KAN rizikos veiksnių, prieš planuojamą fizinį aktyvumą turėtų būti ištirtas ŠSD atsakas į fizinį krūvį [175]. Pacientai su diagnozuotu KAN mankštos intensyvumą turėtų reguliuoti pagal jaučiamą nuovargį, o ne ŠSD lygį [170].

Sveikiems asmenims būdingas didesnis *n. Vagus* aktyvumas, ŠSD ir AKS sumažėjimas nakties metu ir padidėjimas dieną, fizinio aktyvumo metu. KAN atveju atsiradus parasimpatinei denervacijai sutrinka AKS cirkadinis ritmas, kuomet AKS nakties metu sumažėja <10 % ar net, priešingai – padidėja [176]. Tokia būklė didina kairiojo skilvelio hipertrofijos, kardiovaskulinio sergamumo ir mirštamumo riziką [172, 177] ir yra sunkiai gydoma, ypač, jei kartu pasireiškia ortostatinė hipotenzija [176, 178].

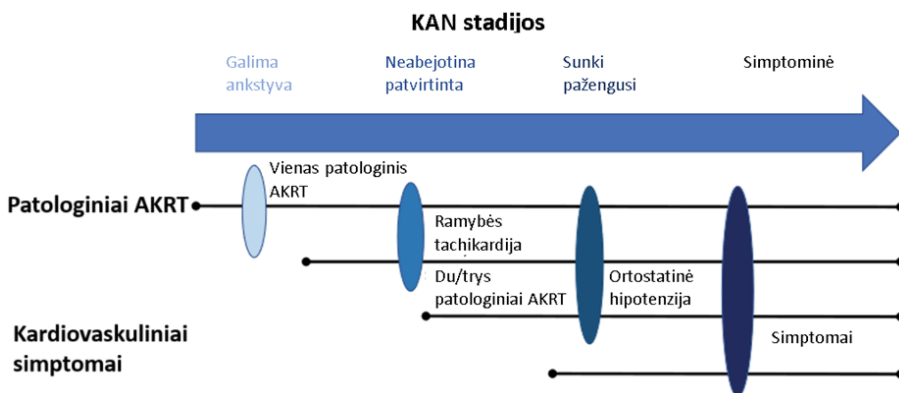
Pacientai, sergantys cukriniu diabetu, 2–3 kartus dažniau kenčia nuo kardiovaskulinių komplikacijų ir kardiovaskulinio mirštumo, palyginti su diabetu nesergančiaisiais [170]. CD pacientams anestezijos metu labiau krenta ŠSD ir AKS, dažniau pasireiškia hipotenzija, bradikardija ir kardiogeninis šokas, prireikia gydymo vazopresoriais [167]. Taip pat CD sergantiesiems būdinga ryškesnė intraoperacinė hipotermija, sąlygojanti blogesnę vaistų metabolizmą ir prastesnę žaizdų gijimą [179, 180].

Ortostatinė hipotenzija – vėlyvas pažengusios KAN simptomas, atsirandantis dėl simpatinės denervacijos ir pasireiškiantis sistolinio AKS sumažėjimu daugiau nei 20 mmHg (kai kurių šaltinių duomenimis >30 mmHg) arba diastolinio AKS sumažėjimu >10 mmHg per pirmąsias tris minutes po atsistojimo [181]. Ji pasireiškia apie 4–18 % pacientų su CD ir 6–32 % pacientų su CD ir KAN [103, 182]. Ortostatinė hipotenzija gali būti asimptomė arba pasireikšti galvos svaigimu, pusiausvyros ir regos sutrikimu, alpimu stojantis. Svarbu prisiminti, kad visa eilė vaistų hipertenzijai, depresijai gydyti, taip pat insulinas gali pabloginti ortostatinės hipotenzijos klinikinius simptomus pacientams su KAN [183].

KAN pažeidžia širdies autonominius aferentinius (kylančius) nervus, kurių disfunkcija sukelia skausmo slenksčio padidėjimą, ir pacientai nejaučia tipinių angininių skausmų miokardo infarkto atveju, todėl gali pasireikšti nebyli miokardo išemija [170, 184]. Tokiems pacientams dažnesni atipiniai simptomai, pvz., prakaitavimas, dusulys, nuovargis, silpnumas, sumišimas, širdies plakimas, dispepsija, pykinimas ir vėmimas [167]. Nebyli miokardo išemija kartu su širdies aritmijomis yra dažniausios staigios mirties priežastys pacientams su KAN [167].

„Auksinis standartas“ diagnozuojant KAN yra autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimai (AKRT). Tai standartizuoti, paprasti, jautrūs ir specifiniai testai, kurių metu vertinami R-R intervalų variabilumas (gilus kvėpavimo, stovėjimo, *Valsalva* mėginiai) elektrokardiogramoje ir arterinio kraujo spaudimo pokyčiai, atsirandantys keičiant kūno padėtį (ortostatinis mėginys). Pirmieji trys mėginiai daugiausiai vertina parasimpatinės NS funkciją, ortostatinis mėginys – simpatinės NS funkciją.

Vienas patologinis AKRT mėginys leidžia įtarti galimą ar ankstyvos stadijos KAN; 2 patologiniai AKRT rezultatai – neabejotiną KAN; ortostatinė hipotenzija ir bent 1 patologinis AKRT mėginys – sunkią ir pažengusią KAN (1.1 pav.) [111].



1.1 pav. Kardiovaskulinės autonominės neuropatijos (KAN) stadijos. Adaptuota pagal: [111].

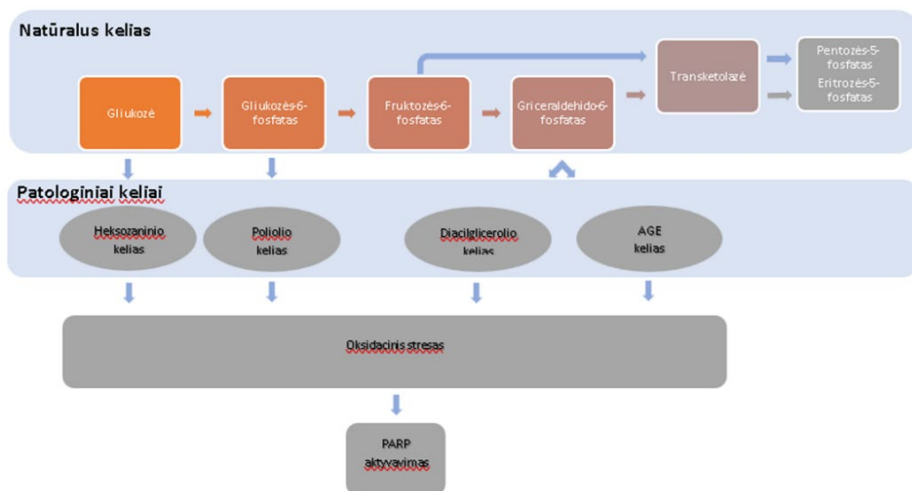
AKRT – autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimas; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija.

Kaip ir DSPN atveju, ištyrimas dėl KAN turi būti atliekamas diagnozės nustatymo metu CD2 pacientams ir praėjus 5-eriems metams po diagnozės nustatymo CD1 pacientams, vėliau – 1 kartą per metus esant bet kuriam CD tipui [57, 185]. Taip pat atliekama bet kada ligos eigoje nustačius būdingus simptomus ar kitas mikrovaskulines komplikacijas; prieš planuojamą didelės apimties operaciją ar vidutinio / didelio intensyvumo fizinį krūvį, ypač pacientams su bloga ilgalaikę glikemijos kontrole, didele kardiovaskuline rizika arba kitomis mikrovaskulinėmis komplikacijomis [172, 177].

1.2.3. Diabeto komplikacijų patogenezė

Diabeto komplikacijų patogenezė sudėtinga ir ne iki galo išaiškinta. Kiekvienos komplikacijos patogenezėi būdingi tam tikri specifiniai ypatumai, tačiau jas visas vienija hiperglikemijos sukelti intraląsteliniai pokyčiai.

Sveiko žmogaus organizme gliukozė pakopiškai metabolizuojama fermentinių sistemų į pentozės-5-fosfatą ir eritrozės-5-fosfatą, kurie toliau naudojami energetiniams ląstelės poreikiams glikoliziniu keliu [186]. Sergantiems diabetu gliukozės koncentracija ląstelėje viršija fiziologinę ribą ir fermentinių sistemų pajėgumą, todėl didėja tarpinių gliukozės apykaitos produktų, kurie aktyvina patologinius poliolio, heksozamino, diacilglicerolio ir galinių glikozilimo produktų (GGP) kelius (1.2 pav.) [187].



1.2 pav. Natūralus gliukozės apykaitos kelias ir hiperglikemijos suaktyvinti patologiniai gliukozės apykaitos keliai, indukuojantys oksidacinį stresą. Adaptuota pagal: [187].

AGE – galutiniai glikozilavimo produktai (angl. *advanced glycation end products*); PARP – ADP-ribozės polimerazė.

Poliolio kelias aktyvinamas veikiant fermentams aldozės reduktazei ir sorbitolio dehidrogenazei, dėl to padidėja gliukozės skilimas į sorbitolį ir fruktozę [188]. Pastarųjų medžiagų perteklius sukelia osmosinio gradiento padidėjimą ir kompensatorinį kitų osmolitų, t. y. mioinozitolio, taurino ir adenzino, pasišalinimą iš ląstelės. Mioinozitolio trūkumas sukelia fosfatidilinozitolio sumažėjimą, kuris naudojamas kaip substratas adenzintrifosfato (ATP) sintezei ir reikalingas Na^+/K^+ ATPazės aktyvumui [187]. Suaktyvėjęs fermentas aldozės reduktazė, dalyvaujantis gliukozei skylant į sorbitolį, sunaudoja daugiau NADPH, kuris reikalingas redukuoto antioksidanto glutationo atstatymui. Glutationo trūkumas padidina OS ląstelėje. Tolesnis sorbitolio skilimas į fruktozę sukelia nefermentinę glikaciją, toliau eikvoja NADPH ir didina GGP koncentraciją [189, 190].

Gliukozės perteklius ląstelėje nefermentiniu būdu jungiasi su aminorūgštimis, nukleorūgštimis, lipidais ir suformuoja pradžioje grįžtamus, o vėliau negrįžtamus junginius – GGP. Šie junginiai sutrikdo ląstelės baltymų ir pačios ląstelės funkcijas. Ekstraląsteliniai GGP jungiasi prie GGP receptorių (RGPP) ir sukelia uždegiminį procesą, aktyvina NADPH oksidazės ir padidina oksidacinį stresą. [189, 191].

Tarpinio metabolito gliukozės 6-fosfato perteklius aktyvina dar vieną pataloginį – heksozamino kelią, kuriame gliukozės 6-fosfatas verčiamas į uridino difosfato N-acetilgliukozaminą (UDPGlcNAc). UDPGlcNAc jungiasi prie transkripcijos faktorių – serino ir treonino liekanų ir sutrikdo jų veiklą. Vienas pagrindinių, faktorių aktyvinamo heksozimino kelio metu, yra specifishumo baltymas 1 (angl. *specificity protein 1* (Sp1), kuris padidina transformuojančio augimo faktoriaus – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ir plazminogeno aktyvatoriaus inhibitoriaus-1 (PAI-1) raišką, sukeliančią tolesnius metabolinius ir uždegiminius sutrikimus ląstelėje ir jos disfunkciją [190].

Diacylglicerolio kelio aktyvinimas padidina proteinkinazės C aktyvumą, kuri ląstelėje padidina įvairių faktorių raišką (pvz., PAI-1, branduolių faktoriaus kapa B (NF- κ B), TGF- β), ekstraląstelinio matriksa bei citokinių gamybą. Dėl šių pokyčių padidėja kraujagyslių endotelio kontraktiliškumas, pralaidumas ir proliferacija, sukelianti organų disfunkciją [187, 190].

Visų keturių patofiziologinių kelių aktyvinimas sukelia lėtinį uždegimą ir perteklinę LR gamybą [187]. Kai LR gamyba ląstelėje ir organizme persveria jų neutralizavimą, pasireiškia OS [192]. OS kartu su hiperglikemija aktyvina poli-ADP-ribozės polimerazę (PARP) (1.1 pav.), kuri skaldo nikotinamido adenino dinukleotidą (NAD⁺) į nikotinamidą ir ADP-ribozės liekanas. NAD⁺ trūkumas dar labiau padidina OS ir aktyvina tarpinius glikolizinius kelius, pažeidžia branduolio baltymus, sutrikdo genų raišką [187].

Be hiperglikemijos, mikrovaskulinių komplikacijų išsivystymo riziką taip pat didina dislipidemija. Esant dislipidemijai, laisvųjų riebiųjų rūgščių (LRR) perteklius metabolizuojamas β -oksidacijos metu, kuomet gaminasi reaktyviosios deguonies formos (ROS), uždegiminiai žymenys ir aktyvinami makrofagai. Taip pat β -oksidacijos metu padidėja Acetyl-CoA kiekis, kuris verčiamas į acilkarnitinus, kurie pasižymi toksiniu poveikiu ląstelėms, taip pat sukelia ATP trūkumą, oksidacinį stresą ir fagocitozę [155, 193]. ROS perteklius oksiduoja mažo tankio lipoproteinus (MTL), kurie jungiasi prie oksiduotų MTL receptorių 1 (angl. *oxidized low density lipoprotein receptor 1* – LOX1), į Toll panašių receptorių 4 (TLR4) ir RAGE [194]. Šie procesai toliau stimuliuoja uždegiminius pokyčius, didina DNR pažaidų kiekį ir apoptozę. Oksidaciniai procesai taip pat skatina cholesterolio oksidaciją, kuri prisideda prie ląstelės apoptozės [155].

Hiperglikemijos ir dislipidemijos sukeltas laisvųjų radikalų (LR) perteklius ląstelėje pažeidžia mitochondrijų DNR, baltymus ir membranas [190, 195]. Mitochondrijos – ląstelių organelės, dar vadinamos ląstelių jėgainėmis, atsakingos už gliukozės ir lipidų panaudojimą energijos, t. y.

adenozintrifosfato (ATP) gamybai [196]. Sergančiajam diabetu hiperglikemija, dislipidemija ir oksidacinis stresas sukelia mitochondrijų disfunkciją, dėl to sumažėja ATP sintezė ir dar labiau padidėja LR kiekis [197].

Taigi diabeto sukelti metaboliniai pokyčiai aktyvina patologinius glikolizinio kelio „šuntus“, sukeliamas lėtinis uždegimas, didėja LR kiekis ir oksidacinis stresas ląstelėje, pažeidžiamos ląstelių mitochondrijos, kurios užveda „*circulus vitiosus*“ ir LR gamyba dar labiau padidėja. LR perteklius pažeidžia ląstelių endoplazminį tinklą ir baltymus, sukelia oksidacines DNR pažeidas ir genomo nestabilumą [32].

Šie intraląsteliniai pokyčiai sukelia smulkiųjų kraujagyslių pažeidimus ir organų taikinių, t. y. inkstų, tinklainės, nervinio audinio, pažeidimą. Inkstuose sutrinka inkstų endotelio ląstelių ir podocitų funkcija, ir kaupiasi baltymai eksraląsteliniam matrikse [2]. Ankstyvose nefropatijos stadijose pasireiškia hiperfiltracija ir mezangiomo hipertrofija, vėlesnėse – progresuoja morfologiniai pokyčiai – bazinės membranos sustorėjimas, tubulointerstininė fibrozė ir glomerulų sklerozė [2, 99]. Šie pokyčiai sąlygoja padidėjusį inkstų pralaidumą plazmos baltymams, ir kliniškai ligos pradžioje pasireiškia mikroalbuminurija, kuri vėliau progresuoja į makroalbuminuriją ir laipsnišką glomerulų filtracijos greičio (GFG) mažėjimą [100, 198]. Diabetinės retinopatijos atveju vystosi tinklainės mikrokraujagyslių pažeidimas. Padidėjus kraujagyslių pralaidumui ir kapiliarų degeneracijai, tinklainėje formuojasi mikroaneurizmos ir eksudatai [198]. Kliniškai ankstyvoje ligos stadijoje šie pokyčiai pasireiškia kaip neproliferacinė retinopatija, o ligai progresuojant dėl tinklainės hipoksijos formuojasi naujos kraujagyslės ir pasireiškia proliferacinė retinopatija, kurios gydymui taikoma lazerio terapija ir antiangiogeninių vaistų (anti-VEGF, angl. *vascular endothelial growth factor*) injekcijos [188, 198].

Nervuose intraląsteliniai pokyčiai galiausiai sukelia neuronų išemiją, hipoksiją, apoptozę ir sutrikusią regeneraciją bei aksonų disfunkciją, demielinizaciją ir degeneraciją [154, 192, 199]. Jautriausios hiperglikemijos poveikiui ir pirmiausiai pažeidžiamos yra smulkios nemielinizuotos skaidulos, sudarančios didžiąją dalį periferinės nervų sistemos aksonų, ir perduodančios greito skausmo, vibracijos ir šaltčio pojūčius [200]. Ligai progresuojant pažeidžiami ir stambiųjų mielinizuotų nervinių skaidulų aksonai, atsakingi už lietimą, spaudimą, vibracijos, kūno padėties suvokimo pojūčius. Pirmosios yra pažeidžiamos ilgiausių mielinizuotų nervų (kojų) distalinės dalys, todėl tipiška diabeto sukelta aksonų pažeida prasideda pėdose, o ligai progresuojant – „kyla“ aukštyn apimdama ir plaštakas.

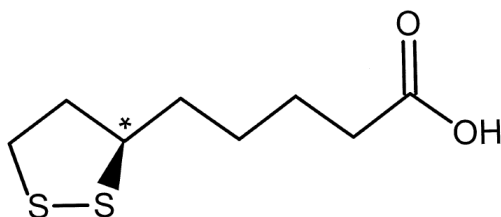
KAN, kaip ir DSPN atveju, pirmiausiai pasireiškia ilgiausio autonominės nervų sistemos klajoklinio nervo (*n. Vagus*) pažeidimas [103]. Šio nervo pažeidimas sukelia parasimpatinio tonuso sumažėjimą ir simpatinės nervų sistemos dominavimą, ligos pradžioje pasireiškiantį sumažėjusiu širdies susitraukimų dažnio (ŠSD) variabilumu, susilpnėjusiu barorefleksų jautrumu, tachikardija ir kairiojo skilvelio struktūros pokyčiais. Dažnai per 5-erius metus nuo parasimpatinės denervacijos išsivysto ir simpatinės nervų sistemos disfunkcija, prasidedanti skilvelių viršūnėje ir progresuojanti link širdies pamato [170].

Makrovaskulinių komplikacijų išsivystymas prasideda nuo stambiųjų kraujagyslių endotelio pažeidimo. Sergant CD hiperglikemija slopina azoto oksido gamybą kraujagyslių endotelio ląstelėse ir trombocituose, sutrikdo nuo endotelio priklausomą vazodilataciją ir padidina ROS gamybą [78]. Šie procesai pažeidžia kraujagyslių vientisumą, padidina jų kibumą ir pralaidumą ir sąlygoja imuninių ląstelių, t. y. makrofagų ir T ląstelių prikibimą prie kraujagyslės sienelės [201]. Dėl nutukimo ir dislipidemijos kraujotakoje padidėja uždegimo mediatorių, laisvųjų riebalų rūgščių ir mažo tankio lipoproteinų, kurie per pažeistą endotelį patekę į subendotelinį tarpą formuoja „putotas“ ląsteles ir aterosklerozines dėmes [78, 202]. Tokios dėmės dažniausiai formuojasi turbulentinėse zonose – kraujagyslių bifurkacijose, atsišakojimuose, linkiuose [203]. Ateroskleroziniam procesui progresuojant, dėmėse proliferuoja lygiųjų raumenų ląstelės, atsideda matrica, dažnai vyksta nekrozė ir taip susiformuoja sudėtinga aterosklerozinė plokštelė, kuri arterinės hipertenzijos fone gali destabilizuotis, plyšti, sukelti hiperkoaguliaciją ir susiformavimo vietoje užkimšti kraujagyslę, pvz., koronarus, arba migruoti ir embolizuoti distalines kraujagysles [63, 198].

1.2.4. Diabeto komplikacijų gydymas

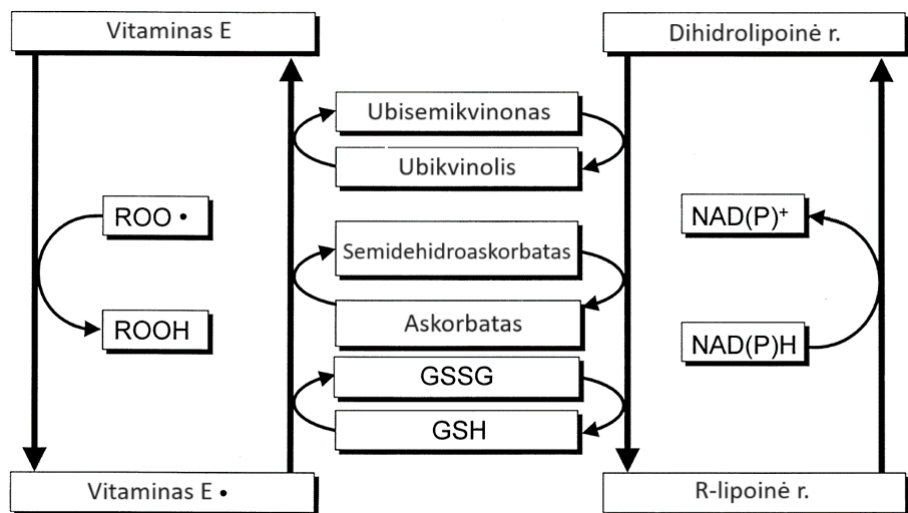
Diabeto komplikacijų gydymas pirmiausiai apima rizikos veiksnių, tokių kaip hiperglikemija, nutukimas, dislipidemija ir hipertenzija, korekciją. Gyvenimo būdo korekcija, laikantis sveikos mitybos rekomendacijų ir reguliariai mankštintis, padeda palaikyti optimalų kūno svorį, gerina jautrumą insulinui ir metabolinius rodiklius, mažina lėtinį uždegimą ir taip sumažina diabeto komplikacijų atsiradimo ir progresavimo riziką [204, 205]. Medikamentinė komplikacijų prevencija taip pat orientuota į anksčiau minėtų rizikos veiksnių korekciją, pvz., glikemiją ir svorį mažinantys, antihipertenziniai, antilipidiniai vaistai. Jau išsivysčiusioms komplikacijoms

taikomas simptominis arba patogenezinis gydymas. Simptominiu gydymu siekiama sumažinti komplikacijų sukeltus simptomus ir pagerinti paciento gyvenimo kokybę. Priklausomai nuo komplikacijos, taikoma lazerio ir antiangiogeninių vaistų (anti-VEGF) terapija diabetinės retinopatijos gydymui, hemodializės nefropatijos sukeltos terminalinės lėtinės inkstų ligos gydymui ir skausmo malšinimas, diabetinės pėdos priežiūra distalinės simetrinės polineuropatijos gydymui [206]. Patogenezinis gydymas orientuotas į vieną ar kelis ligos ir komplikacijų patogenezinius mechanizmus, kuriuos veikiant siekiama atitolinti komplikacijų išsivystymo ar progresavimo riziką. Atlikta daugybė eksperimentinių tyrimų su įvairiais patogenezinio gydymo preparatais, tačiau klinikiniuose tyrimuose daugumos šių preparatų teigiamo poveikio nepavyko įrodyti [98]. Vienas iš nedaugelio preparatų, rekomenduojamų patogeneziniam mikrovaskulinės komplikacijos, diabetinės neuropatijos, gydymui yra α -lipoinė rūgštis (1,2-ditiolano-3-pentanoinės r. – ALR) [207]. ALR – tai trumpos grandinės riebalų rūgštis, pasižyminti tiek lipofilinėmis, tiek hidrofilinėmis savybėmis ir veikianti kaip stiprus antioksidantas [208]. ALR struktūra pavaizduota 1.3 pav.



1.3 pav. Molekulinė α -lipoinės rūgšties (1,2-ditiolano-3-pentanoinės r.) struktūra. Adaptuota pagal [208].

ALR sintetinama žmogaus mitochondrijose (daugiausiai kepenyse) arba pasisavinama su augaliniu (daugiausiai randama špinatuose, brokoliuose, pomidoruose) arba gyvuliniu (daugiausiai randama kepenyse, inkstuose) maistu [208]. Gaunama su maistu ALR gerai pasisavinama plonajame žarnyne (iki 93%), tačiau tik 20–30 % praeina pro kepenų barjerą [209]. Organizme ALR redukuojama į DHLR ir pasižymi dvigubu antioksidaciniu veikimu: tiesiogiai jungiasi ir šalina laisvuosius radikalus arba atstato kitus endogeninius antioksidantus (vit. E, vit. C (askorbatą), glutationą ir koenzimą Q10 (ubikvinolį). Pastarasis veikimas formuoja antioksidantų tinklą, pavaizduotą 1.4 pav. [208].



1.4 pav. Lipinės rūgšties ir dihidrolipinės rūgšties sąveika su kitais antioksidantais. Adaptuota pagal: [208].

GSH – redukuotas glutatonas; GSSG – oksiduotas glutatonas; NAD(P)⁺ – oksiduotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas; NAD(P)H – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas; ROO – peroksilo radikalas; ROOH – hidroperoksidas.

Šalinama ALR su šlapimu, daugiausiai bismetilmerkaptio-heksanoinės rūgšties forma [209].

Eksperimentiniuose tyrimuose nustatytas teigiamas ALR poveikis lėtinėms ligoms, susijusioms su OS padidėjimu, pvz., Alzheimerio liga, nutukimas, hepatosteatozė, kardiovaskulinės ligos ir arterinė hipertenzija, kai kurios onkologinės ligos, glaukoma ir osteoporozė, tačiau klinikiniuose tyrimuose ALR nauda šių ligų gydymui nepatvirtinta [210]. Plačiausiai eksperimentiniuose ir klinikiniuose tyrimuose nagrinėtas ALR poveikis diabeto komplikacijų gydymui. Pavyzdžiui, diabetinės retinopatijos eksperimentiniuose tyrimuose su žiurkėmis nustatyta, kad ALR sumažina oksidacinį stresą ir pagerina metabolizmą akių tinklainės mitochondrijose [211], tačiau klinikinių tyrimų rezultatai prieštaringi: viename nedidelės imties tyrime gydymas ALR derinyje su kitais antioksidantais pagerino diabetu sergančių pacientų elektroretinogramos rezultatus [212], tačiau kitame tyrime gydymas ALR neatitolino makulos edemos išsivystymo CD pacientams [213]. Tyrimuose su pelėmis ir žiurkėmis taip pat įrodytas teigiamas ALR poveikis diabetinei nefropatijai – gydymo metu sumažėjo albumino ekskrecija su šlapimu ir oksidacinė inkstų pažeida [214–216], tačiau

klinikinių tyrimų rezultatai nevienareikšmiai [217–219]. Vienintelė patvirtinta klinikinė indikacija ALR vartojimui yra diabetinė neuropatija, ir kai kuriose šalyse šis gydymas yra kompensuojamas. Eksperimentinių tyrimų duomenimis įrodyta, kad ALR periferiniuose nervuose atstato gliutinationo lygį, mažina lipidų peroksidaciją, padidina antioksidacinių fermentų aktyvumą, gerina kraujotaką, gliukozės pasisavinimą ir metabolizmą, dėl to gerėja nervų apsauga ir laidumo greitis [220]. Klinikiniuose tyrimuose ir keliose šiuos tyrimus apibendrinančiose meta-analizėse ir sisteminėse apžvalgose patvirtintas ALR efektyvumas simptominės neuropatijos gydymui [221–224]. Klinikinių tyrimų duomenys dėl ALR poveikio į oksidacinius žymenis nevienareikšmiai. CD2 suaugusiems pacientams ir CD1 paaugliams, gydytiems atitinkamai 6 ir 3 mėn. tabletine ALR forma, nenustatytas reikšmingas oksidacinių žymenų skirtumas, palyginus su placebo [225, 226]. Kitame tyrime CD2 pacientams, gydytiems tabletine ALR forma 6 mėn., stebėta oksidacinio žymens 8-OHdG mažėjimo tendencija, tačiau reikšmingas skirtumas, palyginus su placebo, nepasiektas [286]. Dializuojamiems CD pacientams 6 mėn. skiriant tabletinę ALR formą, stebėtas reikšmingas oksidacinių žymenų, taip pat ir 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino (8-OhdG), sumažėjimas, palyginus su pradine koncentracija ir kontroline grupe [227].

In vitro tyrimuose su gimdos kaklelio [228] ir krūties [229] vėžio ląstelėmis nustatyta, kad ALR pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, veikdama su onkopatologija susijusių miRNR ekspresiją. ALR derinyje su kitais maisto papildais skirtas nutukusiems pacientams teigiamai įtakojo miRNR, susijusių su nutukimu ir hepatosteatoze, ekspresiją [230]. Tiriant CD2 pacientus su distaline simetrine polineuropatija, nustatyta, kad klinikinis atsakas į gydymą ALR galimai susijęs su miR-146a geno polimorfizmu [231].

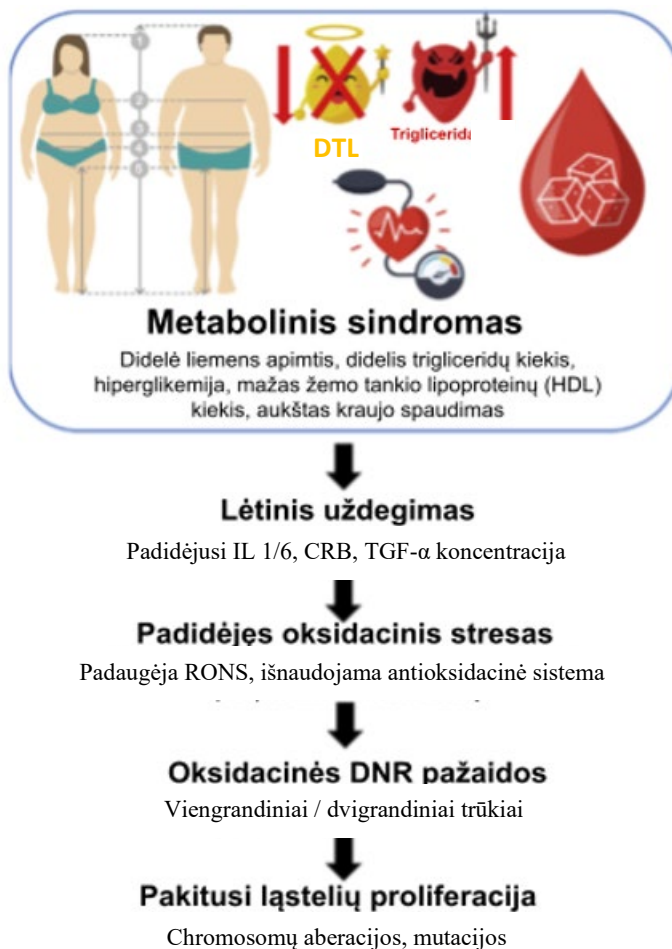
1.3. Citogenetiniai ir epigenetiniai diabeto ir jo komplikacijų žymenys

Žymuo ar biožymuo yra išmatuojamas biologinės būklės rodiklis. Medicinos srityje žymenys naudojami ligos diagnozės, prognozės, atsako į gydymą ar patogenezės vertinimui [232]. Optimaliu atveju, žymenys yra specifiški ligai ar biologiniam procesui, tiksliai nustatomi net nedideliais kiekiais ir (ar) ankstyvoje ligos / proceso stadijoje, atsikartoja įvairiose populiacijose, neinvazyviai ir lengvai atliekami ir aiškiai koreliuoja su ligos baigtimi [232, 233]. Klinikinėje diabetologijos praktikoje naudojami šie žymenys: gliukozės tolerancijos testas ir glikemijos lygis – CD diagnozės nustatymui; insulino ir C-peptido koncentracija, autoantikūnai – CD tipo patikslinimui; HbA1c ir glikemijos profilis – atsako į gydymą vertinimui ir ligos prognozavimui [234].

Genetiniai ir epigenetiniai žymenys šiuo metu dar nenaudojami klinikinėje praktikoje, tačiau padeda suvokti ligos išsivystymo, progresavimo rizikos ir atsako į gydymą veiksnius ir mechanizmus. Tam tikri genų polimorfizmai [74, 235, 236], genų ir miRNR raiška [237], DNR ir histonų metilinimas [238–240], DNR ir chromosomų pažaidos sveikų tiriamųjų ir CD sergančių pacientų organizmuose skiriasi ir yra svarbūs diabeto, diabeto komplikacijų ir lydinčių ligų išsivystymui. Žemiau aptartos šiame darbe CD sergantiems pacientams ir kontrolinei grupei ištirtos DNR ir chromosomų pažaidos, taip pat miRNR raiška.

1.3.1. DNR pažaidos

Nutukimas, dislipidemija, hiperglikemija ir hipertenzija yra būdingi CD, susiję su lėtine uždegimine būkle, LR pertekline gamyba ir OS (1.5 pav.) [32]. OS sukelia įvairaus pobūdžio oksidacines DNR pažaidas, pvz., bazių oksidavimą, abazines sritis, DNR grandinių trūkius ir sąsiuvų tarp DNR ir baltymų susiformavimą [33, 241]. DNR pažaidos gali neigiamai paveikti ląstelių proliferaciją, sukelti mutacijas, ląstelių, audinių ir organų disfunkciją bei paskatinti CD progresavimą [32], diabeto komplikacijų, taip pat ir diabetinės neuropatijos, išsivystymą [42].



1.5 pav. Schema, vaizduojanti metabolinio sindromo, oksidacinio streso, oksidacinių DNR ir chromosomų pažaidų ryšį. Adaptuota pagal: [32].

CRB – C reaktyvusis baltymas; DTL – didelio tankio lipoproteinai; IL 1/6 – interleukinas 1/6; RONS – reaktyviosios deguonies ir azoto formos; TAG – trigliceridai; TGF- α – tumor augimo faktorius α (angl. *tumor growing factor α*).

Siekiant įvertinti oksidacinių DNR pažaidų apimtį, galima išmatuoti kraujo ar šlapimo oksiduotų nukleorūšių biožymenis. Guaninas yra viena jautriausių nukleotidų oksidaciniam poveikiui dėl žemo oksidacijos-redukcijos potencialo, todėl LR poveikyje linkęs sudaryti įvairius oksiduotus junginius, atspindinčius OS apimtį [242]. Oksiduoti guanino junginiai organizme gali susiformuoti spontaniškai arba veikiant tam tikriems išorės veiksniams, pvz., cheminėms medžiagoms, jonizuojančiajai arba UV spinduliuotei. Didesnis kiekis nustatomas vėžinėse ląstelėse [243] ir sergant metabolinėmis ligomis,

tokiomis kaip CD, dislipidemija, nutukimas [244, 245]. Vienas dažniausiai tiriamų oksiduotų guanino junginių yra 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas (8-OHdG). Tyrimų duomenis pacientams su prediabetu ir CD nustatoma didesnė 8-OHdG koncentracija šlapime [246–251] ar plazmoje [252], palyginus su sveikais asmenimis, taip pat nustatyta teigiama koreliacija tarp HbA1c ir šlapimo 8-OHdG [244, 251, 253, 254] ar plazmos 8-OHdG [255]. Kinijoje atliktame didelės apimties tyrime (1316 tiriamųjų) CD2 pacientams su diabeto komplikacijomis, ypač su makrovaskulinėmis komplikacijomis, nustatyta aukštesnė 8-OHdG koncentracija šlapime, palyginus su pacientais be diabeto komplikacijų [250]. Analogiški rezultatai gauti ir kitame, mažesnės apimties Brazilijoje atliktame tyrime su CD2 pacientais [249]. Daugumoje kitų tyrimų, vertinančių atskirų mikrovaskulinių komplikacijų sąsajas su 8-OHdG koncentracija, nustatytas teigiamas ryšys. Pacientams su diabetine neuropatija nustatyta didesnė 8-OHdG koncentracija kraujo serume ir šlapime, palyginus su CD pacientais be neuropatijos [256]. CD2 pacientams su diabetine pėdos opa taip pat nustatyta didesnė 8-OHdG koncentracija plazmoje, palyginus su kontrole ir CD2 pacientais be diabetinės pėdos opos [255]. Prospektyviniame tyrime nustatyta, kad CD1 pacientai su aukštesne 8-OHdG koncentracija plazmoje 10-ies metų bėgyje turi didesnę riziką apatinių galūnių amputacijai, palyginus su CD1 pacientais, kurių 8-OHdG koncentracija plazmoje yra žemesnė [257]. CD1 ir CD2 pacientams su žema diabetinės retinopatijos rizika (nėra arba yra lengva retinopatija) nustatyta žemesnė 8-OHdG koncentracija šlapime, palyginus su pacientais su didele diabetinės retinopatijos rizika (vidutinio sunkumo arba sunki DR) [109]. Kitame tyrime CD2 pacientams su proliferacine retinopatija nustatyta reikšmingai didesnė 8-OHdG koncentracija šlapime, palyginus su CD2 pacientais su neproliferacine retinopatija ar be retinopatijos [253]. Reikšmingai didesnė 8-OHdG koncentracija nustatyta ir CD2 pacientų su retinopatija stiklakūnyje, palyginus su diabetu nesergančiais pacientais su makulopatija [258]. Tyrimų rezultatai su diabetine nefropatija yra prieštaringi: vienuose tyrimuose nustatyta didesnė 8-OHdG koncentracija plazmoje CD2 pacientams su mikro ir makroalbuminurija [244, 254, 259] ir CD1 pacientams su albuminurija arba sumažėjusiu GFG (glomerulų filtracijos greičiu), palyginus su pacientais su normoalbuminurija [260], tačiau kitame CD2 tyrime nustatyta koreliacija tarp šlapimo albumino / kreatino santykio ir 8-OHdG šlapime, tačiau reikšmingo 8-OHdG skirtumo tarp pacientų su ir be nefropatijos nestebėta [247].

Didesnė 8-OHdG koncentracija ADVANCE prospektyviniame didelės imties tyrime, kuriame dalyvavo 3766 CD2 pacientai, buvo susijusi ir su padidėjusiu bendru ir kardiovaskuliniu pacientų mirštamumu [261].

Apibendrinant tyrimų duomenis, CD1 ir CD2 pacientams būdinga didesnė 8-OHdG koncentracija, palyginus su diabetu nesergančiais asmenimis, 8-OHdG koncentracijos padidėjimas CD pacientams susijęs su didesne makrovaskulinių ir mikrovaskulinių komplikacijų rizika ir didesniu mirštamumu.

DNR pažaidos taip pat gali būti nustatomos citogenetiniais ir molekuliniiais metodais, pvz., kometų analizės ir seserinių chromatidžių mainų testais.

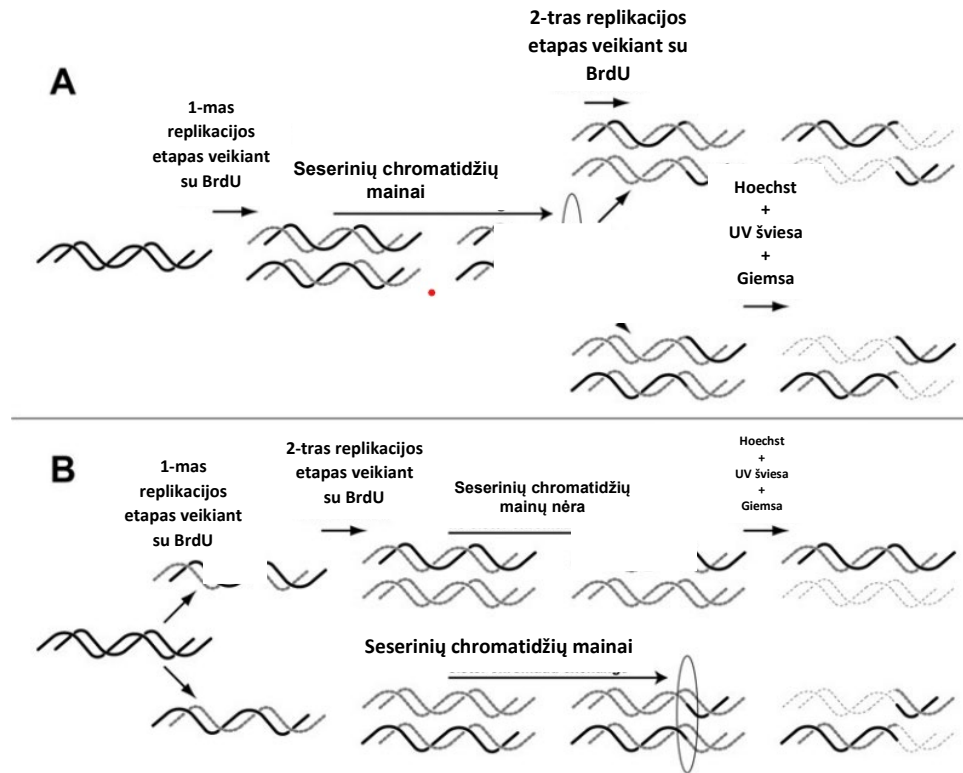
Kometų analizė – tai gana paprastas, greitas ir jautrus testas, parodantis DNR trūkius ląstelėse. Kometų testas nėra specifinis, jo metu nustatomos įvairios DNR pažaidos – viengrandiniai ir dvigrandiniai trūkiai, apurininės sritys, tarpinės reparacijos sritys, replikacijos trūkiai [262]. Tokios pažaidos – normali dinaminė ląstelės DNR būklė, priklausanti nuo DNR pažaidos ir reparacijos santykio. Dauguma šių pažaidų vėliau reparuojamos, ir tik dalis virsta mikrobranduoliais (MB) arba chromosomų aberacijomis (CA). Atliekant tyrimą modifikuotu kometų metodu ir papildomai naudojant specifines endonukleazes, galima įvertinti ne tik DNR trūkius, bet modifikuotas, dažniausiai oksiduotas, DNR bazes [262].

Tyrimų, vertinančių DNR pažaidas kometų testu CD sergantiesiems, palyginti su kontrole, rezultatai prieštaringi, tačiau vėlesniuose tyrimuose teigiama sąsaja tarp CD ir kometų testu aptinkamų pažaidų nustatoma dažniau. Moller ir kt. 2018 m. atliktoje apžvalgoje [263] įvertinę 33 diabetu sergančiųjų atvejo-kontrolės tyrimus, atliktus naudojant kometų testą, apibendrina, kad jei iki 2006 m. atliktų tyrimų tik 50 % iš jų CD sergantiesiems nustatyta statistiškai reikšmingai daugiau DNR pažaidų, palyginus su kontrole, tai nuo 2007 m. tyrimų, nustatiusių teigiamą minėtą sąsają, dalis išaugo iki 85 %. Taip pat nenustatyta reikšmingo DNR pažaidų kiekio skirtumo tarp CD1 ir CD2 pacientų, tačiau nustatyta silpna koreliacija tarp glikemijos arba HbA1c ir kometų rodiklio ($r = 0,23-0,29$, priklausomai nuo kometų testo tipo) [263]. Kadangi kometų tyrimo rezultatams gali turėti įtakos įvairūs preanalitiniai ir analitiniai veiksniai [262], procedūrų standartizavimas ir validavimas galėjo nulemti vėlesnių tyrimų tikslesnę diagnostiką ir teigiamus rezultatus.

Seserinių chromatidžių mainai (SCM) – procesas, vykstantis DNR replikacijos metu, kuomet įvyksta chromosomos seserinių chromatidžių trūkiai ir reciprokinis susijungimas, apsikeičiant seserinių chromatidžių regionais [264].

Tiriant SCM testu naudojamas į timidiną panašus nukleozido analogas – 5-bromo-2'-deoksiridinas (BrdU), kuris replikacijos metu įjungiamas į

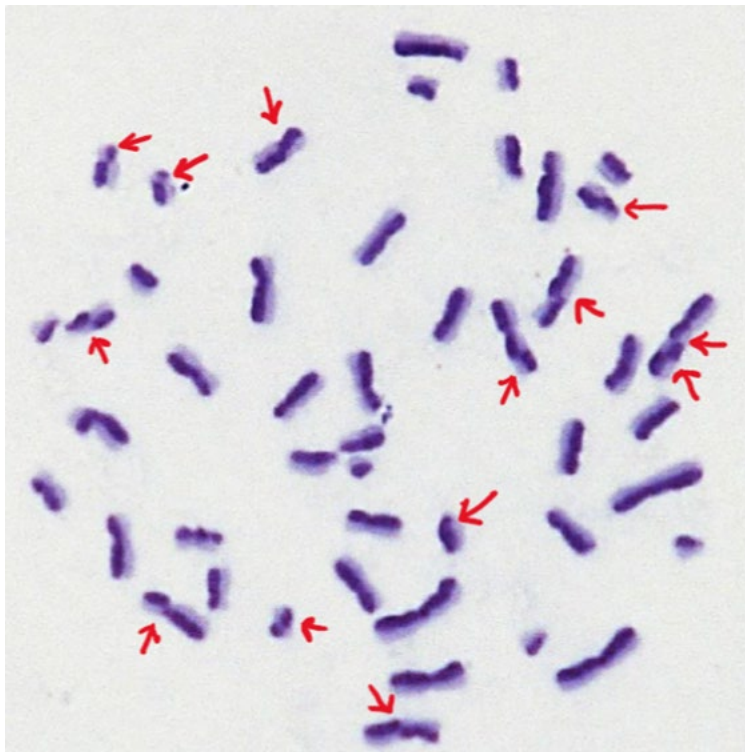
besiformuojančią DNR grandinę [264, 265]. Po dviejų replikacijos etapų seserinės chromatidės metafizėje viena nuo kitos skiriasi BrdU kiekiu – viena seserinė chromatidė sudaryta iš vienos DNR grandinės be BrdU ir kitos grandinės su BrdU, o kita seserinė chromatidė sudaryta iš abiejų DNR grandinių su BrdU [264]. SCM gali įvykti tiek pirmajame tiek antrajame replikacijos etape [265] (1.6 pav.).



1.5 pav. Seserinių chromatidžių mainų (SCM) susidarymo schema. **A.** SCM įvyksta pirmajame DNR replikacijos etape. **B.** SCM įvyksta antrajame replikacijos etape. Adaptuota pagal: [265].

BrdU - 5-bromo-2'-deoksiuridinas; UV šviesa - ultravioletinė šviesa.

Grandinių skirtumui išryškinti naudojami interkaluojantys, ultravioletinę šviesą sugeriantys fluorescenciniai dažai, kuriuos paveikus ultravioletine šviesa chromatidės su BrdU išblyksta, todėl chromatidės su didesniu BrdU kiekiu atrodo šviesesnės (1.7 pav.) [265].



1.7 pav. Sėserinių chromatidžių mainai (pažymėti raudonomis rodyklėmis) matomi šviesiniu mikroskopu antrojo ląstelės replikacinio ciklo metafazėje. Mikrofotografija originali.

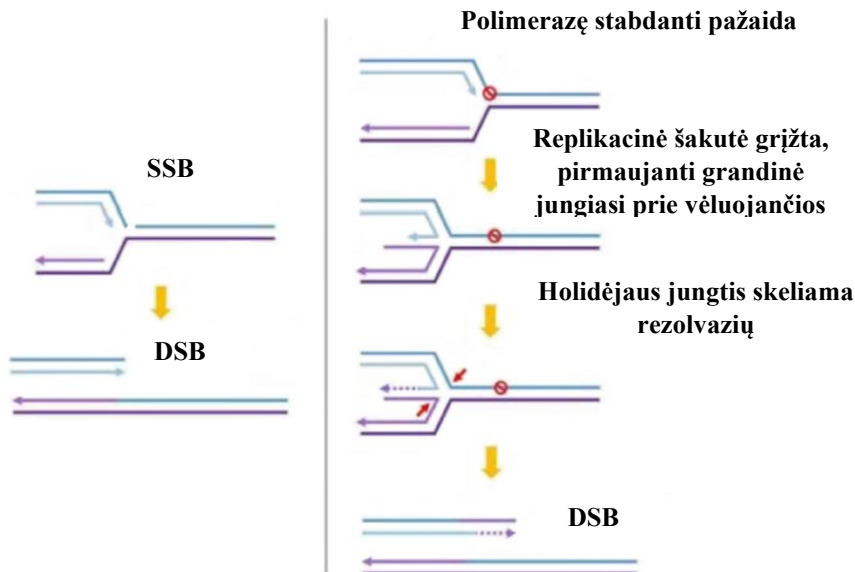
Klinikiniuose tyrimuose gaunami prieštaringi rezultatai dėl SCM sąsajų su CD ir klinikiniais CD rodikliais. Jei vienuose tyrimuose CD pacientams, palyginti su kontroline grupe, nustatytas didesnis SCM dažnis [33, 33, 34], tai kituose – tokio skirtumo nestebėta [35]. Taip pat kai kuriuose tyrimuose stebėta teigiama sąsaja tarp SCM ir HbA1c [36], tačiau kituose, priešingai, toks ryšys nenustatytas [33]. Tyrimuose nenustatyta sąsaja tarp SCM ir diabeto stažo [33, 36], nors tokia sąsaja galėtų būti logiška dėl ilgalaikio toksinio hiperglikemijos poveikio ląstelės struktūroms ir DNR. Klinikinių tyrimų, vertinančių SCM ryšį su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis,

nėra atlikta, tačiau nustatytas didesnis SCM dažnis dializuojamų pacientų su terminaliu LIL limfocituose, palyginus su sveikų asmenų kontrole [41].

Reikalingi papildomi tyrimai, padėsiantys įvertinti SCM dažnio asociaciją su CD ir klinikiniais CD rodikliais, pvz., CD tipu, glikemijos kontrole, ligos stažu, diabeto komplikacijomis ir lydinčiomis ligomis.

1.3.2. Chromosomų pažeidos

Chromosomų aberacijos (CA) – tai chromosomų struktūros pokyčiai, atsirandantys dėl dvigrandinių DNR trūkių. CA gali atsirasti veikiant išorės mutagenams, tačiau dažniausia priežastis yra endogeniniai procesai, vykstantys DNR replikacijos metu [266]. Dažniausiai dvigrandiniai DNR trūkiai susiformuoja iš viengrandinių DNR trūkių, sukeliančių pirmaujančios grandinės sintezės sustabdymą ir replikacinės šakutės suirimą (1.8 pav.) [266].



1.8 pav. Schema, parodanti, kaip DNR replikacijos metu dėl viengrandinio trūkio (ssb) ar DNR pažeidos susiformuoja dvigrandiniai DNR trūkiai (dsb). Adaptuota pagal [266].

Dvigrandiniai DNR trūkiai taip pat gali susidaryti dėl replikacinės šakutės strigimo, kurį sukelia neįprastos antrinės DNR struktūros, stambios DNR pažeidos (angl. *bulky lesions*), polimerazę blokuojančios oksidacinės

pažaidos, abazinės sritys, DNR sąsiuvos ar transkripcijos kompleksų ir DNR surišančių baltymų kolizija [266].

CA gali susiformuoti vienoje ar keliuose chromosomose. Pagal chromosomų struktūros pokyčių pobūdį ir trūkių lokalizaciją CA klasifikuojamos į 3 pagrindines grupes:

- Paprastosios aberacijos (trūkiai): chromosomos ar chromatidės trūkis, kuomet atstumas tarp „nutrūkusių“ vietų didesnis nei chromatidės plotis.
- Tarpchromosominiai mainai – susiformuojantys tarp nehomologinių chromosomų.
- Viduchromosominiai mainai – suformuojantys tame pačiame chromosomos petyje arba skirtinguose tos pačios chromosomos pečiuose [267].

Chromosomų mainai gali būti pilni (nelieka nesusijungusių trūkių vietų) arba nepilni, simetriniai ir asimetriniai. Jei tarpchromosominiai mainai vyksta sąveikaujant dviems trūkių vietoms, asimetrinių mainų atveju visada susiformuoja acentrinis fragmentas. Mitozės metu šis fragmentas nesitvirtina prie verpstės siūlų ir yra prarandamas, kartu prarandama genetinė medžiaga (nesubalansuotos aberacijos), ir sukelia ląstelės žūtis. Be to, dažnai asimetrinių mainų metu susidariusios chromosomos (pvz., dicentrinės chromosomos) sukelia mechanines kliūtis ląstelės dalijimosi metu. Simetrinių mainų atveju acentriniai fragmentai nesusidaro, genetinė medžiaga nėra prarandama (subalansuotos aberacijos) ir tokie struktūros pokyčiai daugeliu atveju gali būti perduodami kitoms ląstelių kartoms [267].

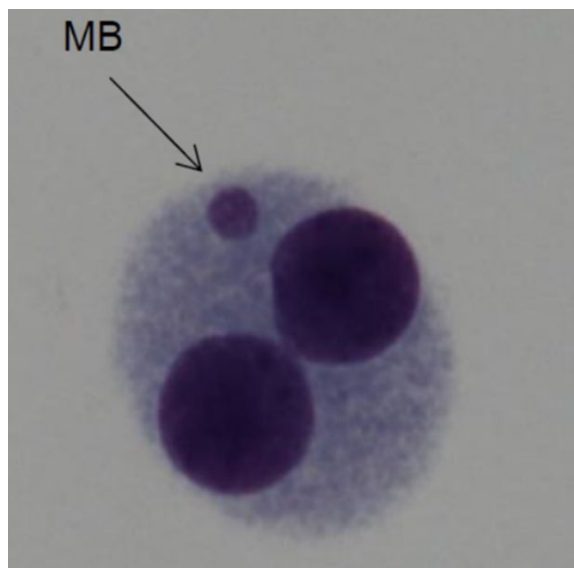
Tyrimų, vertinančių CA sąsajas su CD, rezultatai prieštaringi. Didelės apimties tyrime, kuriame dalyvavo 1002 didelės kardiovaskulinės rizikos grupės moterys, 204 iš jų sergančios CD2, CD2 grupėje nustatyta ženkliai didesni CA kiekiai, palyginus su CD2 nesergančiomis pacientėmis [38]. Taip pat nustatyta, kad vidutiniškai 5,45 metų stebėjimo laikotarpyje mirusios CD2 pacientės tyrimo pradžioje turėjo didesnę CA kiekį, ir šis skirtumas jaunesnio amžiaus pacienčių grupėje pasiekė statistinį reikšmingumą [38]. Mažesnės apimties CD1/CD2 pacientų tyrime [39] ir CD2 pacientų tyrime [37] taip pat nustatyta teigiama sąsaja tarp CD ir CA. Pirmajame iš šių tyrimų taip pat nustatyta teigiama sąsaja tarp CA ir rūkymo CD sergantiems pacientams [39], antrajame – teigiama CA ir diabeto stažo sąsaja [37]. CA padidėjimas nustatytas ir nėščiųjų diabetu sergančioms moterims ir jų naujagimiams, palyginus su sveikomis moterimis ir jų naujagimiais, tačiau skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo, galimai, kaip autoriai apibendrina, dėl gerai kontroliuojamos glikemijos ir trumpo hiperglikemijos laikotarpio [268].

Kitame CD1 pacientų tyrime nenustatytas CA padidėjimas, palyginus su kontroline grupe [33]. Skirtumas su kontroline grupe taip pat nenustatytas naujai diagnozuotų arba negydytų CD2 pacientų tyrime [35] ir palyginus dializuojamus CD (tipas nepatikslintas) su kitos kilmės terminaliniu inkstų nepakankamumu tiriamuosius [40].

Apibendrinant, CA sąsajos su CD galimai priklauso nuo diabeto tipo, diabeto stažo ir žalingų įpročių, taip pat CA padidėjimas gali būti susijęs su didesniu CD pacientų mirštamumu. *In vitro* tyrimuose taip pat nustatytas metformino, pirmos eilės pasirinkimo vaisto diabetui gydyti, genotoksiškumas [269].

Mikrobranduoliai (MB) – tai į branduolį panašios struktūros, susiformavusios iš visos chromosomos ar chromosomos fragmento mitozės metu [42]. MB susiformuoja, kai chromosoma ar jos fragmentas dėl pažeidimų neprisitvirtina prie mitozinės verpstės siūlų ir suformuoja atskirą darinį, padengtą membrana.

Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių analizė (angl. *Cytokinesis-block micronucleus* – CBMN) naudojama aneuploidijoms ir struktūrinėms aberacijoms įvertinti [42]. Tiriant šiuo testu indukuojamas limfocitų branduolių dalinimasis, tačiau veikiant citochalazinu B sustabdoma ląstelių citokinezė. Taip susiformuoja vieną kartą pasidaliję dvibranduoliai limfocitai, o ląstelėse su DNR pažeidimais – ir MB. (1.9 pav.)



1.9 pav. Dvibranduolis limfocitas su mikrobranduoliu (MB). Mikrofotografija originali.

MB iš visų DNR pažeidų plačiausiai ištirti CD pacientų populiacijoje. Palyginti su sveikais asmenimis, MB dažnis didesnis pacientams, sergantiems CD2 [32, 42], nutukimu [270, 271] ir metaboliniu sindromu [272]. Nustatytas teigiamas ryšys tarp MB dažnio ir cukrinio diabeto klinikinių rodiklių: progresavimo [43], CD trukmės [44, 45] ir blogos glikemijos kontrolės [42, 44, 46, 47]. Taip pat didesnis MB dažnis nustatytas pacientams su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis – diabetine nefropatija [45] ir DSPN [44]. Tačiau didžioji dalis aukščiau minėtų tyrimų atlikti su CD2 sergančiais pacientais, o tyrimų, patvirtinančių MB dažnio sąsajas su CD1, taip pat platesnių tyrimų su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis, trūksta [32, 48].

1.3.3. MiRNR

MikroRNR (miRNR) – trumpos (19–25 nukleotidų ilgio), nekoduojančios RNR, kurios veikia prisijungdamos prie matricinės RNR (mRNR) ir slopindamos jos transliaciją ar sukeldamos transkripto degradaciją neigiamai reguliuoja genų raišką posttranskripciniame lygyje [273]. MiRNR sąveikauja su 60 % žmogaus mRNR ir taip reguliuoja daugelio genų veiklą bei turi įtakos svarbiausioms ląstelių funkcijoms [274]. Vienos miRNR jungiasi specifškai prie tam tikrų mRNR, kitos – gali reguliuoti daugelio mRNR raišką.

Eksperimentinių ir klinikinių tyrimų duomenys patvirtina skirtingą miRNR raišką sergančiųjų CD su mikrovaskulinėmis ar makrovaskulinėmis komplikacijomis audiniuose, palyginus su sveikų tiriamųjų audiniais [275, 276]. Diabeto patogenezėje miRNR dalyvauja veikdamos kasos β -ląstelių funkciją ir (arba) insulino rezistenciją [277]. B-ląstelių funkciją miRNR veikia per β -ląstelių apoptozę, proliferaciją, diferenciaciją ir insulino sekreciją [277]. Audinių rezistenciją insulinui miRNR veikia per insulino signalinę sistemą – slopindamos arba aktyvindamos insulino receptorių ir toliau insulino signalą ląstelėje perduodančias molekules, tokias kaip insulino receptoriaus substratas ir fosfoinozitido 3-kinazė. Signalinės molekulės aktyvina gliukozės transporterį-4 (GLUT-4), kuris perneša gliukozę iš kraujo į periferinius (riebalinių ir raumeninių) audinius ir kepenis bei mažina hiperglikemiją [277]. Diabetinių mikrovaskulinių komplikacijų vystymąsi sąlygoja miRNR, susijusios su 4 patofiziologiniais procesais: angiogeneze, uždegimu, apoptoze ir fibroze [55]. Diabetinės neuropatijos sąsajos su audinių miRNR yra mažiausiai ištirtos, palyginus su kitomis mikrovaskulinėmis komplikacijomis ir tik eksperimentiniuose tyrimuose. Pelių, sergančių diabetu ir diabetine

neuropatija, nerviniame audinyje nustatyta padidėjusi miR-146a [278], sumažėjusi miR-29b [279] ir pakitusi miR-184-5p ir miR-190a-5p [280] raiška.

MiRNR randamos ne tik organizmo audiniuose, tačiau gali būti išmatuojamos ir visuose organizmo skysčiuose, pvz., kraujyje, šlapime, seilėse, ašarose, piene, cerebrospinaliniame skystyje – vadinamosios cirkuliuojančios miRNR [281, 282]. MiRNR cirkuliuoja „supakuotos“ vezikulėse, apoptoziniuose kūneliuose, egzosomose, mikrodalelėse ar susijungusios su baltymais ir išlieka nepakitusios ne tik standartinėmis, bet ir kintančiomis sąlygomis, pvz., šaldytuose, ilgai kambario temperatūroje laikytuose, pakitusio pH mėginiuose [281, 283]. Daugėja duomenų, kad ne tik audinių, bet ir cirkuliuojančių miRNR raiška sergantiesiems prediabetu, diabetu ir diabetinėmis komplikacijomis skiriasi nuo sveikų asmenų [275]. Nustatytos tam tikros miRNR, susijusios su likutine kasos β -ląstelių funkcija, CD1, prediabeto ir CD2 rizika [49–53], nėščiųjų diabeto rizika ir pregestacinio diabeto bagtimi [284, 285], diabeto kontrole [54] ir diabetinėmis komplikacijomis [55]. Diabetologijoje miRNR galėtų būti taikomos kaip biožymenys ankstyvai diabeto diagnostikai, ligos kontrolei ir gydymo vertinimui, diabeto komplikacijų rizikos vertinimui, nėščiųjų diabeto rizikos ir pregestacinio diabeto išeičių predikcijai. Kaip ir audinių miRNR, cirkuliuojančių miRNR sąsajos su diabetine neuropatija mažiausiai ištirtos, palyginus su kitomis mikrovaskulinėmis komplikacijomis. Nedidelės apimties tyrime CD2 pacientams su DSPN nustatyta padidėjusi miR-128a ir sumažėjusi miR-155 ir miR-499a koncentracija, o pacientams su KAN – sumažėjusi miR-155 koncentracija, palyginus su pacientais be KAN [286].

Daugėja duomenų apie galimą MiRNR panaudojimą ne tik diagnostiniais, bet ir terapiniais tikslais – pavyzdžiui, eksperimentiniuose tyrimuose su nutukusiomis CD2 pelėmis miR-103 ir miR-107 nutildymas aktyvino signalinę insulino receptoriaus sistemą kepenyse ir riebaliniame audinyje bei sumažino hiperglikemiją [287]. Skiriant MiR-214-3p eksperimentinėms CD žiurkėms, sumažėjo dorzaliųjų ragų ganglijų (anlg. *Dorsal root ganglion*) neuronų apoptozė ir uždegimas, pagerėjo nervo kraujotaka ir laidumo greitis bei sumažėjo hiperalgezija [288].

Kol kas miRNR panaudojimą klinikinėje praktikoje apsunkina bent keletas priežasčių. Dažnai ta pati miRNR dalyvauja keliuose patofiziologiniuose procesuose ir pasižymi nedideliu specifiskumu, todėl persidengia sveikų ir sergančių tiriamųjų rezultatai arba miRNR padidėjimas būdingas ne vienai patologinei būklei [275]. Taip pat tyrimams su MiRNR būdingas gana prastas rezultatų atsikartojamumas. Iš dalies nevienalyčius

rezultatus gali nulemti tyrimo dizaino, tiriamųjų skirtumai (CD tipas, ligos stažas, gretutinė patologija, vartojami vaistai) ar skirtingi diabeto komplikacijų diagnostikos kriterijai. Tačiau miRNR tyrimų rezultatams dažnai turi įtakos ir specifiniai, tik tyrimams su miRNR būdingi veiksniai: preanalitiniai, t. y. mėginių laikymo sąlygos, mėginių paruošimas, arba analitiniai – skirtingos tyrimo metodikos ir medžiagos (kraujas, plazma, serumas, šlapimas ar jo nuosėdos, biopsinis audinys) [275]. Siekiant išvengti šių paklaidų, labai svarbu tiksliai apibrėžti tyrimo dizainą, kruopščiai atrinkti ir aprašyti tiriamųjų imtį ir klinikinius tyrimo metodus, suvienodinti miRNR mėginių paėmimo, laikymo, paruošimo ir ištyrimo metodikas.

Apibendrinant, literatūros duomenimis nustatyti CD sergančiųjų pacientų ir sveikų asmenų tam tikrų genetinių ir epigenetinių žymenų skirtumai, tačiau tyrimų rezultatai dažnai prieštaringi, trūksta duomenų apie tam tikras pacientų grupes (pvz., CD1), sąsajas su demografiniais rodikliais, komplikacijomis ir lydinčiomis ligomis. Disertacijos tikslas – detalai įvertinti diabetu sergančių pacientų klinikinę būklę, ištirti aukščiau aprašytų DNR pažaidų dažnį, žymenis ir miRNR raišką ir susieti su klinikiniais rodikliais, taip pat gautus rezultatus palyginti su kontroline grupe.

2. METODAI

2.1. Įtraukimo kriterijai ir klinikinis ištyrimas

Tyrimas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų endokrinologijos centre. Biomedicininiam tyrimui atlikti gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr.2019/6-1146-635) (priedas 1). Į tyrimą įtrauktos dvi tiriamųjų grupės – pacientai, sergantys pirmojo ar antrojo tipo cukriniu diabetu, ir kontrolinė grupė. Visi tiriamieji pasirašė informuoto asmens sutikimo formą dalyvauti tyrime „Genetinių, epigenetinių veiksnių ir gyvenimo būdo įtaka komplikacijų išsivystymui cukriniu diabetu sergantiems pacientams“ (CD pacientai – priedas 2 ir kontrolinė grupė – priedas 3). Siekiant užtikrinti tiriamųjų konfidencialumą, kiekvienam tiriamajam suteiktas identifikacinis kodas, koduoti duomenys kaupti specialiai tyrimui sukurtoje duomenų bazėje.

Įtraukimo į tyrimą kriterijai

Cukriniu diabetu sergantys pacientai:

- Vyrai arba moterys, kurių amžius ≥ 18 ir ≤ 89 metų.
- Sergantieji pirmojo arba antrojo tipo cukriniu diabetu. Cukrinio diabeto diagnozė nustatyta remiantis medicinine dokumentacija arba, pacientams su naujai diagnozuotu cukriniu diabetu, remiantis Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymu „Dėl cukrinio diabeto ambulatorinio gydymo kompensuojamaisiais vaistais tvarkos aprašo patvirtinimo“ [166].
- gydomi ir konsultuojami Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Endokrinologijos skyriuje arba Dienos stacionare.

Kontrolinė grupė:

- Vyrai arba moterys, kurių amžius ≥ 18 ir ≤ 89 metų.
- Nesergantys cukriniu diabetu. Cukrinio diabeto diagnozė atmesta nustačius rytinę alkio glikemiją veniniame kraujyje < 6 mmol/l.
- Gydomi ir konsultuojami Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose ar kitose gydymo įstaigose dėl kitų ligų ar būklių, nenurodytų neįtraukimo kriterijuose.

Neįtraukimo į tyrimą kriterijai

- sergantys piktybinėmis, sunkiomis nekoreguotomis sisteminėmis, metabolinėmis, uždegiminėmis, infekcinėmis, paveldimomis ar kraujo ligomis;
- susidūrę su toksiniais veiksniais ilgą laiką (sunkiaisiais metalais, švinu, gyvsidabriu, dažais, klėjais ar kt.);
- nėščios arba maitinančios moterys;
- psichikos ligomis sergantys pacientai;
- asmenys, atsisakantys dalyvauti biomediciniame tyrime.

Pacientų ištyrimo schema pateikta priede 4.

Pacientų anamnezės rinkimas ir apklausa. Rinkti demografiniai, epidemiologiniai ir klinikiniai pacientų duomenys, remiantis tiriamojo asmens medicinine dokumentacija ir apklausa. Duomenų rinkimui ir tiriamųjų apklausai naudojamos specialiai tyrimui paruoštos anketos (priedas 5).

Lydinčios ligos vertinamos pagal poliligitumo (angl. MCC – *multiple chronic conditions*) klasifikaciją, kai

3-mis ir daugiau lydinčiomis ligomis sergantis pacientas buvo vertintas kaip poliligitas [289, 290].

Subjektyvūs neuropatijos simptomai vertinami naudojant Neuropatijos simptomų skalės klausimyną (angl. NSS – *neuropathy symptom score*). Klausimyną sudaro 4 klausimai, kiekvieno klausimo atsakymai vertinami nuo 0 iki 2 balų. Maksimali klausimyno balų suma – 9 balai, ribinė vertė polineuropatijai nustatyti ≥ 3 balai. (priedas 6). Esant skausminei polineuropatijai, skausmo stiprumui nustatyti naudojamas Universalus skausmo vertinimo įrankis (angl. UPAT – *Universal Pain Assessment Tool*): 0 – nėra skausmo, 1–3 – silpnas, 4–6 – vidutinis, 7–8 – stiprus, 9–10 – nepakeliamas skausmas [291, 292].

Objektyvi apžiūra. Pacientas tiriamas šiltoje, ramioje patalpoje. Paciento antropometriniai rodikliai (ūgis, svoris) matuojami ryte, nevalgius, su apatiniais ar lengvais viršutiniais rūbais. KMI apskaičiuojamas kūno svorį kilogramais padalinus iš ūgio metrais kvadratu. AKS matuojamas 5 min. pailsėjusiam, sėdinčiam pacientui. Abi paciento pėdos remiasi į žemę, kojos nesikryžiuotos. Matuojamas K žąsto AKS, K ranka sulenkta ir padėta ant stabilaus plokščio paviršiaus, viršutinė rankos dalis – širdies aukštyje. Atliekami 3 AKS matavimai ir išvedamas sistolinio ir diastolinio AKS vidurkis. Objektyvios apžiūros anketa pateikta 7 priede.

Diabetinės pėdos ištyrimas. Tyrimas pradedamas nuo paciento pėdų apžiūros – įvertinama, ar nėra pėdų deformacijos, nuospaudų, atvirų žaizdų,

opų, infekcijos ar amputacijos. Vertinama pėdų nagų būklė – ar nėra onichomikozės, ar pėdų nagai neįaugę, pėdų kraujotaka – palpuojamas *a. dorsalis pedis* ir *a. tibialis posterior* pulsas.

Neuropatijos negalios skalė (NNS; angl. NDS - *neuropathy disability score*) įvertinama atliekant Achilo sausgyslės refleksų tyrimą ir specialius periferinės neuropatijos tyrimus – vibracijos, skausmo ir temperatūros jutimo mėginius. Papildomai pėdų išopėjimo rizika vertinama atliekant lietimą mėginį su Semmes–Weinstein 10 g monofilamentu.

Atliekant mėginius, pacientas sėdi užmerktomis akimis. Prieš atliekant mėginius kojose, pacientas supažindinamas su jutimu, pridėdant tyrimo instrumentus (vibruojantį kamertoną, Tip-Therm lazdelę, Neurotip adatą ar monofilamentą) prie krūtinės ar kaktos, kad pacientas žinotų, ko tikėtis. Kiekvienas mėginys atliekamas tris kartus – du patologiniai mėginiai rodo jutimo sutrikimą.

Vibracijos jutimo mėginys atliekamas naudojant graduotą 128 Hz kamertoną (0, 2, 4, 6, 8). Atliekant tyrimą, kamertonas statmenai priglaudžiamas prie kojos nykščio dorsalinės dalies proksimaliau nago. Vibracijos jutimas laikomas normaliu, jei pacientas jaučia vibraciją ties 6–8 kamertono skalės balais, mažesnis balas nei 6 – rodo vibracijos jutimo sutrikimą.

Temperatūros jutimo mėginys atliekamas naudojant Tip-Therm lazdelę. Paciento pėdos dorsalinis paviršius apie 1 sekundę priliečiamas šaltu (metalinu) ir šiltu (plastikiniu) galu. Temperatūros jutimas laikomas nesutrikusiu, jei pacientas atskiria du iš trijų prisilietimų.

Achilo sausgyslės refleksas tiriamas neurologiniu plaktuku ant kėdės klūpinčiam pacientui. Kaire ranka prilaikant tiriamojo blauzdos raumenis, dešine suduodama per Achilo sausgylę ir vertinama pėdos plantarinė fleksija, išgaunama susitraukus *m.triceps surea*. Jei fleksija išgaunama – rezultatas vertinamas kaip normalus, patologijos atveju – refleksas susilpnėjęs arba išnykęs.

Skausmo mėginiui naudojama Neurotip adata. Paciento pėdos nykščio dorsalinis paviršius duriamas su adata, deformuojant odą. Skausmo jutimas laikomas nesutrikusiu, jei pacientas jaučia du iš trijų prisilietimų.

Lietimo mėginys atliekamas Semmes–Weinstein 10 g monofilamentu. Atliekant tyrimą monofilamentu priliečiami keturi kiekvienos pėdos taškai plantariniame paviršiuje (nykščio distalinė falanga ir trys metatarsofalanginiai taškai ties I, III, V pirštais). Monofilamentas pridėdamas statmenai pėdos odos paviršiui ir spaudžiamas apie 2 sekundes kol sulinksta. Kiekvienas pėdos

taškas monofilamentu priliečiamas 3 kartus. Lietimo jautimai nesutrikę, jei pacientas jaučia du iš trijų prisilietimų.

Neurometrija (NM). Tyrimas atliekamas šiltoje, ramioje patalpoje bet kuriuo dienos metu. Specialus paciento paruošimas nereikalingas. Tyrimas atliekamas specialiu neurometru (NervScan3000). Pacientas tiriamas sėdint. Rekomenduota atsipalaiduoti. Pirmiausiai tirama dešinė kūno pusė, po to – kairė. Tyrimo vietos oda nuvaloma abrazyviniu geliu, o elektrodai patepami elektros impulsui laidžiu geliu. Naudoti du elektrodai, dedami ant pėdų nykščio šoninių paviršių. Tyrimo metu, tyrėjui nuspaudus neurometro srovės klavišą, prietaisas paeiliui generuoja skirtingo dažnio (2000 Hz, 250 Hz ir 5 Hz) elektros impulsus. Šie impulsai atitinkamai stimuliuoja periferinių nervų A β , A δ ir C skaidulų grupes. Tiriamasis pajutęs elektros srovės impulsus, apibūdinamus kaip dilgčiojimas, skruzdėlių bėgiojimas ar skausmas tiriamoje vietoje, praneša apie tai žodžiu tyrėjui. Neurometras automatiškai matavimus kartoja kelis (3–4) kartus, kol gaunami statistiškai patikimi rezultatai ($p < 0,006$) ir neurometro ekrane parodomas tyrimo rezultatas – H, M, L nervinių skaidulų. Neurometro rodmenys galimi nuo 1 iki 25. Rodmuo nuo 1 iki 5 nurodo hiperesteziją, nuo 6 iki 13 – normalų jautimą, nuo 14 iki 25 – hipoesteziją. Vidutinė įprastinio tyrimo trukmė – 30 min. (apima tyrimo atlikimą, aprašymą ir išvadą). NM atlikimo protokolas pateiktas 8 priede.

Elektroneurografija (ENG). ENG tyrimas atliekamas standartiniu Nihono Kohdeno aparatu „Neuropack X1 MEB-2300“ pagal rekomenduojamas metodikas, patvirtintas Tarptautinės klinikinės neurofiziologijos federacijos (angl. ICFN – *International Federation of Clinical Neurophysiology*).

ENG tyrimas atliekamas stimuliuojant šiuos nervus: rankoje vienoje pusėje vidurinio (*n. Medianus*) nervo motorines ir jutimines skaidulas, kojose – vienpus šėvinį (*n. Peroneus*), blauzdinį (*n. Tibialis*) ir abipus blauzdos odos (*n. Suralis*) nervus.

Tiriant motorines nervų skaidulas, naudojami plokšteliniai registruojantys elektrodai. Registruojantis elektrodas tvirtinamas virš raumens, o referentinis – ant raumens sausgyslės. Stimuliuojama dviejuose taškuose: distaliniame ir proksimaliniame. Tiriant vidurinio nervo jutimines skaidulas, naudojami žiediniai pirštų elektrodai, blauzdos odos nervas tirtas plokšteliniais elektrodais. Nervai stimuliuojami pavieniais supramaksimalaus stiprumo srovės impulsais (t. y. 20 % stipresne už reikalingą sukelti visišką raumens susitraukimą). Naudoti 20 Hz ir 3 kHz filtrai, stimuliacijos dažnis 1 Hz, impulso trukmė 0,2 ms. Užregistravus suminį raumens veikimo potencialą SRVP, (angl. *compound muscle action potencial*), vertinama atsako amplitudė

SRVP – aukštis (mV) nuo izolinijos iki negatyvaus piko; distalinis latentinis periodas (DL) – laikas nuo stimulo artefakto iki potencialo nuokrypio nuo izolinijos (ms) bei nervinio impulso laidumo motoriniu nervu greitis (NLG), apskaičiuojamas pagal formulę padalinus atstumą tarp stimuliacijos taškų iš latentinių periodų distaliniame ir proksimaliniame stimuliacijos taškuose skirtumo (m/s). Užregistravus jutiminio nervo veikimo potencialą (JNVP – angl. *sensory nerve action potential*, SNAP), vertinama amplitudė – JNVP aukštis nuo pradinio pozityvaus piko iki negatyvaus piko, arba nuo izolinijos iki negatyvaus piko, jei pradinis pozityvus pikas neregistruotas (μ V); distalinis latentinis periodas (DL) – laikas nuo stimulo artefakto iki potencialo nuokrypio nuo izolinijos (ms), bei nervinio impulso laidumo sensoriniu nervu greitis (NLG), apskaičiuojamas pagal formulę padalinus atstumą tarp stimuliacijos ir registracijos taškų iš latentinio periodo (m/s). ENG rodikliai palyginti su kontrolinės grupės atitinkamo amžiaus ir lyties normaliomis vertėmis, nustatytomis mūsų laboratorijoje. Neurografijos protokolas pateiktas 9 priede.

Autonminių kardiovaskulinių refleksų tyrimas (AKRT). Tyrimas atliekamas kliniškai stabiliems, nekarščiuojantiems, nedehidratuotiems pacientams šiltoje, ramioje aplinkoje ryte apie 8 val. Tyrimui naudojamas Cardiosys Extra aparatas.

Prieš tyrimą pacientui rekomenduojama: 2 val. iki mėginio nevalgyti, nevartoti alkoholio ar kofeino turinčių gėrimų, nerūkyti ir neleisti greito veikimo insulino; 24 val. iki mėginio neužsiimti intensyvia fiziniu veikla; nutraukti vaistus, kurie galėtų turėti įtakos tyrimo rezultatams, pvz., antidepresantus, antihistaminus, simpatolitikus ir diuretikus [57].

Optimalus sistolinis AKS tyrimo metu <160 ir >120 mmHg, vengti ryškos hiper- ar hipoglikemijos.

Tyrimo rezultatai vertinami atsižvelgiant į gretutinę patologiją. Rezultatams gali turėti įtakos lėtinė obstrukcinė plaučių liga ar kvėpavimo nepakankamumas, inkstų nepakankamumas, koronarinė širdies liga, ŠN, morbidinis nutukimas.

Tyrimo atlikimas ir vertinimas pateiktas 10 priede. Tyrimo protokolas 11 priede.

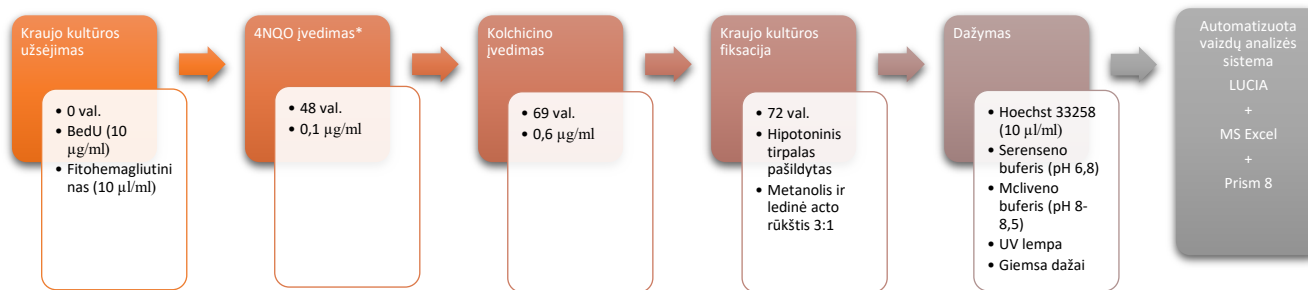
2.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino nustatymas kraujo plazmoje

8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas (8-OhdG) kraujo plazmoje tiriamas naudojant ELISA DNR pažaidų rinkinį, tyrimas atliekamas remiantis gamintojo tyrimo protokolu (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD, USA). Naudojant šį rinkinį nedideliais kiekiais galima nustatyti ir kitas dvi oksiduoto guanino rūšis (oxG): 8-hidroksiguanoziną ir 8-hidroksiguaniną. Naudojant gamintojo 8-OhdG tirpalą, vėmingsukurta standartinė kreivė su 2× skiedimais, apimančiais 0–8000 pg/ml diapazoną. Kievių paciento oxG lygis matuojamas dviejuose 50 µl plazmos mėginiuose, praskiestuose 8 kartus. Absorbcijos rodmenys vertinami per 10 minučių nuo mėginio paruošimo esant 450 nm, naudojant mikroplokštelių skaitytuvą Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.3. Citogenetiniai tyrimai

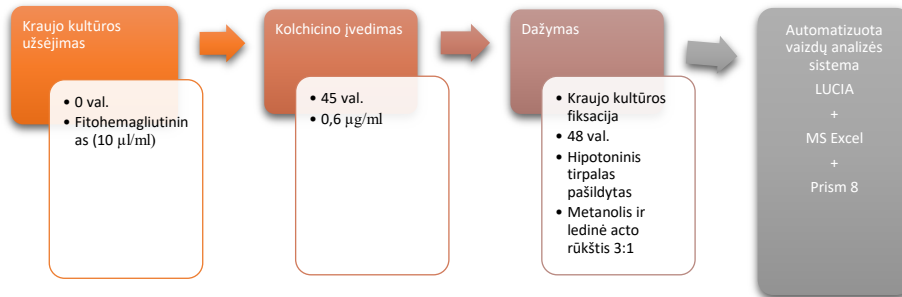
Citogenetiniai tyrimai atlikti naudojant seserinių chromatidžių mainų (SCM), chromosomų aberacijų (CA) ir mikrobranduolių dvibranduoliuose limfocituose (CBMN) testus. Tyrimo schemos pavaizduotos 2.1 pav.

A. Sėserinių chromatidžių mainų tyrimo *in vitro* atlikimo schema

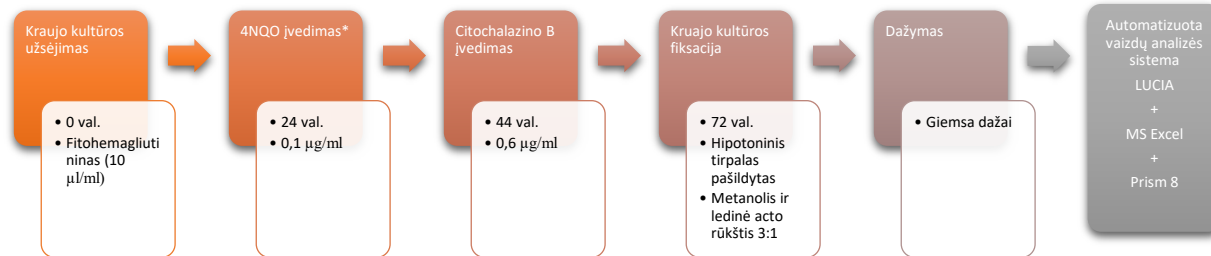


*– NQO įvedamas į pusę visų SCM kultūrų, kita pusė lieka NQO nepaveikta.

B. Chromosomų aberacijų tyrimo *in vitro* atlikimo schema



C. Mikrobranduolių dvibranduoliuose limfocituose tyrimo in vitro atlikimo schema



*– NQO įvedamas į pusę visų MB kultūrų, kita pusė lieka NQO nepaveikta.

2.1 pav. Citogenetinių tyrimų schemas. A. Sėserinių chromatidžių mainų (SCM) tyrimo schema. B. Chromosomų aberacijų (CA) tyrimo schema. C. Mikrobranduolių dvibranduoliuose limfocituose (MB) tyrimo schema. BrdU – 5-bromo-2'-deoksiuridinas; 4NQO – 4-nitrochinolino-1-oksidas.

Žmogaus periferinio kraujo limfocitų kultūros auginimas. Iš donorų alkūninės venos kraujo mėginiai imami į vienkartinius vakuuminius kraujo paėmimo mėgintuvėlius su ličio heparinu (Vacutainer®). Periferinio kraujo limfocitų auginimui ruošiamas mišinys iš terpės RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA), karščiu inaktyvinto embrioninio veršiuko serumo (Sigma Aldrich, USA) ir heparinizuoto kraujo (santykiu 13:2:1). Limfocitų stimuliacijai įdedama fitohemagliutinino (PHA-M) 10 µl/ml (Biological Industries, Israel), o diferenciniam seserinių chromatidžių išryškinimui papildomai – 5-bromo-2'-deoksiuridino (BrdU) 10 µg/ml (Sigma Aldrich, USA). Mišinys išpilstomas po 10 ml į flakonus ir užkemšamas steriliais kamšteliais. Tiriant CBMN ir SCM metodu kiekvieno paciento tiriamiems variantams paruošiama po keturis flakonus. Kraujo kultūra 48 (CA tyrimas) arba 72 (SCM ir MB metodai) valandas auginama termostate 37 °C temperatūroje 5% CO₂ atmosferoje.

CBMN tyrimui 44-tą val. įpilama citocholazino B (Sigma Aldrich, USA), o SCM ir CA tyrimuose likus trims valandoms iki fiksacijos įvedamas kolchicinas (Sigma Aldrich, USA), abiejų reagentų galutinė koncentracija 0,6 µg/ml.

Kraujo limfocitų kultūros fiksacija. Buteliukų turinys, kuriuose auginta kultūra, perpilamas į centrifugos mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 10 min. 600 × g (centrifuga Eppendorf 5702), tiriant SCM ir CA metodu, ir 8 minutes 400 × g, tiriant CBMN metodu. Viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas ir paliekama apie 0,5–1,0 ml suspensijos. Tolesnė fiksacijos eiga tiriant CA, SCM ir CBMN metodais skiriasi.

Tiriant CA ir SCM metodu nuosėdos resuspenduojamos ir užpilamos 10–12 ml iki 40 °C temperatūros pašildyto hipotoninio tirpalo (0,55% KCl). Kultūra palaikoma 30 min. termostate, 37 °C temperatūroje. Paruošiamas fiksatorius iš metanolio ir ledinės acto rūgšties mišinio (Sigma Chemical Co, USA), kurio santykis yra 3:1. Fiksatorius atšaldomas šaldiklyje. Kultūra centrifuguojama (600 × g, 10 min.), nusiurbiamas viršnuosėdinis skystis. Ląstelės resuspenduojamos hipotoninio tirpalo likutyje (~0,5 ml), užpilamos nedideliu kiekiu fiksatoriaus, gerai suplakamos ir fiksatoriumi užpildomas visas centrifugos mėgintuvėlis iki 8–10 ml. Po pirmosios fiksacijos ląstelių kultūra 25 min. laikoma šaldymo kameroje (–20 °C) ir po to centrifuguojama (600 × g, 10 min.).

Atliekant fiksaciją CBMN metodo atveju nuosėdos resuspenduojamos užpilant 8–10 ml šalto 4 °C temperatūros hipotoninio tirpalo (0,55% KCl). Kultūra nedelsiant centrifuguojama 8 min. esant 400 × g ir nusiurbiamas viršnuosėdinis skystis. Fiksatorius santykis yra 5:1. Pirmą kartą fiksuojant,

fiksatorius skiedžiamas 0,9 % NaCl tirpalu (1:1). Kaip ir tiriant SCM ir CA metodu ląstelės resuspenduojamos hipotoninio tirpalo likutyje (~0,5 ml), pilamas nedidelis kiekis fikatoriaus, vėl paplakama ir fikatoriumi užpildomas centrifugos mėgintuvėlis. Kultūra 20 min. laikoma kambario temperatūroje, po to centrifuguojama 8 min. esant $400 \times g$ ir nusiurbiamas viršnuosėdinis skystis.

Fiksavimo procedūra tiriant visais metodais kartojama dar du kartus užpilant iš karto visą neskiesto fikatoriaus porciją. Po paskutinės fiksacijos ląstelių kultūra laikoma šaldymo kameroje ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje) iki preparatų ruošimo.

Preparatų ruošimas, dažymas. Paruošiami objektiniai stikleliai – kruopščiai nuplaunami tekančiu vandeniu ir įmerkti į indą su distiliuotu vandeniu laikomi šaldymo kameroje, kol vandens paviršiuje susiformuoja ledo kristalų sluoksnis. Kultūra centrifuguojama ($600 \times g$, 10 min.). Po to nusiurbiamas viršnuosėdinis sluoksnis. Ruošiama po 4–5 preparatus kiekvienam variantui. Naudojant stiklinę Pastero pipetę, nuosėdos švelniai suplakamos fikatoriaus likutyje. Tiriant SCM ir CA metodu ląstelių suspensija (4–5 lašai) Pastero pipete užlašinama ant atšaldyto objekcinio stiklelio, palenkto $20\text{--}30^{\circ}$ kampui iš 50 cm aukščio ir atsargiai išdžiovinami virš spiritinės lempelės liepsnos. Tiriant CBMN metodu suspensija taip pat lašinama ant $20\text{--}30^{\circ}$ kampui palenkto stiklelio iš 5 cm aukščio, preparatai džiovinami ore.

Nedažytų preparatų kokybė patikrinama mikroskopu. Preparatai sendinami vieną parą iki dažymo procedūros.

Kitą dieną po sendinimo preparatai dažomi Giemsa dažais, skiestais distiliuotu vandeniu (1:9 CBMN ir SCM metodui, 1:20 CA metodui).

Tiriant SCM metodu preparatai iki dažymo Giemsa dažais papildomai dažomi fluorescenciniais Höechst 33258 (Sigma Aldrich, USA) dažais fosfatiname Serenseno buferyje (Sigma Aldrich, USA), pH 6,8. Höechst 33258 tirpalas ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) užpilamas ant viso objekcinio stiklelio paviršiaus ir laikoma 10–15 min. tamsoje. Preparatas praskalaujamas distiliuotame vandenyje ir išdžiovinamas. Gaminamas citratinis (McIlveny) buferis (pH 8,5) iš 0,1 M citrinos rūgšties (Merck KgaA, Germany) ir iš 0,2 M Na_2HPO_4 (Merck KgaA, Germany) (atitinkamai 0,55 ml ir 19,45 ml). Citratinis buferis užlašinamas ant preparatų ir objekcinis stiklelis uždengiamas dengiamuoju stikliuku, padengiant visą objekcinio stiklelio paviršiaus plotą. Objektiniai stikleliai apie 13 min. švitinami po 400 W galingumo UV lempa 20 cm atstumu. Praėjus 4 min. nuo švitinimo pradžios, ties dengiamųjų stiklelių sudūrimais lašinamas citratinis buferis – procedūra kartojama kas 4 min.

Pasibaigus švitinimo intervalui, preparatai praskalaujami distiluotame vandenyje ir išdžiovinami kambario temperatūroje.

Preparatų analizė. Nudažyti preparatai analizuojami Nikon ECLIPSE E 200 mikroskopu, naudojant automatizuotą vaizdų analizės sistemą LUCIA. Analizuojamos ląstelės, turinčios 44–47 kokybiškai nusidažiusias, vidutiniškai spiralizuotas ir tolygiai metafizinėje ploštelėje išsibarsčiusias chromosomas. Vertinant SCM apskaičiuojamas vidutinis SCM kiekis, įvertinamas mažiausias ir didžiausias SCM kiekis tiriamajame variante. SCM kiekvienam paciento mėginio variantui analizuojama po 50 antrojo dalijimosi ciklo metafazinių plokštelių. Taip pat tiriamos aukšto SCM dažnio ląstelės (angl. *High frequency cells*, HFC), darančios įtaką SCM pasiskirstymui tarp ląstelių. HFC ląsteles identifikuojamos pagal Carrano ir Moore (1982 m.) metodą [293], pagal kurį sudedami visų kontrolinės grupės dalyvių ląstelių SCM dažniai į vieną imtį ir HFC ląstelė apibrėžiama kaip tokia, kurios SCM dažnis viršija 95–tąją kontrolinės grupės jungtinės imties procentilį. Atlikus skaičiavimus nustatyta, kad mūsų tyrime HFC ląstelės apibrėžiamos kaip tokios, kurių SCM dažnis viršija 14.

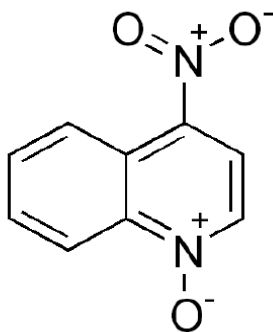
CA analizuojamos 200 metafazinių plokštelių ir, remiantis Tarptautine standartine citogenetine nomenklatūra (ISCN, 1985), suskirstomos į chromatidinio tipo ir chromosominio tipo. Chromatidinio tipo aberacijos, susidaro iš dvigrandinių DNR trūkių (dsb), susiformavusių po DNR replikacijos, o chromosominio tipo mutacijos, susidaro iš dsb, susiformavusių iki DNR replikacijos.

Chromatidinio tipo aberacijos:

1. Chromatidiniai trūkiai (ctb) – tarpai chromatidėje, kurie didesni nei chromatidės plotis.
2. Chromatidiniai mainai (cte) – kuomet dvi ar daugiau chromosomos jungiasi arba mainosi dalimis.
3. Chromosominiai trūkiai (csb) – abiejų chromatidžių gale įvykę simetriški trūkiai. Likusi dalis gali būti aptinkama kaip acentriniai fragmentai ar acentriniai žiedai.
4. Chromosominiai mainai (cse) – susidaro, kuomet dvejose ar daugiau chromosomų susidaro trūkiai ir tų chromosomų galai jungiasi tarpusavyje ar su kitomis chromosomomis. Šiai aberacijų grupei priklauso žiedinės ir dicentrinės chromosomos, translokacijos ir kt.

MB vertinti dvibranduoliuose limfocituose, vidutiniškai 2000 ląstelių vienam ištyrimui. CBMN vertinami naudojant tuos pačius dvibranduolių ląstelių ir mikrobranduolių analizės kriterijus kaip HUMN projekte [294].

Jautrumo mutagenui testas. Tiriant MB ir SCM, buvo atliekamas ir jautrumo mutagenui testas. Jautrumo mutagenui testas naudojamas *in vitro* DNR reparacijos efektyvumo vertinimui [295]. Testo metu ląstelių kultūros paveikiamos mutagenu ir naudojant citogenetinius metodus (pvz., MB, SCM) vertinamos indukuotos DNR pažaidos. Jos apskaičiuojamos iš mutagenu paveiktų kultūrų SCM ar MB kiekio atimant nepaveiktose kultūrose nustatytą SCM ar MB kiekį. Kiekio skirtumai žymimi atitinkamai SCM-IND arba MB-IND. Didesnis indukuotų pažaidų kiekis rodo didesnę jautrumą mutagenui ir galimai sumažėjusį reparacijos efektyvumą [295]. Testui atlikti buvo naudotas 4-nitrochinolino-1-oksidas (4NQO, angl. *4-nitroquinoline-1-oxide*). 4NQO yra sintetinis aromatinis heterociklinis junginys (2.2 pav.), veikiantis kaip cheminis mutagenas ir kancerogenas. Jis sudaro chemiškai aktyvius metabolitus, kurie jungdamiesi su aminorūgštimis ir nukleorūgštimis suformuoja stabilus aduktus [296] ir sukelia DNR pažaidas [297].



2.2 pav. 4-Nitrochinolino-1-oksido strukūrinė formulė

4NQO (Sigma Aldrich, USA) CBMN tyrimui į kultūrą buvo įvedamas 24-tą, o SCM tyrimui – 48-tą ląstelių kultivavimo valandą, galutinė konc. 0,1 µg/ml.

2.4. MiRNR tyrimai

MikroRNR tirtos taikant kiekybinę polimerazės grandininės reakcijos (kPGR) metodą. Atrinktos mikroRNR, kurios, literatūros duomenimis, susijusios su CD ir diabeto komplikacijų išsivystymo rizika: miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p ir miR-223-3p. PGR tyrimo metu atliekamas RNR

skyrimas, komplementarios DNR (kDNR) sintezė ir amplifikavimas ir realaus laiko PGR.

RNR išskiriama iš šaldytų leukocitų mėginių 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 vandeningis 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.

Komplementarios DNR (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.

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

Naudojant kPGR metodą įvertinti 4-ių miRNR kiekiai: miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p ir miR-223-3p. KPGR atliekama MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip mėgintuvėliuose su MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips dangteliais arba mėgintuvėlių plokštelėse MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml (visi Applied Biosystems™, Thermo Fisher

Scientific) su optinėmis plėvelėmis Adhesive sealing film, for qPCR, 50 µm (Nerbeplus). Reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui yra autoklavuotas, distiliuotas vanduo (galutinė koncentracija / tūris iki 20 µl), TaqPath 1–Step Multiplex Master Mix (1×), TaqMan Advanced MicroRNA Assay pradmenų ir hidrolizės zondų rinkinys (FAM) (0,4×), ROX (0,1 µM), kDNR (5 µl) pateikta 2.6 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 QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR sistema (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Kiekvienam mėginiui atliekama 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.

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).

2.5. Statistinė analizė

Kategoriniai duomenys pateikti skaitine ir procentine dažnių išraiška. Skirtumas tarp nominalių kintamųjų grupių vertintas naudojant Chi kvadrato (χ^2) testą. Aprašant tolydžius (kiekybinius) kintamuosius naudotas vidurkis su standartiniu nuokrypiu. Dviejų nepriklausomų grupių vidurkių palyginimui naudotas Manno ir Whitney U testas, trijų nepriklausomų grupių vidurkius – Kruskal ir Wallis testas.

Atliekant daugianarę regresinę analizę chromosomų aberacijų kintamieji buvo transformuoti pagal vidutinės kvadratinės šaknies formulę: $Y = 0,5[(X)^{0,5} + (X + 1)^{0,5}]$, kur X yra chromosomų aberacijų skaičius 100-tui ląstelių ir Y – transformuotas kintamasis. Ši transformacija efektyviai stabilizuoja dispersiją [298]. SCM ir MB rodikliai analizuoti be transformacijos. Visi nepriklausomi kintamieji, naudoti demografinėi ir klinikinei tiriamųjų charakteristikai, buvo įtraukti į pradinę daugianarę

regresijos modelį. Tinkamiausi nepriklausomi kintamieji atrinkti naudojant pažingsninę daugianarę regresiją, vertinant p reikšmę ir dispersijos infliacijos koeficientą (angl. *Variance inflation factor*). Galutiniai modeliai atrinkti pagal geriausias R kvadrato, dauginės koreliacijos koeficiento ir suderinamumo mato reikšmes ir validuoti vertinant liekanų normalumo kriterijų, ekskliuduojant daugiakolineariškumą ir pasiekus apriorinę galią $>0,8$. Binarinių rodiklių priklausomybė nuo įvairių kintamųjų buvo įvertinta naudojant logistinę regresiją, nepriklausomus kintamuosius atrenkant pažingsninės regresijos būdu.

Statistiniai skaičiavimai buvo atlikti naudojant IBM SPSS Statistics v. 26.0 ir internetines statistines skaičiuokles Statistics Kingdom [299] ir Stats.Blue [300].

3. REZULTATAI

3.1. Tiriamųjų charakteristika ir klinikinio ištyrimo rezultatai

Į tyrimą įtraukti 176 tiriamieji: 66 CD1, 80 CD2 pacientai ir 30 kontrolinių asmenų. Demografiniai ir klinikiniai CD sergančiųjų ir kontrolinės grupės duomenys pateikti 3.1 lentelėje. Kontrolinėje ir CD2 grupėje įtraukta daugiau moterų (60,0 %), CD1 – vyrų (51,5 %), tačiau reikšmingo skirtumo tarp tiriamųjų grupių nenustatyta ($p > 0,05$, tikslios p reikšmės yra pateiktos 3.1 lentelėje). Daugiausiai rūkančiųjų buvo CD1 grupėje (31,8 %), mažiausiai – kontrolinėje grupėje (13,3 %). Rūkančiųjų skirtumas tarp CD1 ir CD2 pacientų reikšmingai skyrėsi ($p = 0,044$). CD2 pacientai buvo reikšmingai vyresni ir didesnio svorio (59,8 metai, $35,1 \text{ kg/m}^2$), palyginus su CD1 pacientais (40,8 metai, $23,7 \text{ kg/m}^2$) ir kontroline grupe (35,9 metai, $25,8 \text{ kg/m}^2$), $p < 0,05$. CD1 pacientai buvo reikšmingai mažesnio svorio nei kontrolinė grupė (KMI atitinkamai $23,7 \text{ kg/m}^2$ vs $25,8 \text{ kg/m}^2$, $p = 0,025$) ir CD2 pacientai (KMI $23,7 \text{ kg/m}^2$ vs $35,1 \text{ kg/m}^2$, $p = 0,001$). Šeiminė CD anamnezė dažnesnė CD1 ir CD2 pacientams, palyginus su kontroline grupe, tačiau reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp CD2 ir kontrolinės grupės (60 % vs 26,7 %, $p = 0,002$). Diabeto stažas ir mikrovaskulinių komplikacijų, tokių kaip diabetinė retinopatija, nefropatija, polineuropatija, dažnis CD1 ir CD2 grupėse nesiskyrė. KAN – vienintelė mikrovaskulinė komplikacija dažniau nustatyta CD2 nei CD1 pacientams (55,0 % vs 30,3 %, $p = 0,001$). CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais ir kontroline grupe, reikšmingai dažniau nustatytos lydinčios ligos, tokios kaip dislipidemija (atitinkamai 81,3 % vs 43,9 % ir 6,7 %), PAH (92,5 % vs 36,4 % ir 6,7 %), IŠL (23,8 % vs 6,1 % ir 0 %), visų palyginimų $p < 0,05$. CD1 pacientams šios ligos, palyginus su kontroline grupe, taip pat buvo dažnesnės, tačiau statistinis reikšmingumas pasiektas, palyginus PAH ir dislipidemiją ($p < 0,05$), bet ne IŠL ($p = 0,168$). Skydliaukės ligų dažnis tarp grupių nesiskyrė. Daugiau nei 2/3 CD2 pacientų (62,5 %) vartojo insuliną, panaši proporcija CD2 pacientų vartojo ir metforminą (72,5 %). Nedidelė dalis CD1 pacientų įtraukimo į tyrimą metu vartojo geriamuosius antidiabetinius preparatus (7,6 %), dėl netikslios diagnozės iki hospitalizacijos. Statinais gydyti 24,2 % CD1 ir 55,0 % CD2 pacientų, tačiau pacientų su dislipidemija dalis buvo ženkliai didesnė – 43,9 % CD1 pacientų ir 81,3 % CD2 pacientų.

3.1 lentelė. Demografiniai ir klinikiniai diabetu sergančiųjų ir kontrolinės grupės duomenys

Table 3.1. Demographic and clinical data of diabetic patients and control group

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^d vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Demografiniai duomenys ^f										
Lytis ²	Moterys ³	32	48,5	48	60,0	18	60,0	0,164	0,295	1,000
	Vyrai ⁴	34	51,5	32	40,0	12	40,0			
Rūkymas ⁵	Ne ⁶	45	68,2	66	82,5	26	86,7	0,044	0,056	0,599
	Rūko/rūkė ⁷	21	31,8	14	17,5	4	13,3			
Amžius ⁸ , metais ⁹ , vidurkis ¹⁰ (SD)		40,8 (15,2)		59,8 (11,5)		35,9 (12,2)		0,000	0,204	0,000
KMI ¹¹ , kg/m ² , vidurkis ¹⁰ (SD)		23,7 (3,5)		35,1 (6,2)		25,8 (4,3)		0,000	0,025	0,000
Diabetas ir komplikacijos ^g										
Diabeto stažas ¹² , vidurkis ¹⁰ (SD)		13,7 (13,3)		11,9 (8,0)				0,956		
Šeiminė diabeto anamnezė ¹³	Ne ⁶	35	53,0	32	40,0	22	73,3	0,116	0,060	0,002
	Taip ¹⁴	31	47,0	48	60,0	8	26,7			

3.1 lentelė. Tęsinys
Table 3.1. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^d vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Retinopatija ¹⁵	Ne ⁶	40	60,6	53	66,3			0,480		
	Taip ¹⁴	26	39,4	27	33,8					
Nefropatija ¹⁶	Ne ⁶	51	77,3	70	87,5			0,103		
	Taip ¹⁴	15	22,7	10	12,5					
Polineuropatija ¹⁷	Ne ⁶	49	74,2	54	67,5			0,374		
	Taip ¹⁴	17	25,8	26	32,5					
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ¹⁸	Ne	45	68,2	31	38,8			0,001		
	Tikėtina ¹⁹	13	19,7	38	47,5					
	Taip ¹⁴	7	10,6	6	7,5					
	ND	1	1,5	5	6,3					
Lydinčios ligos ^h										
Išeminė širdies liga ²⁰	Ne ⁶	62	93,9	61	76,3	30	100,0	0,003	0,168	0,003
	Taip ¹⁴	4	6,1	19	23,8	0				
Pirminė arterinė hipertenzija ²¹	Ne ⁶	42	63,6	6	7,5	28	93,3	0,000	0,002	0,000
	Taip ¹⁴	24	36,4	74	92,5	2	6,7			
Dislipidemija ²²	Ne ⁶	37	56,1	15	18,8	28	93,3	0,000	0,000	0,000
	Taip ¹⁴	29	43,9	65	81,3	2	6,7			

3.1 lentelė. Tęsinys
Table 3.1. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e				CD1 ^d vs	CD1 ^d vs	CD2 ^d vs
		N	%	N	%			CD2 ^e	Kontrolė ^b	Kontrolė ^b
Skyd liaukės ligos (išskyrus vėžį) ²³	Ne ⁶	50	75,8	51	63,7	25	83,3	0,118	0,405	0,048
	Taip ¹⁴	16	24,2	29	36,3	5	16,7			
Vartojami medikamentai ^j										
Insulinas ²⁴	Ne ⁶	11	16,7	30	37,5			0,005		
	Taip ¹⁴	55	83,3	50	62,5					
Metforminas ²⁵	Ne ⁶	61	92,4	22	27,5			0,000		
	Taip ¹⁴	5	7,6	58	72,5					
Kiti antidiabetiniai Preparatai ²⁶	Ne ⁶	61	92,4	34	42,5			0,000		
	Taip ¹⁴	5	7,6	46	57,5					
Statinai ²⁷	Ne ⁶	50	75,8	36	45,0	28	93,3	0,000	0,041	0,000
	Taip ¹⁴	16	24,2	44	55,0	2	6,7			

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; KMI – kūno masės indeksas; SD – standartinis nuokrypis.

¹Variable; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Age; ⁹Years; ¹⁰Mean; ¹¹BMI – body mass index; ¹²Diabetes duration;

¹³Family history of diabetes; ¹⁴Yes; ¹⁵Retinopathy; ¹⁶Nephropathy; ¹⁷Polyneuropathy; ¹⁸Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁹Probable; ²⁰Ischemic heart disease;

²¹Primary arterial hypertension; ²²Dyslipidemia; ²³Thyroid diseases (except cancers); ²⁴Insulin; ²⁵Metformin; ²⁶Other antidiabetic drugs; ²⁷Statins;

^aDiabetes; ^bControl; ^cp value; ^dT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^eT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^fDemographic data; ^gDiabetes and complications;

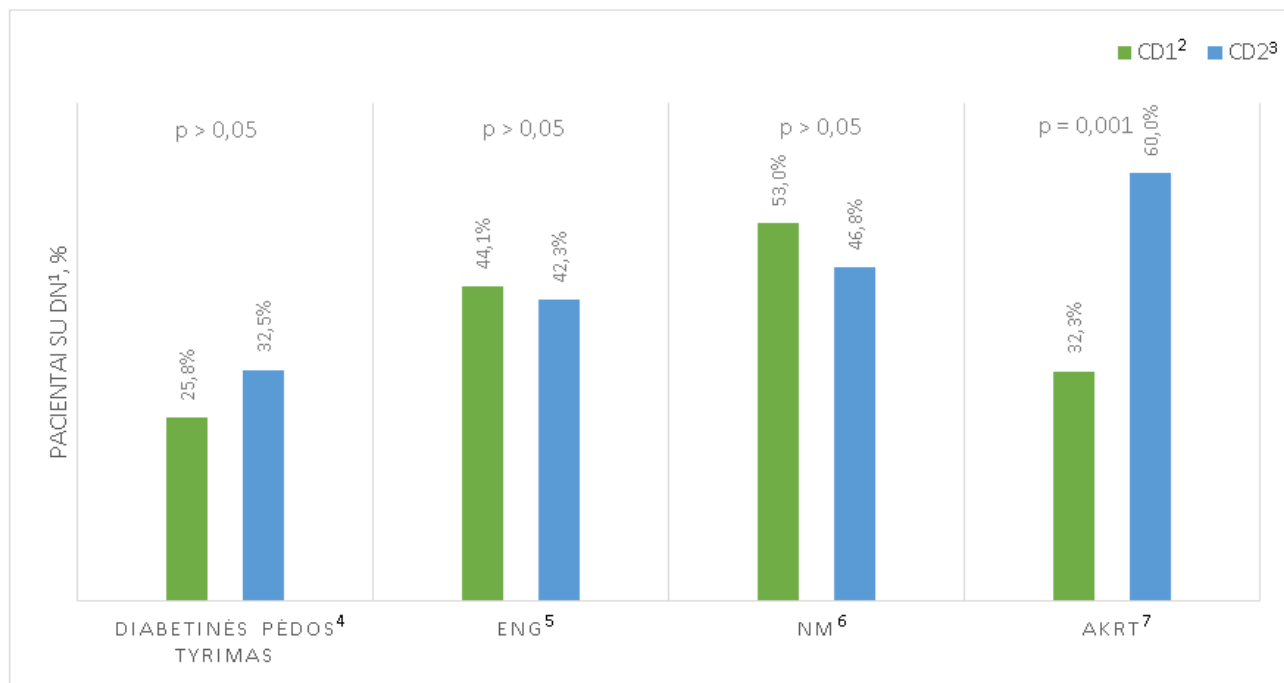
^hComorbidities; ^jTreatment.

Instrumentiniai neuropatijos, citogenetiniai ir epigenetiniai tyrimai buvo atlikti ne visiems pacientams dėl ribotų personalo išteklių (ENG atliko vienas neurologas), pacientų lydinčių ligų (pvz., AKRT neatliekamas pacientams su širdies stimuliatoriumi, ženkli krūtinės ląstos deformacija), atsitiktinių kraujotakos mėginių praradimo, nesant galimybės suderinti mėginių paėmimo ir tyrimų atlikimo laiko, neaugant ląstelėms ar nepavykus atlikti tyrimą.

Dėl DN ištirti visi sergantieji CD – 66 CD1 ir 80 CD2 pacientai.

DSPN dažnis tarp CD1 ir CD2 pacientų nesiskyrė, tačiau DSPN dažnis skyrėsi priklausomai nuo naudoto diagnostikos metodo ir buvo didžiausias tiriant NM (CD1 – 53,0 %, CD2 – 46,8 %) ir mažiausias atliekant klinikinį neuropatijos ištyrimą (CD1 – 25,8, CD2 – 32,5) (3.1 pav.).

Klinikinio ištyrimo metu, tiriant pacientus kamertonu, tip-term lazdele, hipodermine adata ir išgaunant Achilo sausgyslės refleksus, vibracijos jutimas tiriant kamertonu buvo vienintelis tyrimas, kuris tarp CD1 ir CD2 pacientų skyrėsi – CD2 pacientams vibracijos jutimo sutrikimas buvo nustatytas reikšmingai dažniau (71,3 % vs 48,5 %, $p = 0,05$). Atliekant ENG CD1 pacientams dažniau nei CD2 pacientams stebėtas *n. peroneus* amplitudės sumažėjimas (41,2 % vs 19,2 %, $p = 0,027$), latencijos prailgėjimas (23,5 % vs 5,8 %, $p = 0,016$) ir laidumo greičio sumažėjimas (32,4 % vs 11,5 %, $p = 0,018$). NM parametrai tarp CD1 su CD2 pacientų nesiskyrė ($p > 0,05$) (3.2 lentelė).



3.1 pav. Diabetinės neuropatijos dažnio skirtumai tarp pacientų, sergančių pirmojo (CD1) ir antrojo tipo (CD2) cukriniu diabetu, palyginus skirtingas ištyrimo metodikas.

Figure 3.1. Differences in the frequency of diabetic neuropathy between patients with type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes, comparing different diagnostic methods.

AKRT – autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimas; CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DN – diabetinė neuropatija; ENG – elektroneurografija; NM – neurometrija.

¹Patients with diabetic neuropathy; ²T1DM – type 1 diabetes mellitus; ³T2DM – type 2 diabetes mellitus; ⁴Diabetic foot examination; ⁵ENG – electroneurography; ⁶NM – neurometry; ⁷CARTs –cardiovascular autonomic reflex tests.

3.2 lentelė. Pirmojo tipo (CD1) ir antrojo tipo (CD2) cukriniu diabetu sergantys pacientai, kuriems nustatyti pataloginiai tyrimų rezultatai

Table 3.2. Proportion of patients with type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes who have been found to have pathological test results

	CD1 ^a (N = 66)	CD2 ^b (N = 80)	p reikšmė ^c
NNS¹, N = 146 (%) *	66 (100)	80 (100)	
Vibracijos jautimas ² , n (%)	32 (48,5)	57 (71,3)	0,005
Temperatūros jautimas ³ , n (%)	18 (27,3)	25 (31,3)	0,600
Skausmo jautimas ⁴ , n (%)	12 (18,2)	13 (16,3)	0,758
Achilo refleksas ⁵ , n (%)	11 (16,7)	13 (17,1)	0,945
NM⁶, N = 145 (%) *	66 (100)	79 (98,8)	
Stambios mielinizuotos skaidulos ⁷ , n (%)	23 (34,8)	21 (26,6)	0,365
Smulkios mielinizuotos skaidulos ⁸ , n (%)	29 (43,9)	28 (35,4)	0,311
Smulkios nemielinizuotos skaidulos ⁹ , n (%)	24 (36,4)	20 (25,3)	0,202
ENG¹⁰, N = 86 (%) *	34 (51,5)	52 (65,0)	
<i>N. peroneus</i> amplitudė ¹¹	14 (41,2)	10 (19,2)	0,027
<i>N. peroneus</i> distalinė latencija ¹²	8 (23,5)	3 (5,8)	0,016

3.2 lentelė. Tęsinys

Table 3.2. Continued

	CD1 ^a (N = 66)	CD2 ^b (N = 80)	p reikšmė ^c
<i>N. peroneus</i> laidumo greitis ¹³	11 (32,4)	6 (11,5)	0,018
<i>N. tibialis</i> amplitudė ¹⁴	5 (14,7)	9 (17,3)	0,749
<i>N. tibialis</i> latencija ¹⁵	3 (8,8)	4 (7,7)	0,851
<i>N. tibialis</i> laidumo greitis ¹⁶	6 (17,6)	7 (13,5)	0,596
<i>N. suralis</i> amplitudė ¹⁷	15 (44,1)	20 (38,5)	0,602
<i>N. suralis</i> laidumo greitis ¹⁸	13 (38,2)	18 (34,6)	0,732
AKRTs¹⁹, N = 137 (%) *	N = 63 (95,5)	N = 74 (92,5)	
ŠSD atsakas į gilų kvėpavimą ²⁰	12 (19,4)	35 (46,7)	0,001
ŠSD atsakas į Valsavos mėginį ²¹	5 (8,1)	10 (13,3)	0,326
ŠSD atsakas į stovėjimą ²²	20 (32,3)	32 (42,7)	0,211
AKS atsakas į stovėjimą ²³	13 (21,0)	15 (20,0)	0,889

* Ištirtų pacientų dalis

AKRT – autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimas; AKS – arterinis kraujo spaudimas; N – nervus; ENG – elektroneurografija; NM – neurometrija; NNS – neuropatijos negalios skalė; ŠSD – širdies susitraukimų dažnis.

¹NDS – neuropathy disability score; ²Vibration perception; ³Temperature perception; ⁴Pain perception; ⁵Ankle reflex; ⁶Neurometry; ⁷ Large myelinated fibers;

⁸Small myelinated fibers; ⁹Small unmyelinated fibers; ¹⁰ENG – electroneurography; ¹¹Amplitude of peroneal nerve; ¹²Distal latency of peroneal nerve;

¹³Conduction velocity of peroneal nerve; ¹⁴Amplitude of tibial nerve; ¹⁵Latency of tibial nerve; ¹⁶Conduction velocity of tibial nerve; ¹⁷Amplitude of sural nerve;

¹⁸Conduction velocity of sural nerve; ¹⁹CARTs – cardiovascular autonomic reflex tests; ²⁰Deep breathing test; ²¹Valsalva manoeuvre; ²²Lying to standing test;

²³Orthostatic hypotension test; ^aT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^bT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^cp value.

Skausminė DSPN (SAS 1–10) dažniau buvo nustatyta CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais, atitinkamai 42 (52,5 %) vs 18 (27,3 %), $p = 0,002$, tačiau skausmo stiprumas pacientams su skausmine DSPN tarp CD tipų nesiskyrė ir siekė apie 4,5 balo abiejose grupėse ($p = 0,852$).

Siekiant pasirinkti DSPN ištyrimo metodą tolesnei analizei, paskaičiuotas metodų teigiamų rezultatų persidengimas. Palyginus su kitais dviem metodais, dažniausiai teigiami rezultatai atsikartojo aliekant ENG, rečiau – klinikinio ištyrimo metu ir NM. Ta pati tendencija stebėta ir palyginus metodus CD1 ir CD2 imtyse atskirai (3.3 lentelė). Tačiau ENG atlikta mažiausiai daliai pacientų – 86 (58,9 %), todėl tolesnei statistinei analizei pasirinktas klinikinio ištyrimo metodas, kuris atliktas visiems 146 pacientams (100 %).

3.3 lentelė. Skirtingų distalinės simetrinės polineuropatijos tyrimų teigiamų rezultatų persidengimas bendroje CD grupėje, CD1 ir CD2 grupėse

Table 3.3. Overlap of positive results of different diabetic polyneuropathy testing methods in the overall diabetes group, as well as in the T1DM and T2DM groups

Atliktas tyrimas ¹	Visi CD pacientai ^a (N = 146)	CD1 ^b (N = 66)	CD2 ^c (N = 80)
Diabetinės pėdos tyrimas (N = 146) ²	68 (46,6)	27 (40,9)	41 (51,3)
ENG (N = 86) ³	77 (89,5)	33 (50,0)	44 (55,0)
NM (N = 145) ⁴	62 (42,8)	23 (34,8)	39 (48,8)

¹Test; ²Diabetic foot examination; ³ENG – electroneurography; ⁴NM – neurometry; ^aWhole sample; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus.

KAN dažniau nustatyta CD2 pacientams, palyginus su CD1, atitinkamai – 45 (60,0 %) vs 20 (32,3 %) (3.1 pav.). Visų AKRT mėginių atsakas dažniau buvo sutrikęs CD2 pacientams, o ŠSD atsako į gilų kvėpimą patologinių rezultatų skirtumas tarp CD1 ir CD2 pasiekė statistinį reikšmingumą (19,4 % vs 46,7 %, $p = 0,001$) (3.2 lentelė).

CD1 pacientai su DSPN palyginus su CD1 pacientais, kuriems DSPN nenustatyta buvo vyresni (53,9 m. vs 36,2 m., $p = 0,000$), CD sirgo ilgiau (25,4 m. vs 9,7 m., $p = 0,000$), dažniau turėjo blogą ilgalaikę glikemijos kontrolę (82,4 % vs 51,0 %, $p = 0,024$), žemesnį GFG (82,6 vs 112,2 mL/min/1,73 m², $p = 0,000$), dažniau diagnozuotos lydinčios ligos ir kitos mikrovaskulinės komplikacijos ($p < 0,05$). CD2 pacientai su DSPN, palyginus su CD2 pacientais, kuriems DSPN nenustatyta, ilgiau sirgo CD (14,4 m. vs 10,7 m., $p = 0,016$) (3.4 lentelė).

CD1 pacientai su KAN palyginus su CD1 pacientais, kuriems KAN nenustatyta diabetu sirgo ilgiau (22,0 m. vs 9,0 m., $p = 0,001$), dažniau turėjo blogą ilgalaikę glikemijos kontrolę (90% vs 45,2 %, $p = 0,001$), žemesnį GFG (90,0 vs 111,6 mL/min/1,73 m², $p = 0,022$), dažniau sirgo PAH (60 % vs 16,7 %, $p = 0,001$), diabetine retinopatija (65,0 % vs 21,4%, $p = 0,001$) ir diabetine nefropatija (55,0 % vs 9,5 %, $p = 0,000$). CD2 pacientai su KAN, palyginus su CD2 pacientais, kuriems KAN nenustatyta, buvo vyresni (62,0 m vs 56,1 m., $p = 0,041$), rečiau rūkė (11% vs 30,0%, $p = 0,040$) ir dažniau turėjo diabetinę retinopatiją (44,4 % vs 13,3%, $p = 0,05$) (3.5 lentelė).

3.4 lentelė. Pirmojo (CD1) ir antrojo tipo (CD2) cukriniu diabetu sergančių pacientų klinikiniai rodikliai, esant arba nesant distalinei simetrinei polineuropatijai (DSPN –/+)

	CD1 (N=66)			CD2 (N=80)		
	DSPN (–)	DSPN (+)	p-reikšmė	DSPN (–)	DSPN (+)	p-reikšmė
DSPN, n (%)	49 (74,2)	17 (25,8)		54 (67,5)	26 (32,5)	0,374**
	27/22	7/10		22/32	10/16	
Lytis, vyras/moteris, n (%)	(79,4/68,8)	(20,6/31,3)	0,322**	(68,8/66,7)	(31,3/33,3)	0,845**
Amžius metais, vidurkis ± SD	36,2±12,9	53,9±14,0	0,000*	58,1±11,9	63,3±9,9	0,065*
Diabeto stažas, metais, vidurkis ± SD	9,7±11,1	25,4±12,9	0,000*	10,7±8,6	14,4±6,0	0,016*
Bloga ilgalaikė kontrolė, n (%)	25 (51,0)	14 (82,4)	0,024**	37 (68,5)	20 (76,9)	0,437**
Rūko, n (%)	18 (36,7)	3 (17,6)	0,145**	12 (22,2)	2 (7,7)	0,109**
KMI kg/m ² , vidurkis ± SD	23,5±3,7	24,0±3,3	0,644*	35,2±6,1	34,9±6,5	0,857*
HbA1c, %, vidurkis ± SD	9,0±2,3	10,0±2,4	0,249*	10,1±1,7	10,8±2,9	0,494.*

3.4 lentelė. Tęsinys

	CD1 (N=66)			CD2 (N=80)		
	DSPN (–)	DSPN (+)	p-reikšmė	DSPN (–)	DSPN (+)	p-reikšmė
GFG, ml/min/1,73 m ² , vidurkis ± SD	112,2±21,6	82,6±26,2	0,000*	96,9±16,4	88,9±23,77	0,134*
Dislipidemija, n (%)	13 (26,5)	14 (82,4)	0,000**	42 (77,8)	22 (84,6)	0,474**
PAH, n (%)	9 (18,4)	14 (82,4)	0,000**	45 (83,3)	25 (96,2)	0,104**
Retinopatija, n (%)	11 (22,4)	14 (82,4)	0,000**	16 (29,6)	11 (42,3)	0,261**
Nefropatija, n (%)	6 (12,2)	9 (52,9)	0,001**	6 (11,1)	4 (15,4)	0,588**
KAN, n (%)	11 (22,9)	9 (64,3)	0,004**	27 (54,0)	18 (72,0)	0,134**

Tolydiesiems kintamiesiems nurodomas vidurkis ± standartinis nuokrypis; kategoriniams – pacientų su požymiu skaičius ir procentinė dalis – n, (%).

*Mann Whitney testas; ** Pearson testas.

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DSPN (–) – pacientai be distalinės simetrinės polineuropatijos; DSPN (+) – pacientai su distaline simetrine polineuropatija; GFG – glomerulų filtracijos greitis; HbA1c – glikozilintas hemoglobinas; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija, KMI – kūno masės indeksas; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SD – standartinė deviacija.

3.5 lentelė. Pirmojo (CD1) ir antrojo tipo (CD2) cukriniu diabetu sergančių pacientų klinikiniai rodikliai, esant arba nesant kardiovaskulinei autonominei neuropatijai (KAN –/+).

	CD1 (N=62)			CD2 (N=75)		
	KAN (–)	KAN (+)	p-reikšmė	KAN (–)	KAN (+)	p-reikšmė
KAN, n (%)	42 (67,7)	20 (32,3)		30 (40,0)	45 (60,0)	0,001**
Lytis, vyras/moteris n (%)	25/17 (78,1/56,7)	7/13 (21,9/43,3)	0,071**	10/20 (34,5/43,5)	19/26 (65,5/56,5)	0,439**
Amžius, metais, vidurkis ± SD	37,7±13,3	43,8±15,4	0,104*	56,1±12,9	62,0±10,1	0,041*
Diabeto stažas, metais, vidurkis ± SD	9,0±10,6	22,0±14,5	0,001*	10,3±9,4	12,6±6,7	0,114*
Bloga ilgalaikė kontrolė, n (%)	19 (45,2)	18 (90)	0,001**	18 (60,0)	34 (75,6)	0,152**
Rūko (%)	15 (35,7)	5 (25,0)	0,399**	9 (30,0)	5 (11,1)	0,040**
KMI, kg/m ² , vidurkis ± SD	23,4±3,4	23,8±3,9	0,479*	36,2±6,6	34,4±6,0	0,309*
HbA1c, %, vidurkis ± SD	8,0±1,9	11,3±1,3	0,297*	9,5±2,1	9,9±1,9	0,168*

3.5 lentelė. Tęsinys

	CD1 (N=62)			CD2 (N=75)		
	KAN (–)	KAN (+)	p-reikšmė	KAN (–)	KAN (+)	p-reikšmė
GFG ml/min/1,73 m ² , vidurkis ± SD	111,6±17,0	90,0±36,1	0,022 *	94,0±22,3	94,0±18,1	0,764*
Dislipidemija, n (%)	13 (31,0)	11 (55,0)	0,069**	24 (80)	35 (77,8)	0,818**
PAH, n (%)	7 (16,7)	12 (60)	0,001 **	25 (83,3)	40 (88,9)	0,488**
Retinopatija, n (%)	9 (21,4)	13 (65,0)	0,001 **	4 (13,3)	20 (44,4)	0,005 **
Nefropatija, n (%)	4 (9,5)	11 (55,0)	0,000 **	3 (10)	6 (13,3)	0,663**

Tolydiesiems kintamiesiems nurodomas vidurkis ± standartinis nuokrypis; kategoriniams – pacientų su požymiu skaičius ir procentinė dalis – n, (%).

*Mann Whitney testas; ** Pearsono testas.

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; GFG – glomerulų filtracijos greitis; HbA1c – glikozilintas hemoglobinas; KAN (–) – pacientai be kardiovaskulinės autonominės neuropatijos; KAN (+) – pacientai su kardiovaskuline autonomine neuropatija; KMI – kūno masės indeksas; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SD – standartinė deviacija.

3.2. Genetinių ir epigenetinių žymenų tyrimas

3.2.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino kiekio diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų DNR kraujo plazmoje tyrimų rezultatai

8-OHdG koncentracija tirta 97 tiriamiesiems: 58 CD1, 14 CD2 ir 25 kontroliniams asmenims. Klinikiniai ir demografiniai tiriamųjų duomenys pateikti 3.6 lentelėje. Lyčių pasiskirstymas tarp tiriamųjų grupių reikšmingai nesiskyrė ($p < 0,05$). CD2 pacientai, palyginus su CD1 ir kontroline grupe, buvo reikšmingai vyresni (atitinkamai 59,4 m. vs 40,3 m. ir 35,9 m., abiejų palyginimų $p = 0,000$) dažniau turėjo giminių, sergančių CD (66,7 % vs 49,7 % ir 26,7 %, abiejų palyginimų $p = 0,045$), taip pat dažniau sirgo lydinčiomis ligomis, tokiomis kaip nutukimas (KMI 34,6 kg/m² vs 23,7 ir 25,8 kg/m², $p = 0,000$), PAH (91,7 % vs 35,4 % ir 6,7%, $p = 0,000$), IŠL (27,1 % vs 4,6 % ir 0,0 %, $p = 0,001$) ir dislipidemija (77,1% vs 43,1 % ir 6,7%, $p = 0,000$), dažniau vartojo statinus (54,2 % vs 23,1 % ir 6,7 %, $p = 0,001$). CD1 pacientai, palyginus su kontroline grupe, buvo mažesnio svorio (KMI 23,7 kg/m² vs 25,8 kg/m², $p = 0,028$), dažniau sirgo PAH (35,4 % vs 6,7 %, $p = 0,003$), dislipidemija (43,1 % vs 6,7 %, $p = 0,000$) ir buvo gydomi statinais (23,1 % vs 6,7 %, p paribinis = 0,052). CD1 ir CD2 pacientai nesiskyrė CD trukme, mikrovaskulinių komplikacijų ir skydliaukės susirgimų dažniu ($p > 0,05$). Didžioji dalis CD1 pacientų buvo gydomi insulinu (83,1 %), daugiau kaip 2/3 CD2 pacientų – insulinu (64,6 %) ir/arba metforminu (77,1 %). Rūkymo įpročiai tarp tiriamųjų grupių nesiskyrė.

8-OHdG koncentracijos pasiskirstymas tiriamųjų grupėse pagal demografinius ir klinikinius rodiklius pavaizduotas 3.7 lentelėje. Palyginus CD1, CD2 pacientus ir kontrolinę grupę 8-OHdG koncentracija reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). Kontrolinės grupės vyrų kraujyje nustatyta aukštesnė 8-OHdG koncentracija, palyginus su moterimis (13,13 ng/ml vs 11,27 ng/ml, $p = 0,031$), o CD grupėse skirtumo tarp lyčių nenustatyta ($p > 0,05$). Reikšmingai didesnė 8-OHdG koncentracija nustatyta CD1 pacientams, sergantiems lėtine inkstų liga (16,35 ng/ml vs 11,14 ng/ml, $p = 0,014$) ir PAH (14,17 ng/ml vs 10,78 ng/ml, $p = 0,024$) nei tiems pacientams, kuriems šios ligos nenustatytos. Poliligotiems CD1 ir CD2 pacientams, palygūnus su nepoliligotais pacientais, taip pat nustatyta didesnė 8-OHdG koncentracija, tačiau tik CD1 pacientams skirtumas buvo statistiškai reikšmingas (14,05 ng/ml vs 10,72 ng/ml, $p = 0,028$). 8OHdG koncentracijos sąsajų su kitais klinikiniais ir demografiniais rodikliais nenustatyta

3.6 lentelė. Cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės, kuriems ištirta 8-OHdG koncentracija, demografiniai ir klinikiniai rodikliai

Table 3.6. Demographic and clinical data of patients with diabetes and the control group, tested for 8-OHdG concentration

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c			
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 vs CD 2	CD1 vs Kontrolė	CD2 vs Kontrolė	
		N	%	N	%						
Demografiniai rodikliai ^f											
Lytis ²	Moterys ³	32	49,2	27	56,3	18	60,0	0,460	0,328	0,460	
	Vyrai ⁴	33	50,8	21	43,8	12	40,0				
Rūkymas ⁵	Nerūko ⁶	44	67,7	38	79,2	26	86,7	0,177	0,051	0,177	
	Rūkė/rūko ⁷	21	32,3	10	20,8	4	13,3				
Amžius ⁸ , metai ⁹ vidurkis ¹⁰ (SD)		40,3 (14,9)		59,4 (12,4)		35,9 (12,2)		0,000	0,244	0,000	
KMI ¹¹ , kg/m ² , (SD)		23,7 (3,5)		34,6 (5,6)		25,8 (4,3)		0,000	0,028	0,000	
Diabetas ir komplikacijos ^g											
Diabeto stažas ¹² , metai ⁹ (SD)		13,5 (13,3)		12,0 (8,5)				0,818			
Šeiminė diabeto anamnezė ¹³	Ne ⁶	34	52,3	16	33,3	22	73,3	0,045	0,053	0,045	
	Taip ¹⁴	31	49,7	32	66,7	8	26,7				
Nefropatija ¹⁵	Ne ⁶	51	78,5	40	83,3			0,518			
	Taip ¹⁴	14	21,5	8	16,7						
Retinopatija ¹⁶	Ne ⁶	40	61,5	32	66,7			0,575			
	Taip ¹⁴	25	38,5	16	33,3						
Polineuropatija ¹⁷	Ne ⁶	49	75,4	34	70,8			0,588			
	Taip ¹⁴	16	24,6	14	29,2						
Diabetas ir komplikacijos ^g											
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ¹⁸	Ne ⁶	44	68,8	23	48,9			0,010			
	Tikėtina/Taip ^{19/14}	13	20,3	22	46,8						
	ND	7	10,9	2	4,3						

3.6 lentelė. Tęsinys
Table 3.6. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 vs CD 2	CD1 vs Kontrolė	CD2 vs Kontrolė
		N	%	N	%					
Lydinčios ligos ^h										
Išeminė širdies liga ²⁰	Ne	62	95,4	35	72,9	30	100,0	0,001	0,232	0,001
	Taip	3	4,6	13	27,1	0	0,0			
Arterinė hipertenzija ²¹	Ne	42	64,6	4	8,3	28	93,3	0,000	0,003	0,000
	Taip	23	35,4	44	91,7	2	6,7			
Dislipidemija ²²	Ne	37	56,9	11	22,9	28	93,3	0,000	0,000	0,000
	Taip	28	43,1	37	77,1	2	6,7			
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ²³	Ne	49	75,4	32	66,7	25	83,3	0,309	0,385	0,309
	Taip	16	24,6	16	33,3	5	16,7			
Vartojami medikamentai ⁱ										
Insulinas ²⁴	Ne	11	16,9	17	35,4			0,024		
	Taip	54	83,1	31	64,6					
Metforminas ²⁵	Ne	60	92,3	11	22,9			0,000		
	Taip	5	7,7	37	77,1					
Kiti antidiabetiniai preparatai ²⁶	Ne	60	92,3	27	56,3			0,000		
	Taip	5	7,7	21	43,8					
Statina ²⁷	Ne	50	76,9	22	45,8	28	93,3	0,001	0,052	0,001
	Taip	15	23,1	26	54,2	2	6,7			

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; KMI – kūno masės indeksas, SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Age; ⁹Years; ¹⁰Mean; ¹¹BMI – body mass index; ¹²Diabetes duration;

¹³Family history of diabetes; ¹⁴Yes; ¹⁵Nephropathy; ¹⁶Retinopathy; ¹⁷Polyneuropathy; ¹⁸Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁹Probable; ²⁰Ischemic heart disease;

²¹Primary arterial hypertension; ²²Dyslipidemia; ²³Thyroid diseases (except cancers); ²⁴Insulin; ²⁵Metformin; ²⁶Other antidiabetic drugs; ²⁷Statins;

^aDiabetes; ^bControl; ^cp value; ^dT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^eT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^fDemographic data; ^gDiabetes and complications;

^hComorbidities; ⁱTreatment.

3.7 lentelė. 8-OHdG koncentracija (ng/ml) tiriamosiose grupėse pagal demografinius ir klinikinius rodiklius

Table 3.7. 8-OHdG concentration (ng/ml) in the study groups based on demographic and clinical indicators

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
Visi tiriamieji ²		11,94 (4,51)	12,28 (3,89) 0,550▲	11,86 (2,49) 0,503▶ 0,740▲
Lytis ³	Moterys ⁴	12,71 (4,98)	12,58 (4,90) 0,635▲	11,27 (2,28) 0,452▶
	Vyrai ⁵	11,12 (3,86)	11,89 (2,32) 0,741▲	0,175▲ 13,13 (2,58) 0,083▶ 0,180▲
p reikšmė ⁶	Mot. ⁴ vs Vyr ⁵	0,350*	0,491*	0,031*
Rūkymas ⁷	Ne ⁸	12,63 (4,74)	11,64 (3,16) 0,882▲	11,61 (2,53) 0,863▶ 0,775*
	Taip ⁹	10,53 (3,72)	20,73 0,100▲	13,73 (1,10) 0,030▶ 0,500▲
p reikšmė ⁶	Nerūko ⁸ vs Rūko ⁹	0,243*	0,143*	0,151*
Šeiminė CD anamnezė ¹⁰	Ne ⁸	11,27 (3,60)	12,24 (4,26) 0,414▲	11,94 (2,33) 0,425▶ 0,724▲
	Taip ⁹	12,66 (5,28)	12,39 (3,30) 0,934▲	11,67 (3,04) 0,984▶ 0,788▲
p reikšmė ⁶	Anamn. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,484*	0,945*	0,883*
Nefropatija ¹¹	Ne ⁸	11,26 (3,64)	12,35 (4,04) 0,289▲	N.A.
	Taip ⁹	14,56 (6,45)	11,3 0,769▲	
p reikšmė ⁶	Nefrop. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,155*	0,857*	
Lėtinė inkstų liga ¹²	Ne ⁸	11,14 (3,59)	12,35 (4,04) 0,236▲	***
	Taip ⁹	16,35 (6,43)	11,40 0,600▲	
p reikšmė ⁶		0,014*	0,857*	
DSPN ¹³	Ne ⁸	11,47 (3,50)	12,21 (4,04) 0,594▲	N.A.
	Taip ⁹	13,45 (6,73)	13,2 0,933▲	
p reikšmė ⁶	DSPN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,785*	0,857*	

3.7 lentelė. Tęsinys
Table 3.7. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
KAN ¹⁴	Ne ⁸	11,12 (2,92)	13,18 (1,40) 0,065▲	N.A.
	Galimai ¹⁵ /Taip ⁹	13,81 (6,38)	11,21 (4,76) 0,481▲	
		7,73	16,39	
	ND (2)			
p reikšmė ⁶	CAN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,379*	0,065*	
Retinopatija ¹⁶	Ne ⁸	11,36 (3,47)	11,79 (3,97) 0,877▲	N.A.
	Taip ⁹	12,90 (5,80)	15,24 (1,63) 0,406▲	
			0,132*	
p reikšmė ⁶	Retin. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,522*		
Skyd liaukės ligos (išsk. Vėžį) ¹⁷	Ne ⁸	12,09 (4,00)	13,39 (3,47) 0,420▲	11,75 (2,37) 0,948▶
	Taip ⁹	11,49 (6,06)	10,30 (4,17) 0,893▲	12,32 (3,19) 0,390◀
				0,219▶
				0,841◀
p reikšmė ⁶	Skydl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,223*	0,364*	1,000
IŠL ¹⁸	Ne ⁸	11,88 (4,29)	10,98 (3,27) 0,757▲	—***
	Taip ⁹	13,04 (8,92)	14,63 (4,11) 0,571▲	
			0,147*	
p reikšmė ⁶	IŠL Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,666*		
PAH ¹⁹	Ne ⁸	10,78 (3,10)	13,68 0,103▲	11,67 (2,33) 0,155▶
				0,083◀
	Taip ⁹	14,17 (5,86)	12,95 (3,12) 0,676▲	14,07 (4,33) 0,952▶
				0,800◀
p reikšmė ⁶	PAH Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,024*	0,143*	0,480
Dislipidemija ²⁰	Ne ⁸	11,34 (3,10)	12,63 (7,11) 0,524▲	11,67 (2,33) 0,560▶
				0,669◀
	Taip ⁹	12,74 (5,86)	12,15 (2,21) 0,815▲	14,07 (4,33) 0,689▶
				0,606◀
p reikšmė ⁶	Disl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,643*	0,733*	0,480

3.7 lentelė. Tęsinys
Table 3.7. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
Poliligtumo indeksas ²¹	<3	10,72 (3,13)	7,54 (5,46) 0,344▲	11,86 (2,50) 0,118►
	≥3	14,05 (5,78)	13,08 (3,22) 0,811▲	***
p reikšmė ⁶		0,028*	0,198*	
Insulino terapija ²²	Ne ⁸	10,50 (2,93)	13,23 (4,39) 0,320▲	N.A.
	Taip ⁹	12,28 (4,76)	11,76 (3,75) 0,858▲	
p reikšmė ⁶		0,433*	1,000*	
Metforminas ²³	Ne ⁸	11,90 (4,61)	13,12 (2,27) 0,461▲	N.A.
	Taip ⁹	12,41 (3,67)	12,15 (4,15) 1,000▲	
p reikšmė ⁶		0,687*	0,549*	
Kiti antidiabetiniai preparatai ²⁴	Ne ⁸	11,83 (4,63)	12,3 (4,59) 0,579▲	N.A.
	Taip ⁹	13,18 (3,00)	12,2 (1,49) 1,000▲	
p reikšmė ⁶		0,290*	1,000*	
Statina ²⁵	Ne ⁸	11,54 (3,38)	12,40 (5,33) 0,658▲	11,67 (2,33) 0,575►
	Taip ⁹	13,21 (7,00)	12,17 (2,08) 0,856▲	14,07 (4,33) 0,700►
p reikšmė ⁶		0,827*	1,000*	0,667▲
				0,480

▲ – p vertė, palyginus CD1 su CD2 pacientais; ► – p vertė, palyginus CD1 su kontroline grupe; ◀ – p vertė, palyginus CD2 su kontroline grupe; * – p vertė, palyginus demografinius ir klinikinius rodiklius (yra / nėra) atskirai CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėse

*** – kontroliniams asmenims nebuvo diagnozuota.

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; N.A. – netaikoma.

¹Variables; ²Whole group; ³Gender; ⁴Female; ⁵Male; ⁶p value; ⁷Smoking; ⁸No; ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes; ¹¹Nephropathy; ¹²Chronic kidney disease; ¹³Distal symmetric polyneuropathy; ¹⁴Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁵Probable; ¹⁶Retinopathy; ¹⁷Thyroid diseases (except cancers); ¹⁸Ischemic heart disease; ¹⁹Primary arterial hypertension; ²⁰Dyslipidemia; ²¹Multimorbidity index; ²²Insulin; ²³Metformin; ²⁴Other antidiabetic drugs; ²⁵Statins;

^aDiabetes; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^dControl.

3.8 lentelė. Seserinių chromatidžių mainų (SCM) testu tirtų cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės demografiniai ir klinikiniai rodikliai

Table 3.8. Demographic and clinical data of patients with diabetes and the control group examined with the sister chromatid exchange (SCE) test.

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c			
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD 2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b	
		N	%	N	%						
Demografiniai rodikliai ^f											
Lytis ²	Moterys ³	20	41,7	25	55,6	18	60,0	0,180	0,115	0,703	
	Vyrai ⁴	28	58,3	20	44,4	12	40,0				
Rūkymas ⁵	Nerūko ⁶	31	64,6	35	77,8	26	86,7	0,161	0,032	0,333	
	Rūkė/rūko ⁷	17	35,4	10	22,2	4	13,3				
Amžius ⁸ , metai ⁹ vidurkis ¹⁰ (SD)		39,0 (14,5)		59,4 (12,8)		35,9 (12,2)		0,000	0,527	0,000	
KMI ¹¹ , kg/m ² , (SD)		23,5 (3,8)		34,4 (5,6)		25,8 (4,3)		0,000	0,029	0,000	
Diabetas ir komplikacijos ^g											
Diabeto stažas ¹² , metai ⁹ (SD)		14,1 (13,3)		11,8 (8,6)				0,811			
Šeiminė diabeto anamnezė ¹³	Ne ⁶	26	54,2	14	31,1	22	73,3	0,025	0,091	0,000	
	Taip ¹⁴	22	45,8	31	68,9	8	26,7				
Nefropatija ¹⁵	Ne ⁶	38	79,2	37	82,2			0,796			
	Taip ¹⁴	10	20,8	8	17,8						
Retinopatija ¹⁶	Ne ⁶	27	56,3	29	64,4			0,420			
	Taip ¹⁴	21	43,8	16	35,6						
Polineuropatija ¹⁷	Ne ⁶	34	70,8	31	68,9			0,838			
	Taip ¹⁴	14	29,2	14	31,1						
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ¹⁸	Ne ⁶	34	70,8	22	48,9			0,062			
	Tikėtina ¹⁹	9	18,8	20	44,4						
	Taip ¹⁴	4	8,3	2	4,4						
	ND	1	2,1	1	2,2						

3.8 lentelė. Tęsinys
Table 3.8. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD 2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Lydinčios ligos ^b										
Išeminė širdies liga ²⁰	Ne	45	93,8	32	71,1	30	100,0	0,004	0,163	0,001
	Taip	3	6,3	13	28,9	0	0,0			
Arterinė hipertenzija ²¹	Ne	31	64,6	4	8,9	28	93,3	0,000	0,004	0,000
	Taip	17	35,4	41	91,1	2	6,7			
Dislipidemija ²²	Ne	25	52,1	10	22,2	28	93,3	0,003	0,000	0,000
	Taip	23	47,9	35	77,8	2	6,7			
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ²³	Ne	36	75,0	30	66,7	25	83,3	0,376	0,386	0,110
	Taip	12	25,0	15	33,3	5	16,7			
Vartojami medikamentai ⁱ										
Insulinas ²⁴	Ne	10	20,8	17	37,8	0,072				
	Taip	38	79,2	28	62,2					
Metforminas ²⁵	Ne	45	93,8	10	22,2	0,000				
	Taip	3	6,3	35	77,8					
Kiti antidiabetiniai preparatai ²⁶	Ne	44	91,7	24	53,3	0,000				
	Taip	4	8,3	21	46,7					
Statina ²⁷	Ne	35	72,9	22	48,9	28	93,3	0,017	0,026	0,000
	Taip	13	27,1	23	51,1	2	6,7			

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; KMI – kūno masės indeksas, SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Age; ⁹Years; ¹⁰Mean; ¹¹BMI – body mass index; ¹²Diabetes duration;

¹³Family history of diabetes; ¹⁴Yes; ¹⁵Nephropathy; ¹⁶Retinopathy; ¹⁷Polyneuropathy; ¹⁸Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁹Probable; ²⁰Ischemic heart disease;

²¹Primary arterial hypertension; ²²Dyslipidemia; ²³Thyroid diseases (except cancers); ²⁴Insulin; ²⁵Metformin; ²⁶Other antidiabetic drugs; ²⁷Statins;

^aDiabetes; ^bControl; ^cp value; ^dT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^eT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^fDemographic data; ^gDiabetes and complications;

^hComorbidities; ⁱTreatment.

3.2.2. Sesslerinių chromatidžių mainų dažnis diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose

SCM tyrimas atliktas 123 tiriamiesiems, jų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikti atskiroje lentelėje (3.8 lentelė). Nors SCM tyrimas atliktas didesnam skaičiui tiriamųjų nei 8-OHdG, tiriamųjų charakteristika reikšmingai nesiskyrė, išskyrus reikšmingai didesnę dalį rūkančiųjų CD1 pacientų, palyginus su kontroline grupe (35,4 % vs 13,3 %, $p = 0,032$).

Lentelėje 3.9 pavaizduotas SCM dažnis ir HFC, pasiskirstymas tiriamųjų grupėse pagal demografinius ir kliniskus rodiklius.

SCM/ląst. ir HFC tarp CD1 ir CD2 nesiskyrė, tačiau palyginus su kontrole CD1 ir CD2 nustatyti didesni SCM/ląst. (atitinkamai 7,66 vs 8,82 vs 8,64, $p < 0,05$) ir HFC (atitinkamai 0,04 vs 0,08 vs 0,07, $p < 0,05$) dažniai. Nenustatyta reikšmingo SCM ir HFC skirtumo tarp vyrų ir moterų CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėje ($p < 0,05$). Palyginus CD su kontroline grupe, tiek vyrams, tiek moterims nustatyti aukštesni SCM/ląst. ir HFC rodikliai, tačiau tik CD 1 moterims, palyginus su kontroline grupe, SCM/ląst. (9,07 vs 7,52, $p = 0,005$) ir HFC (0,1 vs 0,04, $p = 0,012$) skirtumas pasiekė statistinį reikšmingumą. Rūkymas, šeiminė CD anamnezė, lydinčios ligos, tokios kaip IŠL, dislipidemija, skydliaukės ligos, reikšmingos įtakos SCM dažniui ir HFC neturėjo ($p > 0,05$), tačiau CD1 ir CD2 pacientams su PAH nustatytas aukštesnis HFC dažnis nei pacientams be PAH (CD1 0,11 vs 0,07, ribinis $p = 0,053$ ir CD2 0,08 vs 0,01, $p = 0,008$). CD1 pacientams su DSPN, palyginus su pacientais be šios komplikacijos, nustatytas reikšmingai aukštesnis SCM/ląst. (9,68 vs 8,47, $p = 0,010$) ir HFC (0,13 vs 0,06, $p = 0,002$), o palyginus pacientus su ir be nefropatijos, retinopatijos reikšmingo SCM/ląst. skirtumo nenustatyta ($p > 0,05$). Palyginus su nevartojusiais vaistų pacientais, reikšmingai mažesnis HFC dažnis nustatytas pacientams, gydytiems metforminu (0,09 vs 0,013, $p = 0,024$) ir kitais geriamaisiais antidiabetiniais preparatais (0,07 vs 0,01, $p = 0,009$), tačiau SCM dažnis tarp gydymo grupių reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). SCM dažnis ir HFC tarp gydytų ir negydytų insulinu CD pacientų taip pat nesiskyrė.

CD pacientų, kontrolinėje grupėje ir visoje tiriamųjų imtyje stebėta teigiama SCM dažnio, HFC ir amžiaus koreliacija, o SCM dažnis ir amžiaus koreliacija visoje tiriamųjų imtyje ($r_s = 0,27$, $p = 0,003$), taip pat HFC ir amžiaus koreliacija kontrolinėje grupėje ($r_s = 0,22$, $p = 0,035$) pasiekė statistinį reikšmingumą (3.2 pav.)

3.9 lentelė. Sėserinių chromatidžių mainų (SCM) ir aukšto sėserinių chromatidžių mainų (HFC) dažnio ląstelių pasiskirstymas pagal demografinius ir klinikinius rodiklius

Table 3.9. Distribution of sister chromatid exchange (SCE) frequency and high-frequency sister chromatid exchange (HFC) cells based on demographic and clinical indicators

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)
Visi tiriamieji ²		8,82 (1,39)	0,08 (0,07)	8,64 (1,53) 0,546▲	0,07 (0,07) 0,392▲	7,66 (1,36) 0,001► 0,012◄	0,04 (0,05) 0,002► 0,045◄
Lytis ³	Moterys ⁴	9,07 (1,59)	0,10 (0,09)	8,55 (1,60) 0,222▲	0,06 (0,06) 0,232▲	7,52 (1,45) 0,005► 0,076◄	0,04 (0,05) 0,012► 0,101◄
	Vyrai ⁵	8,65 (1,24)	0,07 (0,06)	8,76 (1,47) 0,616▲	0,08 (0,07) 0,949▲	7,86 (1,24) 0,102► 0,091◄	0,04 (0,05) 0,108► 0,272◄
	p reikšmė ⁶	0,296*	0,394*	0,472*	0,653*	0,723*	0,632*
	Ne ⁸	8,90 (1,47)	0,09 (0,08)	8,59 (1,45) 0,460▲	0,07 (0,09) 0,274▲	7,61 (1,39) 0,001► 0,017◄	0,03 (0,05) 0,001► 0,011◄
Rūkymas ⁷	Taip ⁹	8,69 (1,26)	0,07 (0,07)	8,82 (1,85) 0,824▲	0,08 (0,09) 0,902▲	7,97 (1,25) 0,462► 0,539◄	0,08 (0,09) 0,635► 1,000◄
	p reikšmė ⁶	0,682*	0,494*	0,638*	0,946*	0,536*	0,038*

3.9 lentelė. Tęsinys
Table 3.9. Continued

Kintamasis ^l		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)
Šeiminė diabeto anamnezė ¹⁰	Ne ⁸	8,90 (1,23)	0,08 (0,06)	8,46 (1,18) 0,266▲	0,05 (0,04) 0,254▲	7,67 (1,54) 0,003▶ 0,141◄	0,05 (0,05) 0,058▶ 0,619◄
	Taip ⁹	8,73 (1,58)	0,09 (0,09)	8,73 (1,68) 0,957▲	0,08 (0,07) 0,806▲	7,64 (0,68) 0,063▶ 0,152◄	0,02 (0,03) 0,004▶ 0,013◄
	p reikšmė ⁶	Anamn. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,438*	0,992*	0,650*	0,457*	1,000*
	Ne ⁸	8,85 (1,44)	0,08 (0,08)	8,73 (1,59) 0,755▲	0,07 (0,06) 0,572▲	N.A.	N.A.
Nefropatija ¹¹	Taip ⁹	8,74 (1,26)	0,08 (0,06)	8,26 (1,21) 0,408▲	0,06 (0,08) 0,408▲		
	p reikšmė ⁶	Nefrop. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,871*	0,950*	0,511*	0,610*	
DSPN ¹²	Ne ⁸	8,47 (1,15)	0,06 (0,06)	8,64 (1,50) 0,768▲	0,07 (0,07) 0,894▲	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	9,68 (1,59)	0,13 (0,08)	8,64 (1,65) 0,125▲	0,08 (0,06) 0,069▲		
	p reikšmė ⁶	DSPN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,010*	0,002*	0,922*	0,359*	

3.9 lentelė. Tęsinys
Table 3.9. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)
KAN ¹³	Ne ⁸	8,72 (1,22)	0,08 (0,06)	8,86 (1,72)	0,07 (0,07)	N.A.	N.A.
				0,867▲	0,853▲		
	Galimai ¹⁴ /Taip ⁹	9,11 (1,84)	0,10 (0,10)	8,45 (1,36)	0,07 (0,07)		
				0,468▲	0,319▲		
p reikšmė ⁶	ND (1 ir 1)	8,52	2,04	8,04			
	CAN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,784*	0,566*	0,474*	0,896*		
Retinopatija ¹⁵	Ne ⁸	8,83 (1,54)	0,09 (0,09)	8,85 (1,63)	0,08 (0,07)	N.A.	N.A.
				0,889▲	0,747▲		
	Taip ⁹	8,81 (1,21)	0,08 (0,05)	8,26 (1,29)	0,06 (0,06)		
				0,165▲	0,294▲		
p reikšmė ⁶	Retin. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,868*	0,754*	0,200*	0,801*		
	Ne ⁸	8,75 (1,35)	0,08 (0,08)	8,62 (1,52)	0,07 (0,07)	7,51 (1,38)	0,03 (0,05)
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ¹⁶				0,562▲	0,255▲	0,001►	0,001►
						0,012◄	0,076◄
	Taip ⁹	9,04 (1,56)	0,09 (0,07)	8,69 (1,60)	0,08 (0,06)	8,43 (1,03)	0,06 (0,04)
				0,683▲	0,792▲	0,506►	0,646►
p reikšmė ⁶						0,672◄	0,672◄
	Skydl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,634*	0,820*	0,866*	0,480*	0,108*	0,136*

3.9 lentelė. Tęsinys
Table 3.9. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)
IŠL ¹⁷	Ne ⁸	8,70 (1,24)	0,07 (0,06)	8,75 (1,64)	0,08 (0,07)	_***	_***
				0,988 [▲]	0,868 [▲]		
	Taip ⁹	10,76(2,34)	0,20 (0,14)	8,37 (1,25)	0,06 (0,06)		
p reikšmė ⁶				0,057 [▲]	0,057 [▲]		
	IŠL Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,082*	0,053*	0,507*	0,613*		
PAH ¹⁸	Ne ⁸	8,52 (1,14)	0,07 (0,06)	8,06 (0,58)	0,01 (0,01)	7,56 (1,31)	0,04 (0,05)
				0,437 [▲]	0,007 [▲]	0,004 [▶]	0,013 [▶]
	Taip ⁹	9,38 (1,67)	0,11 (0,09)	8,70 (1,59)	0,08 (0,07)	0,305 [◀]	0,106 [◀]
p reikšmė ⁶				0,188 [▲]	0,154 [▲]	0,749 [▶]	0,842 [▶]
	PAH Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,104*	0,053*	0,500*	0,008*	0,757 [◀]	0,640 [◀]
						0,193*	0,092*
Dislipidemija ¹⁹	Ne ⁸	8,55 (1,15)	0,07 (0,07)	8,79 (1,53)	0,07 (0,07)	7,56 (1,32)	0,04 (0,05)
				0,733 [▲]	1,000 [▲]	0,005 [▶]	0,015 [▶]
	Taip ⁹	9,12 (1,59)	0,10 (0,08)	8,60 (1,55)	0,07 (0,07)	0,028 [◀]	0,302 [◀]
p reikšmė ⁶				0,221 [▲]	0,166 [▲]	0,960 [▶]	0,807 [▶]
	Disl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,104*	0,184*	0,500*	0,904*	0,721 [◀]	0,468 [◀]
						0,193*	0,092*

3.9 lentelė. Tęsinys
Table 3.9. Continued

Kintamasis ^l		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)		
Insulinoterapija ²⁰	Ne ⁸	8,51 (1,27)	0,08 (0,07)	8,83 (1,56)	0,08 (0,02)	N.A.	N.A.
				0,604▲	1,000▲		
	Taip ⁹	8,91 (1,43)	0,08 (0,08)	8,53 (1,53)	0,06 (0,06)		
				0,330▲	0,285▲		
p reikšmė ⁶	Ins. Taip vs Ne	0,540*	0,812*	0,582*	0,619*		
Metforminas ²¹	Ne ⁸	8,91 (1,40)	0,09 (0,07)	8,94 (1,39)	0,07 (0,05)	N.A.	N.A.
				0,743▲	0,645▲		
	Taip ⁹	7,61 (0,42)	0,013 (0,01)	8,56 (1,58)	0,07 (0,07)		
				0,346▲	0,152▲		
p reikšmė ⁶	Metf. Taip vs Ne	0,047*	0,024*	0,459*	0,968*		
Kiti antidiabetiniai preparatai ²²	Ne ⁸	8,92 (1,41)	0,07 (0,01)	8,74 (1,60)	0,07 (0,07)	N.A.	N.A.
				0,590▲	0,148▲		
	Taip ⁹	7,83 (0,56)	0,01 (0,01)	8,53 (1,48)	0,07 (0,01)		
				0,452▲	0,068▲		
p reikšmė ⁶	Kt. antidiab. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,076*	0,009*	0,707*	0,512*		

3.9 lentelė. Tęsinys

Table 3.9. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a				Kontrolė ^d	
		CD1 ^b		CD2 ^c			
		SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)	SCM/ląst. ^e (SD)	HFC ^f (SD)
	Ne ⁸	8,65 (1,20)	0,07 (0,06)	8,35 (1,29)	0,06 (0,05)	7,56 (1,32)	0,04 (0,05)
				0,507 [▲]	0,399 [▲]	0,001 [►]	0,006 [►]
Statinai ²³	Taip ⁹	9,30 (1,79)	0,11 (0,10)	8,92 (1,71)	0,08 (0,08)	9,10 (1,41)	0,09 (0,01)
				0,603 [▲]	0,361 [▲]	0,933 [►]	0,800 [►]
						1,000 [◄]	0,880 [◄]
p reikšmė ⁶	Statinai Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,341 [*]	0,148 [*]	0,261 [*]	0,242 [*]	0,193 [*]	0,092 [*]

▲ – p vertė, palyginus CD1 su CD2 pacientais;

► – p vertė, palyginus CD1 su kontroline grupe;

◄ – p vertė, palyginus CD2 su kontroline grupe;

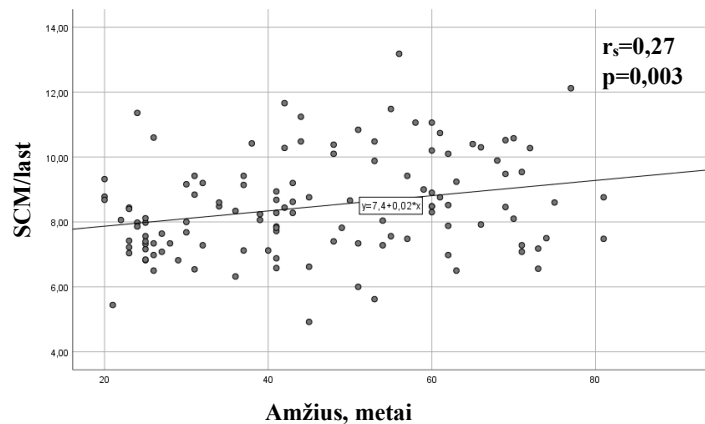
* – p vertė, palyginus demografinius ir klinikinius rodiklius (yra/nėra) atskirai CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėje

*** – kontroliniams asmenims nebuvo diagnozuota.

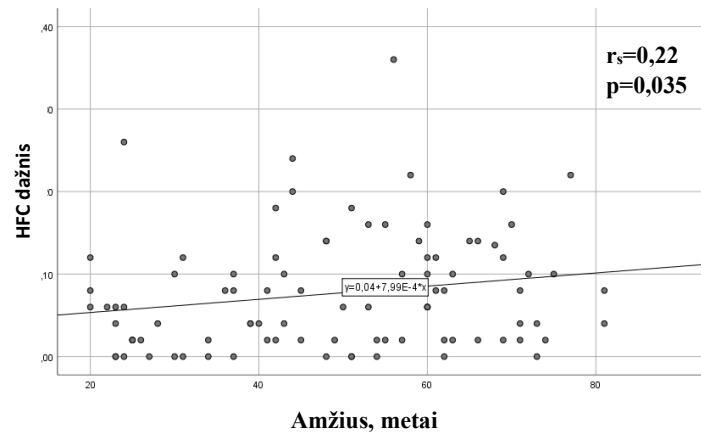
CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; HFC – aukšto seserinių chromatidžių mainų dažnio ląstelės; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SCM/ląst. – seserinių chromatidžių mainų dažnis; N.A. – netaikoma.

¹Variables; ²Whole group; ³Gender; ⁴Female; ⁵Male; ⁶p value; ⁷Smoking; ⁸No; ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes; ¹¹Nephropathy; ¹²Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy; ¹³Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁴Probable; ¹⁵Retinopathy; ¹⁶Thyroid diseases (except cancers); ¹⁷Ischemic heart disease; ¹⁸Primary arterial hypertension; ¹⁹Dyslipidemia; ²⁰Insulin; ²¹Metformin; ²²Other antidiabetic drugs; ²³Statins;

^aDiabetes; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^dControl; ^eSCE/cell – sister chromatid exchange frequency; ^fHFC – high frequency sister chromatid exchange cells.



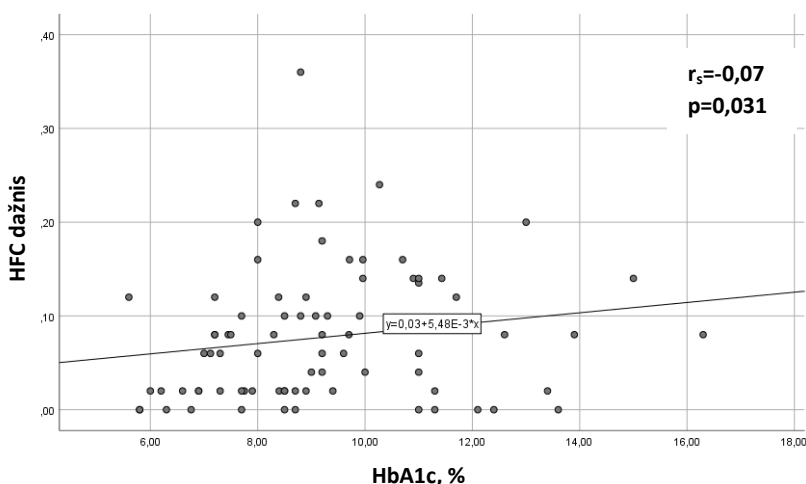
A.



B.

3.2 pav. Sėserinių chromatidžių mainų (SCM) dažnio ir amžiaus koreliacija visoje tiriamųjų imtyje (A), aukšto SCM dažnio ląstelių (HFC) ir amžiaus koreliacija kontrolinėje grupėje (B).

Reikšmingos SCM dažnio, HFC ir KMI koreliacijos CD pacientų, kontrolinėje grupėje ir bendroje imtyje nenustatyta.



3.3 pav. Aukšto seserinių chromatidžių mainų (SCM) dažnio ląstelių (HFC) ir HbA1 koreliacija cukriniu diabetu (CD) sergančių pacientų grupėje.

CD sergančiųjų grupėje nenustatyta reikšminga CD stažo ir SCM dažnio ar HFC koreliacija, tačiau stebėta reikšminga neigiama HbA1c ir HFC koreliacija ($r_s = -0,07$, $p = 0,031$) (3.3 pav.).

3.2.3. Mikrobranduolių dažnis diabetu sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose

Kadangi MB tyrimas atliktas tik daliai tirtųjų asmenų (111 tiriamųjų), jų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikti atskiroje 3.10 lentelėje. Lyčių pasiskirstymas tarp tiriamų grupių reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). CD2 pacientai, palyginus su CD1 ir kontroline grupe, buvo statistškai reikšmingai vyresni (atitinkamai 60 m. vs 37,9 m. ir 35,9 m., $p < 0,001$), dažniau turėjo giminių, sergančių CD (70,7 % vs 45,0 % ir 26,7 %, $p < 0,05$), taip pat dažniau sirgo lydinčiomis ligomis, tokiomis kaip nutukimas (KMI 34,0 kg/m² vs 23,0 kg/m² ir 25,8 kg/m², $p < 0,001$), PAH (90,2 % vs 35,0 % ir 6,7 %, $p < 0,001$), IŠL (31,7 % vs 7,5 % ir 0 %, atitinkamai $p = 0,006$ ir $p = 0,001$) ir dislipidemija (78 % vs 45 % ir 6,7 %, $p = 0,002$ ir $p < 0,001$), dažniau vartojo statinus (53,7 % vs 25 % ir 6,7 %, $p = 0,008$ ir $p = 0,001$). CD1 pacientai, palyginus su kontroline grupe, dažniau buvo rūkantys (37,5 % vs 13,3 %, $p = 0,024$), mažesnio svorio (KMI 23,0 kg/m² vs 25,8 kg/m², $p < 0,010$), dažniau sirgo AH (35 % vs 6,7 %, $p = 0,005$), dislipemija (45 % vs 6,7 %, $p = 0,000$) ir buvo gydomi statiniais (25 % vs 6,7 %, $p = 0,004$). CD1 ir CD2 pacientai nesiskyrė rūkymo įpročiais, CD trukme, mikrovaskulinių komplikacijų ir skydliaukės susirgimų dažniu ($p > 0,05$). Didžioji dalis CD1

pacientų (77,5 %) ir CD2 (63,4 %) pacientų buvo gydomi insulinu, 80 % CD2 pacientų buvo skirtas metforminas. Lentelėje 3.11 pavaizduotas MB dažnio pasiskirstymas tiriamųjų grupėse pagal demografinius ir klinikinius rodiklius.

CD1 ir CD2 pacientams nustatytas aukštesnis MB ‰ lygis nei kontroliniams asmenims, tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tik palyginus CD2 pacientus su kontroline grupe (3,95 ‰ vs 2,97 ‰, $p = 0,014$). Nustatytas reikšmingai aukštesnis MB ‰ lygis moterims palyginus su vyrais CD1 (4,29 vs 2,62, $p = 0,003$) ir CD2 (4,74 vs 3,04, $p = 0,003$) grupėse. Rūkymas, šeiminė CD anamnezė, PAH, IŠL reikšmingos įtakos MB dažniui neturėjo ($p > 0,05$). CD2 pacientams su šiomis komplikacijomis ir lydinčiomis ligomis nustatytas aukštesnis MB ‰ lygis nei be jų: DSPN (5,03 vs 3,93, $p = 0,007$), dislipidemija (4,27 vs 2,81, $p = 0,041$), skydliaukės ligos (4,84 vs 3,49, $p = 0,024$). Nefropatijos ar KAN diagnozė reikšmingos įtakos MB dažniui neturėjo ($p > 0,05$). CD1 pacientams, vartojantiems statinus nustatytas aukštesnis MB ‰ lygis nei negydomiems pacientams (4,26 vs 3,08, $p = 0,031$). Kitų reikšmingų sąsajų tarp CD gydymo ir MB rodiklių nenustatyta.

Stebėta reikšminga teigiama MB dažnio koreliacija su amžiumi CD pacientų grupėje ($r_s = 0,40$, $p < 0,05$), kontrolinės grupės tiriamųjų ($r_s = 0,68$, $p < 0,05$) ir bendroje ($r_s = 0,50$, $p < 0,05$) imtyje (3.4 pav.)

3.10 lentelė. Mikrobranduolių (MB) testu tirtų cukriniu diabetu (CD) sergančių pacientų ir kontrolinės grupės demografiniai ir klinikiniai rodikliai

Table 3.10. Demographic and clinical data of patients with diabetes (DM) and the control group examined using the micronucleus (MN) method

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD 2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Demografiniai rodikliai ^f										
Lytis ²	Moterys ³	18	45,0	22	53,7	18	60,0	0,436	0,214	0,595
	Vyrai ⁴	22	55,0	19	46,3	12	40,0			
Rūkymas ⁵	Nerūko ⁶	25	62,5	31	75,6	26	86,7	0,202	0,024	0,247
	Rūkė/rūko ⁷	15	37,5	10	24,4	4	13,3			
Amžius ⁸ , metai ⁹ , vidurkis ¹⁰ (SD)		37,9 (13,1)		60,0 (13,0)		35,9 (12,2)		0,000	0,622	0,000
KMI ¹¹ , kg/m ² , vidurkis ¹⁰ (SD)		23,0 (3,7)		34,0 (5,3)		25,8 (4,3)		0,000	0,010	0,000
Diabetas ir komplikacijos ^g										
Diabeto stažas ¹² , metai ⁹ , vidurkis ¹⁰ (SD)		14,3 (14,1)		11,9 (8,7)				0,958		
Šeiminė diabeto anamnezė ¹³	Ne ⁶	22	55,0	12	29,3	22	73,3	0,019	0,116	0,000
	Taip ¹⁴	18	45,0	29	70,7	8	26,7			
Nefropatija ¹⁵	Ne ⁶	30	75,5	34	82,9			0,381		
	Taip ¹⁴	10	25,0	7	17,1					
Retinopatija ¹⁶	Ne ⁶	24	60,0	25	61,0			0,928		
	Taip ¹⁴	16	40,0	16	39,0					
Polineuropatija ¹⁷	Ne ⁶	28	70,0	27	65,9			0,689		
	Taip ¹⁴	12	30,0	14	34,1					

3.10 lentelė. Tęsinys
Table 3.10. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b			p reikšmė ^c	
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD 2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ¹⁸	Ne ⁶	27	67,5	19	46,3					
	Tikėtina ¹⁹	8	20,0	19	46,3					
	Taip ¹⁴	4	10,0	2	4,9			0,089		
	ND	1	2,5	1	2,4					
Lydinčios ligos ^h										
Išeminė širdies liga ²⁰	Ne ⁶	37	92,5	28	68,3	30	100,0	0,006	0,125	0,001
	Taip ¹⁴	3	7,5	13	31,7	0	0,0			
Arterinė hipertenzija ²¹	Ne ⁶	26	65,0	4	9,8	28	93,3	0,000	0,005	0,000
	Taip ¹⁴	14	35,0	37	90,2	2	6,7			
Dislipidemija ²²	Ne ⁶	22	55,0	9	22,0	28	93,3	0,002	0,000	0,000
	Taip ¹⁴	18	45,0	32	78,0	2	6,7			
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ²³	Ne ⁶	30	75,0	27	65,9	25	83,3	0,367	0,400	0,100
	Taip ¹⁴	10	25,0	14	34,1	5	16,7			

3.10 lentelė. Tęsinys
Table 3.10. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD 2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Vartojami medikamentai ^j										
Insulinas ²⁴	Ne ⁶	9	22,5	15	36,6			0,165		
	Taip ¹⁴	31	77,5	26	63,4					
Metforminas ²⁵	Ne ⁶	38	95,0	8	19,5			0,000		
	Taip ¹⁴	2	5,0	33	80,5					
Kiti antidiabetiniai preparatai ²⁶	Ne ⁶	38	95,0	22	53,7			0,000		
	Taip ¹⁴	2	5,0	19	46,3					
Statinai ²⁷	Ne ⁶	30	75,0	19	46,3	28	93,3	0,008	0,044	0,000
	Taip ¹⁴	10	25,0	22	53,7	2	6,7			

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas, CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; KMI – kūno masės indeksas; SD – standartinė deviacija..

¹Variables; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Age; ⁹Years; ¹⁰Mean; ¹¹BMI – body mass index; ¹²Diabetes duration;

¹³Family history of diabetes; ¹⁴Yes; ¹⁵Nephropathy; ¹⁶Retinopathy; ¹⁷Polyneuropathy; ¹⁸Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁹Probable; ²⁰Ischemic heart disease;

²¹Primary arterial hypertension; ²²Dyslipidemia; ²³Thyroid diseases (except cancers); ²⁴Insulin; ²⁵Metformin; ²⁶Other antidiabetic drugs; ²⁷Statins;

^aDiabetes; ^bControl; ^cp value; ^dT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^eT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^fDemographic data; ^gDiabetes and complications;

^hComorbidities; ^jTreatment.

3.11 lentelė. Mikrobranduolių (MB) dažnio pasiskirstymas tiriamoje imtyje pagal demografinius ir klinikinius rodiklius

Table 3.11. Distribution of micronucleus (MN) frequency in the study sample based on demographic and clinical indicators.

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB (‰) ^e (SD)	MB (‰) ^e (SD)	MB (‰) ^e (SD)
Visi tiriamieji ²		3,38 (1,69)	3,95 (1,81) 0,106▲	2,97 (1,52) 0,138▶ 0,014◀
	Moterys ⁴	4,29 (1,96)	4,74 (1,84) 0,527▲	3,35 (1,72) 0,074▶ 0,014◀
Lytis ³	Vyrai ⁵	2,62 (0,93)	3,04 (1,31) 0,308▲	2,39 (0,97) 0,363▶ 0,236◀
p reikšmė ⁶	M vs V	0,003*	0,003*	0,200*
	Ne ⁸	3,63 (1,84)	4,25 (1,90) 0,123▲	2,94 (1,42) 0,065▶ 0,005◀
Rūkymas ⁷	Taip ⁹	2,96 (1,34)	3,02 (1,16) 0,892▲	3,15 (2,38) 0,885▶ 0,945◀
p reikšmė ⁶	Nerūko ⁸ vs Rūko ⁹	0,346*	0,061*	0,883*
	Ne ⁸	3,53 (1,75)	4,33 (1,05) 0,110▲	3,13 (1,68) 0,385▶ 0,015◀
Šeiminė CD anamnezė ¹⁰	Taip ⁹	3,19 (1,64)	3,79 (2,04) 0,325▲	2,52 (0,92) 0,238▶ 0,110◀
p reikšmė ⁶	Anamn. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,545*	0,176*	0,836*
	Ne ⁸	3,40 (1,84)	3,85 (1,77) 0,247▲	N.A.
Nefropatija ¹¹	Taip ⁹	3,29 (1,20)	4,44 (2,05) 0,315▲	
p reikšmė ⁶	Nefrop. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,508*	0,465*	

3.11 lentelė. Tęsinys
Table 3.11. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB (%) ^e (SD)	MB (%) ^e (SD)	MB (%) ^e (SD)
DSPN ¹²	Ne ⁸	3,21 (1,61)	3,39 (1,48) 0,490▲	N.A.
	Taip ⁹	1,76 (1,87)	5,03 (1,97) 0,067▲	
p reikšmė ⁶	DSPN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,260*	0,007*	
KAN ¹³	Ne ⁸	3,47 (1,61)	3,69 (1,55) 0,585▲	N.A.
	Galimai ¹⁴ / Taip ⁹	3,27 (1,95)	4,20 (2,07) 0,141▲	
		2,15	3,81	
p reikšmė ⁶	ND (1 ir 1) CAN Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,776*	0,421*	
Retinopatija ¹⁵	Ne ⁸	3,49 (1,94)	3,54 (1,62) 0,589▲	N.A.
	Taip ⁹	3,21 (1,25)	4,59 (1,97) 0,035▲	
p reikšmė ⁶	Retin. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,817*	0,080*	
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ¹⁶	Ne ⁸	3,38 (1,81)	3,49 (1,54) 0,434▲	2,62 (1,26) 0,048▶
	Taip ⁹	3,37 (1,33)	4,84 (2,03) 0,084▲	0,022◀ 4,68 (1,69) 0,206▶
				0,893◀
p reikšmė ⁶	Skydl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,794*	0,024*	0,016 *
IŠL ¹⁷	Ne ⁸	3,24 (1,53)	4,10 (1,98) 0,056▲	—***
	Taip ⁹	5,10 (2,94)	3,64 (1,41) 0,296▲	
p reikšmė ⁶	IŠL Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,251*	0,688*	
PAH ¹⁸	Ne ⁸	3,30 (1,66)	3,60 (1,49) 0,659▲	2,85 (1,52) 0,213▶
	Taip ⁹	3,51 (1,78)	3,99 (1,86) 0,332▲	0,392◀ 4,52 (0,41) 0,333▶
				0,567◀
p reikšmė ⁶	PAH Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,547*	0,916*	0,138 *

3.11 lentelė. Tęsinys
Table 3.11. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB (‰) ^e (SD)	MB (‰) ^e (SD)	MB (‰) ^e (SD)
Dislipidemija ¹⁹	Ne ⁸	3,20 (1,70)	2,81 (1,35) 0,749▲	2,85 (1,52) 0,379▶ 0,931◀
	Taip ⁹	3,59 (1,69)	4,27 (1,82) 0,169▲	4,52 (0,41) 0,379▶ 0,749◀
	Disl. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,352*	0,041*	0,138 *
Insulinoterapija ²⁰	Ne ⁸	2,82 (1,28)	3,75 (2,43) 0,599▲	N.A.
	Taip ⁹	3,54 (1,77)	4,07 (1,38) 0,093▲	
	Ins. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,321*	0,201*	
Metforminas ²¹	Ne ⁸	3,41 (1,72)	3,79 (1,61) 0,485▲	N.A.
	Taip ⁹	2,72 (0,87)	3,99 (1,88) 0,407▲	
	Metf. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,656*	0,987*	
Kiti antidiabetiniai preparatai ²²	Ne ⁸	3,41 (1,72)	3,79 (1,53) 0,231▲	N.A.
	Taip ⁹	2,72 (0,87)	4,14 (2,12) 0,400▲	
	Kt. antidiab. Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,656*	0,676 *	
Statinais ²³	Ne ⁸	3,08 (1,53)	3,86 (1,57) 0,062▲	2,85 (1,52) 0,256▶ 0,037◀
	Taip ⁹	4,26 (1,89)	4,03 (2,03) 0,535▲	4,52 (0,41) 1,000▶ 0,464◀
	Statinais Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,031*	0,695*	0,138 *

▲ – p vertė, palyginus CD1 su CD2 pacientais;

▶ – p vertė, palyginus CD1 su kontroline grupe;

◀ – p vertė, palyginus CD2 su kontroline grupe;

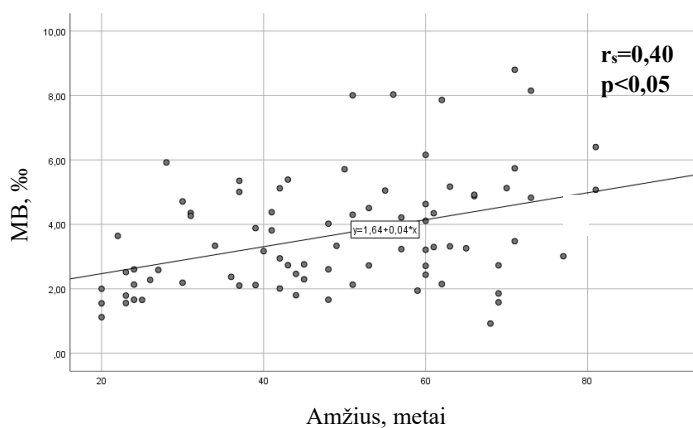
* – p vertė, palyginus demografinius ir klinikinius rodiklius (yra/nėra) atskirai CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėse

*** – kontroliniams asmenims nebuvo diagnozuota.

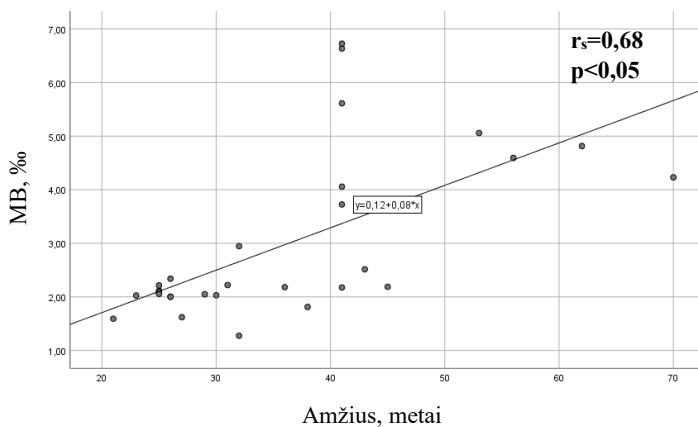
CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; MB (‰) – mikrobranduolių dažnis; MB-IND – mutagenu 4NQO indukuotas mikrobranduolių dažnis, gaunamas iš vidutinio MB dažnio mutagenu paveiktose ląstelėse atimant vidutinį MB dažnį mutagenu nepaveiktose ląstelėse; N.A. – netaikoma; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Whole group; ³Gender; ⁴Female; ⁵Male; ⁶p value; ⁷Smoking; ⁸No; ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes; ¹¹Nephropathy; ¹²Diabetic symmetric polyneuropathy; ¹³Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁴Probable; ¹⁵Retinopathy; ¹⁶Thyroid diseases (except cancers); ¹⁷Ischemic heart disease; ¹⁸Primary arterial hypertension; ¹⁹Dyslipidemia; ²⁰Insulin; ²¹Metformin; ²²Other antidiabetic drugs; ²³Statins;

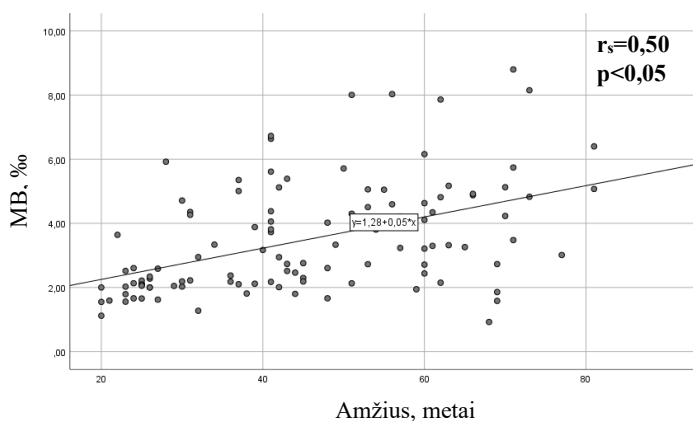
^aDiabetes; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^dControl; ^eMN – micronucleus frequency.



A. Pacientai sergantys cukriniu diabetu



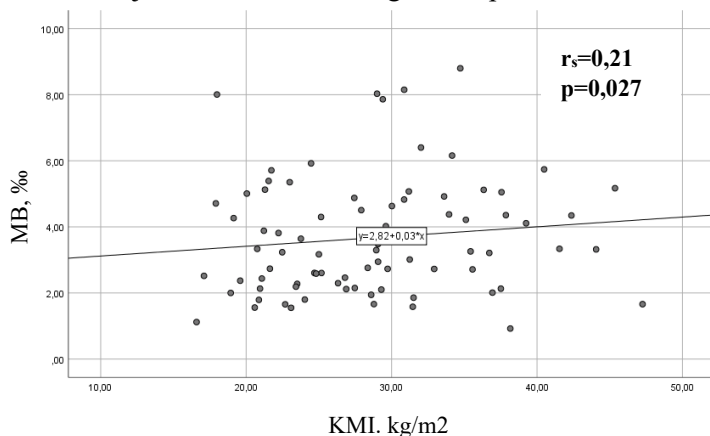
B. Kontrolinė grupė



C. Visa tiriamųjų imtis

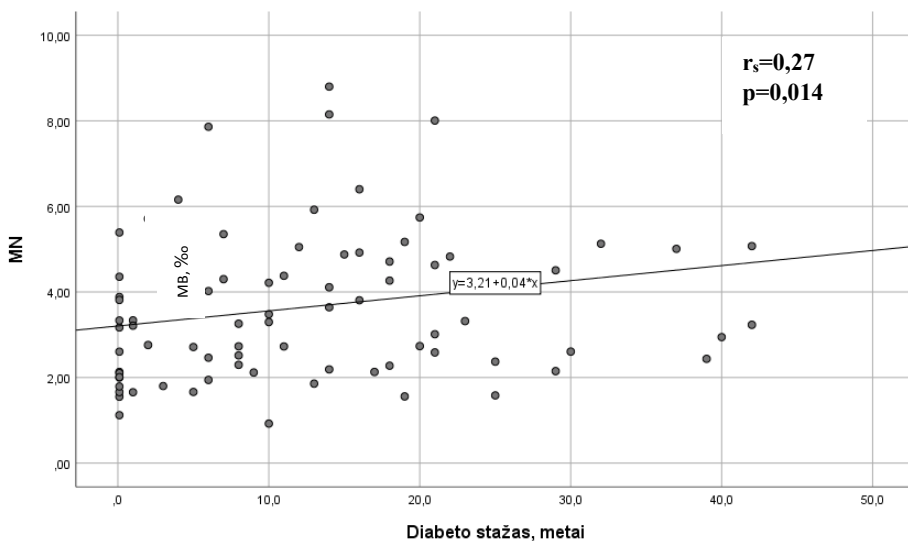
3.4 pav. Mikrobranduolių (MB) dažnio ir amžiaus koreliacija cukriniu diabetu sergančių pacientų (A), kontrolinės grupės tiriamųjų (B) ir bendroje imtyje (C).

Bendroje tiriamųjų imtyje stebėta reikšminga teigiama MB dažnio koreliacija su KMI ($r_s = 0,21$, $p = 0,027$) (3.5 pav.), tačiau atskirai CD pacientų ($r_s = 0,17$, $p = 0,132$) ir kontrolinės grupės tiriamųjų ($r_s = 0,31$, $p = 0,100$) teigiama koreliacija statistinio reikšmingumo nepasiekė.



3.5 pav. Mikrobranduolių (MB) dažnio ir kūno masės indekso (KMI) koreliacija bendroje imtyje.

CD sergančiųjų grupėje stebėta teigiama MB dažnio ir ligos stažo koreliacija ($r_s = 0,27$, $p = 0,014$) (3.6 pav.), o tarp MB dažnio ir HbA1c reikšminga koreliacija nenustatyta ($r_s = 0,13$, $p = 0,306$).



3.6 pav. Diabeto stažo ir MB dažnio koreliacija cukriniu diabetu sergančių pacientų grupėje.

3.2.4. Jautrumo mutagenui tyrimas sergančiųjų diabetu ir kontrolinių asmenų grupėse

Lentelėje 3.12 pavaizduotas SCM-IND pasiskirstymas pagal klinikinius ir demografinius rodiklius. Palyginus su kontroline grupe, nustatytas reikšmingai didesnis SCM-IND CD1 (3,59 vs 4,6, $p = 0,009$) ir CD2 (3,59 vs 5,06, $p = 0,004$) pacientams ir atskirai moterims CD1 (3,29 vs 4,61, $p = 0,016$) ir CD2 (3,29 vs 5,18, $p = 0,009$) pacientų grupėse. Diabetu sergantiems vyrams taip pat nustatytas didesnis SCM-IND, palyginus su kontrolinės grupės vyrais, tačiau skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo ($p < 0,005$). Didesnis SCM-IND taip pat nustatytas CD1 pacientams, nevartojantiems statinų, palyginus su gydomais pacientais (4,95 vs 3,63, $p = 0,022$), ir pacientams be DSPN, palyginus su tais, kuriems ši komplikacija diagnozuota (5,00 vs 3,62, $p = 0,018$). CD2 pacientų grupėje didesnis SCM-IND nustatytas pacientams su KAN, palyginus su pacientais be KAN (6,17 vs 4,06, $p = 0,001$), o kontrolinėje grupėje didesnis SCM-IND nustatytas nerūkantiems, palyginus su rūkančiais (3,88 vs 1,70, $p = 0,031$).

3.12 lentelė. Mutagenų indukuotų seserinių chromatidžių mainų (SCM-IND) dažnio pasiskirstymas pagal demografinius ir klinikinius rodiklius

Table 3.12. Distribution of mutagen-induced sister chromatid exchange (SCE-IND) frequency based on demographic and clinical indicators

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)
Visi tiriamieji ²		4,60 (1,67)	5,06 (2,22) 0,583▲	3,59 (2,00) 0,009► 0,004▲
	Moterys ⁴	4,61 (1,75)	5,18 (2,52) 0,648▲	3,29 (1,46) 0,016► 0,009
Lytis ³	Vyrai ⁵	4,58 (1,65)	4,89 (1,83) 0,738▲	4,05 (2,60) 0,439► 0,195▲
p reikšmė ⁶	M ⁴ vs V ⁵	0,992*	0,973*	0,346*
	Ne ⁸	4,65 (1,77)	5,08 (2,45) 0,748▲	3,88 (1,91) 0,070► 0,065▲
Rūkymas ⁷	Taip ⁹	4,69 (1,54)	4,96 (1,22) 0,386▲	1,70 (1,52) 0,004► 0,008▲
p reikšmė ⁶	Nerūko ⁸ vs Rūko ⁹	0,855*	0,737*	0,031*
	Ne ⁸	4,73 (1,51)	5,94 (2,62) 0,130▲	3,15 (1,51) 0,002► 0,000▲
Šeiminė diabeto anamnezė ¹⁰	Taip ⁹	4,44 (1,87)	4,66 (1,93) 0,871▲	4,79 (2,71) 0,945► 0,905▲
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,967*	0,098*	0,097*
	Ne ⁸	4,80 (1,55)	5,02 (2,26) 0,945▲	N.A.
Nefropatija ¹¹	Taip ⁹	3,82 (1,96)	5,21 (2,16) 0,237▲	
p reikšmė ⁶	Taip vs Ne	0,212*	0,782*	
	Ne ⁸	5,00 (1,33)	4,83 (2,18) 0,309▲	N.A.
DSPN ¹²	Taip ⁹	3,62 (2,05)	5,56 (2,32) 0,024▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,018*	0,190*	
	Ne ⁸	4,71 (1,41)	4,06 (1,41) 0,127▲	N.A.
KAN ¹³	Galimai ¹⁴ /Taip ⁹	4,08 (2,11)	6,17 (2,39) 0,018▲	
p reikšmė ⁶	ND (1 ir 1) Taip vs Ne	7,48 0,329*	2,54 0,001*	

3.12 lentelė. Tęsinys
Table 3.12. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)
Retinopatija ¹⁵	Ne ⁸	5,01 (1,43)	4,54 (1,67) 0,228▲	N.A.
	Taip ⁹	4,06 (1,84)	5,99 (2,80) 0,037▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,085 *	0,086 *	
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ¹⁶	Ne ⁸	4,53 (1,70)	5,10 (2,26) 0,520▲	3,73 (2,04) 0,049►
	Taip ⁹	4,79 (1,66)	4,98 (2,21) 0,905▲	2,91 (1,74) 0,018◄ 0,160►
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,671 *	0,923 *	0,098◄ 0,385*
IŠL ¹⁷	Ne ⁸	4,59 (1,64)	4,83 (2,10) 0,971▲	—***
	Taip ⁹	4,67 (2,58)	5,61 (2,49) 0,611▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	1,000 *	0,265 *	
PAH ¹⁸	Ne ⁸	4,96 (1,36)	3,89 (0,69) 0,116▲	3,57 (2,06) 0,002►
	Taip ⁹	3,92 (2,01)	5,17 (2,29) 0,084▲	0,602◄ 3,85 (0,95) 1,000►
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,064 *	0,234 *	0,434◄ 1,000*
Dislipidemija ¹⁹	Ne ⁸	5,01 (1,42)	5,60 (2,26) 0,653▲	3,57 (2,06) 0,003►
	Taip ⁹	4,14 (1,83)	4,9 (2,22) 0,273▲	0,011◄ 3,85 (0,95) 0,880►
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,064 *	0,234 *	0,589◄ 1,000*
Insulino terapija ²⁰	Ne ⁸	5,53 (1,75)	4,97 (1,80) 0,505▲	N.A.
	Taip ⁹	4,35 (1,59)	5,11 (2,47) 0,460▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,069 *	0,842 *	
Metforminas ²¹	Ne ⁸	4,55 (1,70)	4,56 (1,68) 0,819▲	N.A.
	Taip ⁹	5,26 (1,20)	5,20 (2,36) 0,644▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,543 *	0,545 *	

3.12 lentelė. Tęsinys
Table 3.12. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)	SCM-IND ^e (SD)
Kiti antidiabetiniai preparatai ²²	Ne ⁸	4,57 (1,72)	4,95 (1,84) 0,441▲	N.A.
	Taip ⁹	4,85 (1,27)	5,17 (2,63) 0,642▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,928*	0,741*	
	Ne ⁸	4,95 (1,65)	5,66 (2,61) 0,658▲	3,57 (2,06) 0,002►
	Taip ⁹	3,63 (1,38)	4,48 (1,62) 0,107▲	0,005◄ 0,800►
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,022*	0,173*	0,600◄ 1,000*

▲ – p vertė, palyginus CD1 su CD2 pacientais;

► – p vertė, palyginus CD1 su kontroline grupe;

◄ – p vertė, palyginus CD2 su kontroline grupe;

* – p vertė, palyginus demografinius ir klinikinius rodiklius (yra/nėra) atskirai CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėje

*** – kontroliniams asmenims nebuvo diagnozuota.

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SCM-IND – mutagenu 4NQO indukuoti seserinių chromatidžių mainų dažnis, gaunamas iš vidutinio SCM dažnio mutagenu paveiktose ląstelėse atimant vidutinį SCM dažnį mutagenu nepaveiktose ląstelėse; N.A. – netaikoma; SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Whole group; ³Gender; ⁴Female; ⁵Male; ⁶p value; ⁷Smoking; ⁸No; ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes; ¹¹Nephropathy; ¹²Diabetic symmetric polyneuropathy; ¹³Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁴Probable; ¹⁵Retinopathy; ¹⁶Thyroid diseases (except cancers); ¹⁷Ischemic heart disease; ¹⁸Primary arterial hypertension; ¹⁹Dyslipidemia; ²⁰Insulin; ²¹Metformin; ²²Other antidiabetic drugs; ²³Statins;

^aDiabetes; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^dControl;

^eSCM-IND – mutagen induced sister chromatid exchange.

CD1 pacientams su retinopatija nustatytas didesnis MB-IND, palyginus su pacientais be retinopatijos (3,05 vs 1,57, p=0,001). Kitų reikšmingų MB-IND skirtumų, vertinant pagal klinikinius ir demografinius tiriamųjų rodiklius, nenustatyta (lentelė 3.13).

3.13 lentelė. Mutagenų indukuotų mikrobranduolių (MB-IND) dažnio pasiskirstymas tiriamoje imtyje pagal demografinius ir klinikinius rodiklius
Table 3.13. Distribution of mutagen-induced micronucleus (MN-IND) frequency in the study sample based on demographic and clinical indicators

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)
Visi tiriamieji ²		2,16 (1,32)	1,69 (0,26) 0,527▲	1,90 (1,00) 0,643► 0,249◄
	Moterys ⁴	2,60 (1,46)	2,73 (1,97) 0,904▲	2,16 (1,00) 0,521► 0,638◄
	Lytis ³			
	Vyrai ⁵	1,80 (1,11)	2,19 (1,29) 0,284▲	1,50 (0,90) 0,466► 0,152◄
p reikšmė ⁶	M ⁴ vs V ⁵	0,055*	0,583*	0,095*
	Ne ⁸	2,30 (1,47)	2,71 (1,80) 0,453▲	1,93 (1,03) 0,624► 0,154◄
	Rūkymas ⁷			
	Taip ⁹	1,93 (1,04)	1,76 (1,18) 0,807▲	1,71 (0,81) 0,810► 1,000◄
p reikšmė ⁶	Nerūko ⁸ vs Rūko ⁹	0,659*	0,200*	0,883*
	Ne ⁸	2,31 (1,22)	1,92 (1,30) 0,292▲	1,86 (0,98) 0,205► 0,845◄
	Šeiminė CD anamnezė ¹⁰			
	Taip ⁹	1,98 (1,46)	2,71 (1,80) 0,143▲	1,99 (1,11) 0,807► 0,457◄
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,147*	0,238*	0,730*
	Ne ⁸	1,96 (1,11)	2,42 (1,69) 0,493▲	N.A.
	Nefropatija ¹¹			
	Taip ⁹	2,76 (1,76)	2,80 (1,83) 1,000▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,272*	0,465*	
	Ne ⁸	1,82 (0,91)	2,13 (1,47) 0,647▲	N.A.
	DSPN ¹²			
	Taip ⁹	2,96 (1,79)	3,17 (1,94) 0,899▲	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,069*	0,097*	
	Ne ⁸	1,95 (1,05)	2,48 (1,72) 0,468▲	N.A.
	KAN ¹³			
	Galimai ¹⁴ /Taip ⁹	2,35 (1,56)	2,57 (1,70) 0,726▲	
	ND (1 ir 1)			
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	5,53 0,558*	0,69 0,979*	

3.13 lentelė. Tęsinys
Table 3.13. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)
Retinopatija ¹⁵	Ne ⁸	1,57 (0,72)	2,21 (1,50)	N.A.
	Taip ⁹		0,201▲	
		3,05 (1,53)	2,91 (1,93)	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,001*	0,259*	
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ¹⁶	Ne ⁸	1,95 (1,15)	2,36 (1,73)	1,84 (1,06)
	Taip ⁹		0,523▲	0,761▶
		2,79 (1,66)	2,71 (1,66)	0,426◀
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,177*	0,454*	2,16 (0,58)
IŠL ¹⁷	Ne ⁸	2,04 (1,22)	2,46 (1,88)	0,679▶
	Taip ⁹		0,701▲	0,444◀
		3,69 (1,92)	2,54 (1,26)	0,448*
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,116*	0,552*	-***
PAH ¹⁸	Ne ⁸	1,96 (0,97)	1,24 (0,74)	1,88 (1,03)
	Taip ⁹		0,108▲	0,729▶
		2,53 (1,79)	2,62 (1,72)	0,279◀
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,644*	0,101*	2,14 (0,38)
Dislipidemija ¹⁹	Ne ⁸	2,02 (1,02)	2,07 (1,63)	0,600▶
	Taip ⁹		0,716▲	0,826◀
		2,33 (1,64)	2,60 (1,72)	0,717*
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,904*	0,359*	
Insulinoterapija ²⁰	Ne ⁸	1,84 (0,72)	2,67 (2,10)	N.A.
	Taip ⁹		0,482▲	
		2,25 (1,45)	2,37 (1,45)	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,702*	0,737▲	
Metforminas ²¹	Ne ⁸	2,17 (1,34)	2,00 (0,87)	N.A.
	Taip ⁹		1,000▲	
		2,04 (1,25)	2,61 (1,83)	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,974*	0,861▲	
Kiti antidiabetiniai preparatai ²²	Ne ⁸	2,17 (1,34)	2,40 (1,52)	N.A.
	Taip ⁹		0,634▲	
		2,04 (1,25)	2,58 (1,92)	
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,974*	1,000▲	
			0,875*	

3.13 lentelė. Tęsinys
Table 3.13. Continued

Kintamasis ¹		Diabetas ^a		Kontrolė ^d
		CD1 ^b	CD2 ^c	
		MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)	MB-IND ^e (SD)
	Ne ⁸	1,99 (1,17)	2,08 (1,77) 0,566▲	1,88 (1,03) 0,815▶ 0,795◄
Statinai ²³	Taip ⁹	2,67 (1,68)	2,83 (1,58) 0,952▲	2,14 (0,38) 0,758▶ 0,587◄
p reikšmė ⁶	Taip ⁹ vs Ne ⁸	0,315*	0,067*	0,717*

▲ – p vertė, palyginus CD1 su CD2 pacientais;

▶ – p vertė, palyginus CD1 su kontroline grupe;

◄ – p vertė, palyginus CD2 su kontroline grupe;

* – p vertė, palyginus demografinius ir klinikinius rodiklius (yra/nėra) atskirai CD1, CD2 ir kontrolinėje grupėje

*** – kontroliniams asmenims nebuvo diagnozuota.

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; MB (%) – mikrobranduolių dažnis; MB-IND – mutagenu 4NQO indukuotas mikrobranduolių dažnis, gaunamas iš vidutinio MB dažnio mutagenu paveiktose ląstelėse atimant vidutinį MB dažnį mutagenu nepaveiktose ląstelėse; N.A. – netaikoma; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Whole group; ³Gender; ⁴Female; ⁵Male; ⁶p value; ⁷Smoking; ⁸No; ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes; ¹¹Nephropathy; ¹²Diabetic symmetric polyneuropathy; ¹³Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁴Probable; ¹⁵Retinopathy; ¹⁶Thyroid diseases (except cancers); ¹⁷Ischemic heart disease; ¹⁸Primary arterial hypertension; ¹⁹Dyslipidemia; ²⁰Insulin; ²¹Metformin; ²²Other antidiabetic drugs; ²³Statins;

^aDiabetes; ^bT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^cT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^dControl; ^eMN-IND – mutagen induced micronucleus.

3.2.5. Chromosomų aberacijų dažnis diabetų sergančių ir kontrolinių asmenų limfocituose

Chromosomų aberacijos išanalizuotos 33 CD1, 22 CD2 pacientų ir 21 kontrolinių asmenų periferinio kraujo limfocituose. Kadangi CA tyrimas atliktas tik daliai tirtųjų asmenų, jų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikti atskiroje lentelėje (3.14 lentelė). CD1 grupėje įtraukta reikšmingai daugiau vyrų, palyginus su kontroline grupe. CD2 pacientai buvo reikšmingai vyresni, turėjo daugiau artimųjų, sergančių CD, dažniau sirgo lydinčiomis ligomis, tokiomis kaip nutukimas, dislipidemija, AH ir dažniau vartojo antihipertenziniu vaistus, palyginus su CD1 ir kontroline grupe. Tačiau CD1 ir CD2 pacientai nesiskyrė CD trukme ir mikrovaskulinių komplikacijų dažniu. Septyniasdešimt devyni procentai CD1 pacientų ir 68 % CD2 pacientų buvo gydomi insulinu, ir 82 % CD2 pacientų buvo gydomi metforminu.

Dėl nesubalansuotų demografinių ir klinikinių tiriamosios imties rodiklių buvo atlikta daugianarė statistinė analizė, kuriai naudojami kintamieji, atrinkti atliekant vienanarius testus.

Pirmiausia, naudojant Kruskal-Wallis testą, paskaičiuoti CTB – chromatidinių trūkių, CTE – chromatidinių mainų, CSB – chromosominių trūkių ir CSE – chromosominių mainų dažniai bei bendras aberacijų dažnis 100-e kiekvieno tiriamojo ląstelės (3.15 lentelė). Nustatytas ženklus kintamųjų vidurkių variabilumas grupėse – CTB ($p = 0,0059$), CSB ($p = 0,0002$), ir bendras CA ($p = 0,0002$). CTE vidurkių skirtumas nebuvo reikšmingas ($p = 0,8981$), o CSE nustatytas ribinis reikšmingumas ($p = 0,0503$). Nustatytas reikšmingas CSE dažnio skirtumas palyginus kontrolinę ir CD pacientų grupės ($p = 0,0159$, Mann-Whitney U testas), tačiau CTE and CSE dažniai buvo per žemi tolesnei statistinei analizei – šių aberacijų apskritai nenustatyta 15 kontrolinės grupės tiriamųjų, 15 CD1 ir 11 CD2 pacientų. Todėl tolesnei analizei buvo naudojamas CTA (chromatidinio tipo aberacijos) kintamasis, apjunginatis CTB ir CTE, ir CSA (chromosominio tipo aberacijos) kintamasis, apjungiantis CSB ir CSE.

3.14 lentelė. Chromosomų aberacijų (CA) testu tirtų cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės demografiniai ir klinikiniai rodikliai

Table 3.14. Demographic and clinical data of patients with diabetes and the control group examined using the chromosome aberration (CA) test

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c			
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b	
		N	%	N	%						
Demografiniai rodikliai ^f											
Lytis ²	Moterys ³	13	39,4	13	59,1	17	81,0	0,152	0,003	0,119	
	Vyrai ⁴	20	60,6	9	40,9	4	19,0				
Rūkymas ⁵	Nerūko ⁶	15	45,5	16	72,7	15	71,4	0,046	0,061	0,924	
	Rūkė/rūko ⁷	18	54,5	6	27,3	6	28,6				
Amžius ⁸ , metai ⁹ , vidurkis ¹⁰ (SD)		39,8 (15,4)		61,8 (14,1)		38,1 (13,6)		0,000	0,809	0,000	
KMI ¹¹ , kg/m ² , vidurkis ¹⁰ (SD)		23,6 (3,7)		35,5 (6,1)		25,9 (4,6)		0,000	0,181	0,000	
Diabetas ir komplikacijos ^g											
Diabeto stažas ¹² , metai ⁹ , vidurkis ¹⁰ (SD)		13,5 (13,3)		12,9 (7,7)				0,672			
Šeiminė diabeto anamnezė ¹³	Ne ⁶	19	57,6	5	22,7	15	71,4	0,011	0,304	0,001	
	Taip ¹⁴	14	42,4	17	77,3	6	28,6				
Nefropatija ¹⁵	Ne ⁶	26	78,8	18	81,8			0,783			
	Taip ¹⁴	7	21,2	4	18,2						
Polineuropatija ¹⁶	Ne ⁶	22	66,7	10	45,5			0,118			
	Taip ¹⁴	11	33,3	12	54,5						
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ¹⁷	Ne ⁶	21	63,6	9	40,9			0,091			
	Tikėtina ¹⁸	6	18,2	11	50,0						
	Taip ¹⁴	4	12,1	1	4,5						
	ND	2	6,1	1	4,5						

3.14 lentelė. Tęsinys
Table 3.14. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a				Kontrolinė grupė ^b		p reikšmė ^c		
		CD1 ^d		CD2 ^e		N	%	CD1 ^d vs CD2 ^e	CD1 ^d vs Kontrolė ^b	CD2 ^e vs Kontrolė ^b
		N	%	N	%					
Lydinčios ligos ^h										
Išeminė širdies liga ¹⁹	Ne ⁶	31	93,9	14	63,6	21	100,0	0,004	0,250	0,002
	Taip ¹⁴	2	6,1	8	36,4	0	0,0			
Pirminė arterinė hipertenzija ²⁰	Ne ⁶	20	60,6	2	9,1	19	90,5	0,000	0,017	0,000
	Taip ¹⁴	13	39,4	20	90,9	2	9,5			
Dislipidemija ²¹	Ne ⁶	16	48,5	3	13,6	19	90,5	0,008	0,002	0,000
	Taip ¹⁴	17	51,5	19	86,4	2	9,5			
Skydliaukės ligos (išsk. Vėžį) ²²	Ne ⁶	24	72,7	13	59,1	16	76,2	0,291	0,777	0,232
	Taip ¹⁴	9	27,3	9	40,9	5	23,8			
Vartojami medikamentai ^j										
Insulinas ²³	Ne ⁶	7	21,2	7	31,8	0,376				
	Taip ¹⁴	26	78,8	15	68,2					
Metforminas ²⁴	Ne ⁶			4	18,2					
	Taip ¹⁴			18	81,8					
Statinai ²⁵	Ne ⁶	23	69,7	12	54,5	19	90,5	0,252	0,073	0,009
	Taip ¹⁴	10	30,3	10	45,5	2	9,5			
Antihipertenziniai vaistai ²⁶	Ne ⁶	20	60,6	2	9,1	19	90,5	0,000	0,017	0,000
	Taip ¹⁴	13	39,4	20	90,9	2	9,5			

CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas, CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas, KMI – kūno masės indeksas; SD – standartinė deviacija.

¹Variables; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Age; ⁹Years; ¹⁰Mean; ¹¹BMI – body mass index; ¹²Diabetes duration;

¹³Family history of diabetes; ¹⁴Yes; ¹⁵Nephropathy; ¹⁶Diabetic symetric polyneuropathy; ¹⁷Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁸Probable; ¹⁹Ischemic heart disease;

²⁰Primary arterial hypertension; ²¹Dyslipidemia; ²²Thyroid diseases (except cancers); ²³Insulin; ²⁴Metformin; ²⁵Statins; ²⁶Antihypertensive drugs.

^aDiabetes; ^bControl; ^cp value; ^dT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^eT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^fDemographic data; ^gDiabetes and complications;

^hComorbidities; ^jTreatment.

Pav. 3.7 pavaizduoti CTA ir CSA dažniai tiriamųjų grupėse. CD1 ir CD2 pacientams nustatyti didesni CTA dažniai, palyginus su kontroline grupe (atitinkamai, $p = 0,0053$ ir $p = 0,0133$, Mann-Whitney U-testas), tačiau palyginus CD1 ir CD2 reikšmingo skirtumo nenustatyta ($p = 0,9347$). CSA dažniai buvo didesni CD1 ir CD2 pacientams, palyginus su kontroline grupe (atitinkamai, $p = 0,0203$ ir $p = 0,00002$) ir CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais ($p = 0,0173$).

Toliau analizavome įvairių demografinių ir klinikinių rodiklių sąsajas su chromosomų aberacijų dažniu. Lentelėje 3.16 pavaizduotas CTA, CSA ir bendras aberacijų pasiskirstymas tiriamųjų grupėse pagal demografinius ir klinikinius rodiklius. Jokių reikšmingų sąsajų pagal šiuos rodiklius nebuvo nustatyta, ir standartizuoti poveikio dydžiai buvo maži. Tačiau tokiems rodikliams kaip KMI, ligos stažas ir amžius apskaičiuotos neabejotinos sąsajos su tam tikromis aberacijomis. CTA nustatyta reikšminga teigiama koreliacija su ligos stažu ($r_s = 0,29$, $p = 0,001$; 3.8 pav.), tačiau koreliacija su amžiumi ($r_s = 0,18$, $p = 0,1295$) ir KMI ($r_s = 0,04$, $p = 0,737$) nebuvo reikšminga. CSA nustatyta reikšminga teigiama koreliacija su visais trimis kintamaisiais – ligos trukme ($r_s = 0,43$, $p = 0,000$), amžiumi ($r_s = 0,39$, $p = 0,000$), ir KMI ($r_s = 0,35$, $p = 0,002$) (3.9 pav.). Tačiau akivaizdu, kad pacientų amžius ir ligos trukmė tarpusavyje stipriai koreliuojantys kintamieji ($r_s = 0,43$, $p = 0,000$), todėl į tai atsižvelgėme atlikdami tolesnius skaičiavimus.

3.15 lentelė. Chromosomų aberacijų dažnis cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinėje grupėse

Table 3.15. Frequency of chromosome aberrations in patients with diabetes and in the control group

Tiriamųjų grupė ¹	Aberacijos/100 ląstelių ^{**a}														
	CTB ^b			CTE ^c			CSB ^d			CSE ^e			Bendras CA ^f		
	Vidur kis ^g	SD	min–max	Vidur kis ^g	SD	min–max	Vidur kis ^g	SD	min–max	Vidur kis ^g	SD	min–max	Vidur kis ^g	SD	min–max
Kontrolė ²	1,48	0,68	0,50–3,00	0,07	0,18	0,00–0,50	0,21	0,29	0,00–1,00	0,10	0,22	0,00–0,67	1,83	0,90	0,50–4,00
CD1 ³	2,38	1,26	0,00–5,33	0,08	0,18	0,00–0,50	0,39	0,53	0,00–2,00	0,37	0,51	0,00–2,00	3,13	1,47	1,00–6,00
CD2 ⁴	2,26	0,93	0,50–4,00	0,06	0,16	0,00–0,50	0,80	0,53	0,00–2,00	0,47	0,65	0,00–2,50	3,60	1,47	1,00–7,50
p-reikšmė ^{**5}		0,0059			0,8981			0,0002			0,0503			0,0002	

* CTB – chromatidiniai trūkiai; CTE – chromatidiniai mainai; CSB – chromosominiai trūkiai; CSE – chromosominiai mainai; bendras CA – bendras chromosomų aberacijų dažnis; CD1 – pirmo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antro tipo cukrinis diabetas; SD – standartinė deviacija.

** Kruskal-Wallis testas

¹Groups; ²Control; ³T1DM; ⁴T2DM; ⁵p value ** Kruskal-Wallis test

^aAberrations per 100 cells; ^bCTB – chromatid breaks; ^cCTE – chromatid exchanges; ^dCSB – chromosome breaks; ^eCSE – chromosome exchanges; ^ftotal CA – total number of aberrations; ^gMean

3.16 lentelė. Chromosomų aberacijų pasiskirstymas pagal tiriamųjų grupių kategorinius demografinius ir klinikinius rodiklius
 Table 3.16. Distribution of chromosome aberrations based on categorical demographic and clinical indicators of the study groups

Kintamieji ¹		Diabetas ^a						Kontrolė ^b		
		CD1 ^c			CD2 ^d			CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)
		CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)	CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)			
Lytis ²	Moterys ³	2,32 (1,28)	0,97 (0,98)	3,21 (1,54)	2,41 (1,05)	1,13 (0,77)	3,54 (1,65)	1,56 (0,75)	0,24 (0,36)	1,76 (0,87)
	Vyrai ⁴	2,53 (1,34)	0,63 (0,65)	3,08 (1,45)	2,20 (0,95)	1,48 (1,20)	3,68 (1,27)	1,50 (0,58)	0,63 (0,63)	2,13 (1,11)
Rūkymas ⁵	Ne ⁶	2,45 (1,12)	0,84 (0,88)	3,28 (1,68)	2,35 (0,96)	1,13 (0,69)	3,48 (1,47)	1,73 (0,62)	0,37 (0,48)	2,07 (0,84)
	rūkė/rūko ⁷	2,45 (1,47)	0,70 (0,75)	3,01 (1,30)	2,25 (1,17)	1,67 (1,47)	3,92 (1,56)	1,08 (0,74)	0,17 (0,26)	1,25 (0,82)
Skydliaukės ligos ⁸	Ne ⁶	2,49 (1,42)	0,76 (0,83)	3,13 (1,55)	2,39 (1,17)	1,50 (1,08)	3,89 (1,58)	1,50 (0,55)	0,25 (0,41)	1,72 (0,82)
	Taip ⁹	2,36 (0,99)	0,80 (0,75)	3,13 (1,29)	2,22 (0,71)	0,94 (0,68)	3,17 (1,27)	1,70 (1,15)	0,50 (0,50)	2,20 (1,15)
Šeiminė CD anamnezė ¹⁰	Ne ⁶	2,37 (1,23)	0,95 (0,98)	3,21 (1,54)	2,32 (1,43)	1,40 (0,81)	3,73 (1,98)	1,70 (0,68)	0,27 (0,46)	1,97 (0,90)
	Taip ⁹	2,56 (1,43)	0,52 (0,35)	3,02 (1,41)	2,32 (0,88)	1,24 (1,02)	3,56 (1,37)	1,17 (0,68)	0,42 (0,38)	1,50 (0,89)
PAH ¹¹	Ne ⁶	2,61 (1,59)	0,78 (0,86)	3,26 (1,68)	2,50 (0,71)	1,00 (0,71)	3,50 (1,41)	1,55 (0,66)	0,32 (0,45)	1,84 (0,91)
	Taip ⁹	2,21 (0,65)	0,74 (0,72)	2,94 (1,09)	2,31 (1,03)	1,30 (0,99)	3,61 (1,52)	1,50 (1,41)	0,25 (0,35)	1,75 (1,06)
Dislipidemija ¹²	Ne ⁶	2,79 (1,60)	0,82 (0,96)	3,45 (1,73)	1,93 (0,12)	1,11 (0,54)	3,04 (0,51)	1,55 (0,66)	0,32 (0,45)	1,84 (0,91)
	Taip ⁹	2,13 (0,87)	0,72 (0,64)	2,83 (1,14)	2,39 (1,01)	1,30 (1,02)	3,68 (1,57)	1,50 (1,41)	0,25 (0,35)	1,75 (1,06)
IŠL ¹³	Ne ⁶	2,48 (1,33)	0,74 (0,79)	3,14 (1,46)	2,27 (0,92)	0,99 (0,61)	3,26 (1,29)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	2,00 (0,71)	1,25 (1,06)	3,00 (2,12)	2,42 (1,17)	1,77 (1,27)	4,19 (1,67)			
Nefropatija ¹⁴	Ne ⁶	2,51 (1,42)	0,83 (0,87)	3,24 (1,56)	2,41 (1,03)	1,12 (0,70)	3,53 (1,56)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	2,21 (0,76)	0,52 (0,41)	2,74 (1,03)	1,95 (0,82)	1,96 (1,70)	3,91 (1,15)			
DSPN ¹⁵	Ne ⁶	2,64 (1,52)	0,80 (0,84)	3,33 (1,62)	2,56 (1,11)	1,30 (0,62)	3,86 (1,50)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	2,06 (0,56)	0,70 (0,75)	2,74 (1,06)	2,13 (0,88)	1,25 (1,20)	3,38 (1,48)			
KAN ¹⁶	Ne ⁶	2,54 (1,47)	0,87 (0,91)	3,30 (1,57)	2,06 (0,98)	1,39 (1,27)	3,44 (1,33)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	2,35 (1,06)	0,47 (0,38)	2,82 (1,20)	2,64 (0,92)	1,25 (0,72)	3,89 (1,53)			
	ND	2,00 (0,71)	1,25 (1,06)	3,00 (2,12)	1,00	0,50	1,50			
Insulinas ¹⁷	Ne ⁶	2,52 (1,89)	0,38 (0,39)	2,74 (1,70)	2,50 (1,08)	1,29 (0,57)	3,79 (1,32)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹	2,43 (1,14)	0,87 (0,85)	3,24 (1,41)	2,24 (0,98)	1,27 (1,11)	3,51 (1,58)			
Metforminas ¹⁸	Ne ⁶	N.A.	N.A.	N.A.	2,13 (1,18)	1,38 (0,25)	3,50 (1,08)	N.A.	N.A.	N.A.
	Taip ⁹				2,37 (0,98)	1,25 (1,06)	3,62 (1,57)			
Statinali ¹⁹	Ne ⁶	2,66 (1,44)	0,88 (0,85)	3,40 (1,53)	2,47 (1,15)	1,21 (0,65)	3,68 (1,60)	1,55 (0,66)	0,32 (0,45)	1,84 (0,91)
	Taip ⁹	1,97 (0,76)	0,52 (0,63)	2,52 (1,16)	2,15 (0,78)	1,35 (1,27)	3,50 (1,39)	1,50 (1,41)	0,25 (0,35)	1,75 (1,06)

3.16 lentelė. Tęsinys
Table 3.16. Continued

Kintamieji ¹		Diabetas ^a						Kontrolė ^b		
		CD1 ^c			CD2 ^d					
		CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)	CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)	CTA ^e (SD)	CSA ^f (SD)	CA ^g (SD)
Antihipertenzi	Ne ⁶	2,56 (1,59)	0,83 (0,88)	3,26 (1,68)	2,50 (0,71)	1,00 (0,71)	3,50 (1,41)	1,55 (0,66)	0,32 (0,45)	1,84 (0,91)
niai v. ²⁰	Taip ⁹	2,28 (0,69)	0,67 (0,69)	2,94 (1,09)	2,31 (1,03)	1,30 (0,99)	3,61 (1,52)	1,50 (1,41)	0,25 (0,35)	1,75 (1,06)

CA – bendras chromosomų aberacijų dažnis; CD1 – pirmojo tipo cukrinis diabetas; CD2 – antrojo tipo cukrinis diabetas; CSA – chromosominio tipo aberacijos; CTA – chromatidinio tipo aberacijos; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; IŠL – išeminė širdies liga; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; N.A. – netaikoma; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SD – standartinė deviacija.

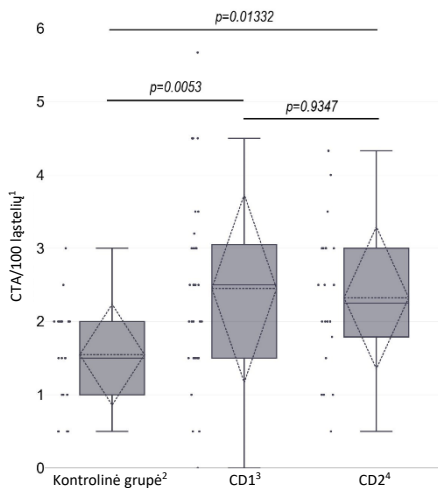
¹Variables; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Smoking; ⁶No; ⁷Current smoker/was smoking; ⁸Thyroid diseases (except cancers); ⁹Yes; ¹⁰Family history of diabetes;

¹¹Primary arterial hypertension; ¹²Dyslipidemia; ¹³Ischemic heart disease; ¹⁴Nephropathy; ¹⁵Diabetic symmetric polyneuropathy; ¹⁶Cardiac autonomic neuropathy;

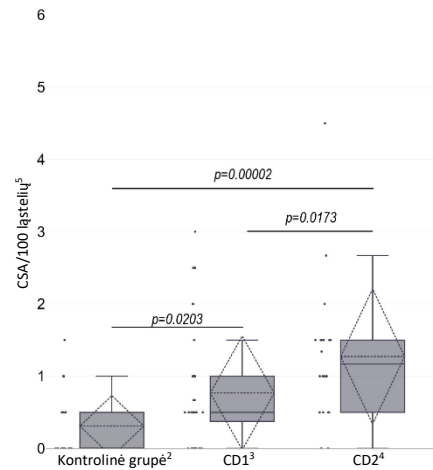
¹⁷Insulin; ¹⁸Metformin; ¹⁹Statins; ²⁰Antihypertensive drugs.

^aDiabetes; ^bControl; ^cT1DM – type 1 diabetes mellitus; ^dT2DM – type 2 diabetes mellitus; ^echromatid-type aberrations; ^fchromosome-type aberrations;

^gChromosome aberrations.



(A)

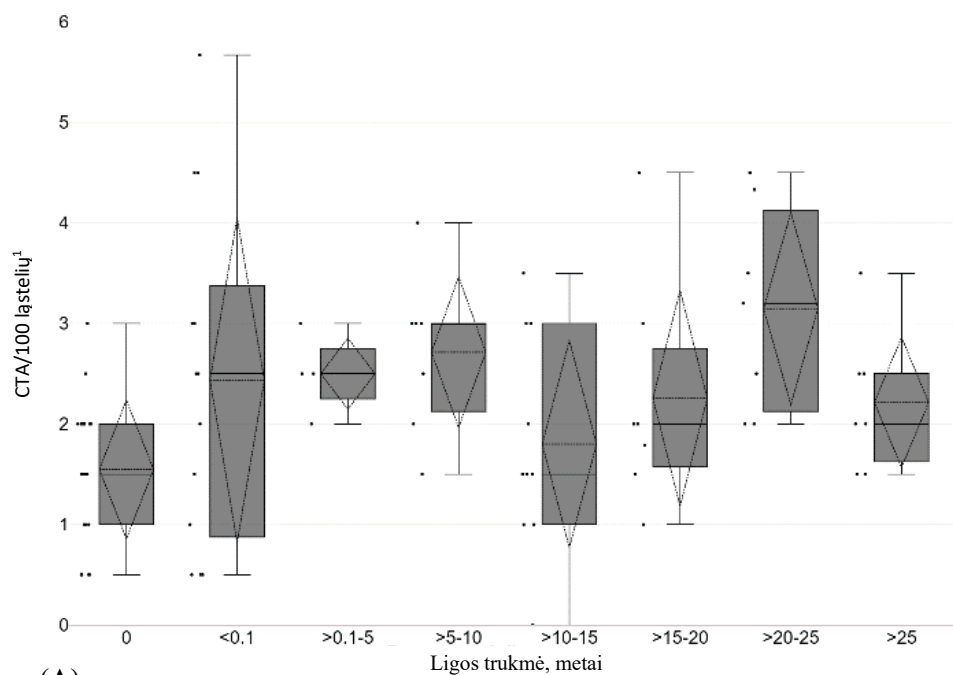


(B)

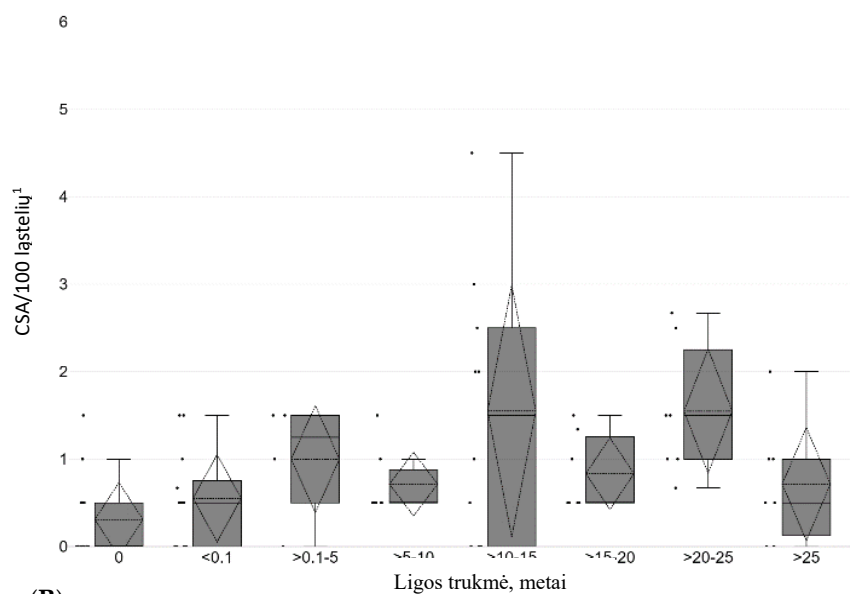
3.7 pav. Chromatidinio tipo (CTA, pav. A) ir chromosominio tipo (CSA, pav. B) aberacijos pirmojo tipo (CD1), antrojo tipo (CD2) diabetu sergančiųjų ir kontrolinės grupės tiriamųjų limfocituose. Stačiakampėse diagramose pavaizduota pirma kvartilė, mediana ir trečia kvartilė, ūsų galai pažymi 10-tą ir 90-tą procentiles. Punktyrine linija pažymėtas vidurkis, punktyriniais trikampiais – standartinio nuokrypio reikšmės. Juodais taškais pažymėtos individualios reikšmės. P reikšmės paskaičiuotos naudojant Man-Whitney U testą.

Figure 3.7. The frequency of chromatid-type (CTA, panel a) and chromosome-type (CSA, panel b) aberrations in lymphocytes of subjects without diabetes and patients with type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes. Box plots show the first quartile, median, and third quartile, the ends whiskers mark the 10th and 90th percentiles. The dashed line shows average value, dashed triangles – standard deviation values. Black dots represent individual values. P values were calculated using Man-Whitney U-test.

¹CTA/cells; ²Control; ³T1DM; ⁴T2DM; ⁵CSA/cells.



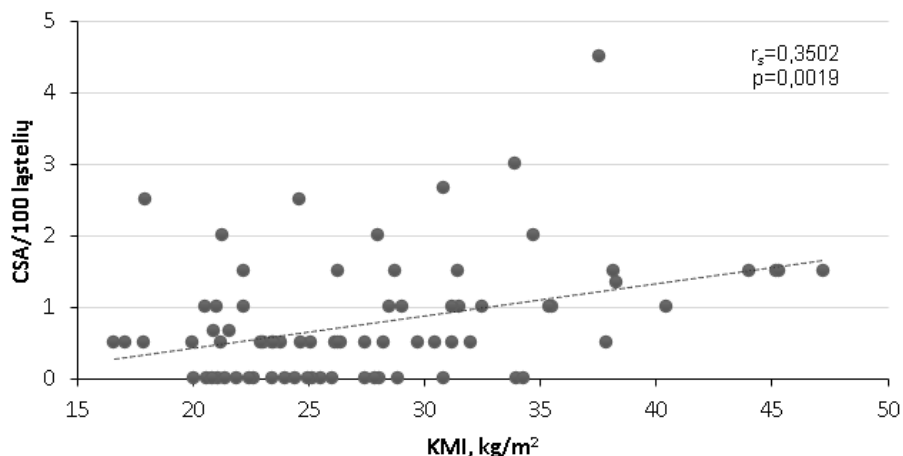
(A)



(B)

3.8 pav. Chromatidinio tipo (CTA, pav. A) ir chromosominio tipo (CSA, pav. B) aberacijų dažnio pasiskirstymas cukriniu diabetu sergančių pacientų limfocituose pagal ligos stažą (metai nuo ligos diagnozės diagnozės).

Stačiakampėse diagramose pavaizduota pirma kvartilė, mediana ir trečia kvartilė, ūsų galais pažymėta 10-ta ir 90-ta procentilės. Punktyrine linija pažymėtas vidurkis, punktyriniais trikampaiais – standartinio nuokrypio reikšmės. Juodais taškais pažymėtos individualios reikšmės.



3.9 pav. Chromosominio tipo aberacijų (CSA) ir kūno masės indekso (KMI) koreliacija cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės limfocituose.

3.2.6. Klinikinių, demografinių ir genetinių rodiklių tarpusavio sąveikos ir priklausomybės

Atliekant skaičiavimus nustatyta, kad daugelis tiriamosios imties demografinių ir klinikinių rodiklių tarpusavyje koreliuoja (3.17 lentelė). Dalis šių koreliacijų yra kliniškai ir biologiškai prasmingos (pvz., KMI ir lydimys susirgimai, tokie kaip PAH, dislipidemija, poliligitumas), tačiau kita dalis – atsitiktinės (pvz., lytis ir amžius). Atsitiktinės koreliacijos galimai atsirado dėl nepakankamai subalansuotos imties, nes kai kurių rodiklių subalantuoti ir nėra įmanoma (pvz., CD1 pacientai visada bus jaunesnio amžiaus, mažesnio KMI ir mažiau poliligoti, palyginus su CD2 pacientais). Siekiant įvertinti įvairių rodiklių tarpusavio sąveikas ir išrinkti tikrai reikšmingas, atlikti daigianariai statistiniai skaičiavimai, naudojant pažingsninę daigianarę ir logistinę regresines analizes.

3.17 lentelė. Tirtų demografinių ir klinikinių rodiklių tarpusavyje koreliacijos

Table 3.17. Intercorrelations of the demographic and clinical indicators

	Amžius ¹⁷	Lytis ¹	KMI ²	CD tipas ³	Ligos trukmė ⁴	HbA1C	Prasta ligos kontrolė ⁵	Šeiminis paveldėjimas ⁶	Retino patija ⁷	Polineuropatija ⁸	Autonominė širdies neuropatija ⁹	Nefropatija ¹⁰	Lėtinė inkstų liga ¹¹	GFG ¹²	PAH ¹³	Dislipidemija ¹⁴	Statinių vartojimas ¹⁵
Lytis ¹	0,18																
KMI ²	0,57	0,01															
CD tipas ³	-0,10	-0,09	-0,38														
Ligos trukmė ⁴	0,45	0,08	0,16	0,53													
HbA1C	-0,01	0,03	-0,05	-0,07	-0,13												
Prasta ligos kontrolė ⁵	0,25	0,16	0,14	-0,08	0,45	0,23											
Šeiminis paveldėjimas ⁶	0,09	-0,03	0,28	0,07	0,14	0,16	0,00										
Retinopatija ⁷	0,34	-0,02	0,12	0,61	0,82	-0,10	0,33	0,16									
Polineuropatija ⁸	0,45	0,04	0,15	0,59	0,75	0,04	0,18	0,24	0,78								
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ⁹	0,38	0,01	0,17	0,52	0,68	0,12	0,36	0,18	0,74	0,71							

3.17 lentelė. Tęsinys
Table 3.17. Continued

	Amžius ¹⁷	Lytis ¹	KMI ²	CD tipas ³	Ligos trukmė ⁴	HbA1C	Prasta ligos kontrolė ⁵	Šeiminis paveldėjimas ⁶	Retino patija ⁷	Polineuropatija ⁸	Autonominė širdies neuropatija ⁹	Nefropatija ¹⁰	Lėtinė inkstų liga ¹¹	GFG ¹²	PAH ¹³	Dislipidemija ¹⁴	Statinių vartojimas ¹⁵
Nefropatija ¹⁰	0,25	-0,09	0,06	0,65	0,72	0,02	0,29	0,23	0,79	0,75	0,77						
Lėtinė inkstų liga ¹¹	0,33	-0,05	0,13	0,61	0,71	0,02	0,25	0,25	0,77	0,77	0,75	0,92					
GFG ¹²	0,40	-0,13	-0,18	0,15	-0,26	0,23	-0,10	-0,05	-0,23	-0,40	-0,32	-0,23	-0,45				
PAH ¹³	0,66	0,02	0,55	0,01	0,50	0,10	0,24	0,24	0,47	0,54	0,49	0,42	0,49	-0,39			
Dislipidemija ¹⁴	0,59	0,03	0,34	0,12	0,47	0,09	0,29	0,16	0,43	0,54	0,40	0,42	0,44	-0,25	0,66		
Statinių vartojimas ¹⁵	0,48	0,03	0,31	0,01	0,34	0,18	0,17	0,20	0,30	0,40	0,26	0,29	0,32	-0,18	0,62	0,64	
Poliligtumo indeksas ¹⁶	0,66	0,01	0,46	0,27	0,63	-0,02	0,20	0,26	0,62	0,70	0,65	0,62	0,66	-0,41	0,83	0,78	0,58

Spearmano koreliacijos koeficientai, statistiškai patikimo reikšmės ($p < 0,05$) pažymėtos pastorintuoju šriftu

GFG – glomerulų filtracijos greitis; PAH – pirminė arterinė hipertenzija.

¹Gender; ²BMI – body mass index; ³Type of DM; ⁴Disease duration; ⁵poor glycemic control; ⁶Family history of diabetes; ⁷Retinopathy; ⁸Diabetic symmetric polyneuropathy; ⁹Cardiac autonomic neuropathy; ¹⁰Nephropathy; ¹¹Chronic kidney disease; ¹²GFR – glomerular filtration rate; ¹³PAH – primary arterial hypertension; ¹⁴Dyslipidemia; ¹⁵Statins; ¹⁶Multimorbidity index; ¹⁷Age.

3.2.6.1. Genetinių žymenų sąsajos su klinikiniais ir demografiniais tirtųjų asmenų rodikliais

Vertinant genetinių žymenų sąsajas su klinikiniais ir demografiniais rodikliais, naudota žingsninė daugianarė regresinė analizė, kurios pagalba atlikta nepriklausomų kintamųjų atranka visoje imtyje ir su tam tikrais kintamaisiais (SCM, HFC, MB, SCM-IND, MB-IND) atskirai CD pacientų grupėje.

Vertinant poveikį 8-OHdG koncentracijai, geriausias visai tiriamųjų imčiai modelis, pasižymintis aukščiausiu R^2 , tinkamumu ir daugybinių korelacijų koeficiento reikšmėmis (*coefficient of multiple correlation values*), apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip lėtinė inkstų liga ir PAH, (3.18 lentelė). Modelis buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,0001$) ir paaiškino apie 16 proc. 8-OHdG reikšmių variacijos tarp tirtųjų asmenų ($r^2=0,1566$)

3.18 lentelė. Visos imties 8-hidroksi-2-deoksiguanozino daugianarės regresinės analizės rezultatai naudojant reikšmingiausius kintamuosius

Table 3.18. Results of the multivariate regression analysis of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine for the entire sample using the most significant variables

Poveikis ¹	Laisvės laipsniai ^a	Kvadratų suma ^b	Vidutinė koeficiento ir klaidos kvadratų suma ^c	F reikšmė ^d	p reikšmė ^e
Nepriklausomas ²	1	6561,006	6561,006	493,2612	0,0000
narys					
LIL ³	1	85,299	85,299	6,4129	0,0130
PAH ⁴	1	87,852	87,852	6,6048	0,0118
Paklaida ⁵	91	1210,417	13,301		
Viso ⁶	93	1466,751			

LIL – lėtinė inkstų liga; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; 8-OHdG – 8-hidroksi-2-deoksiguanozinas.

¹Effect; ²Intercept; ³Chronic kidney disease; ⁴Primary arterial hypertension; ⁵Error; ⁶Total.

^aDegree of freedom; ^bSum of suares; ^cMean sum of squares; ^dF value; ^ep value.

Vertinant poveikį SCM dažniui, geriausias modelis visų tiriamųjų imčiai, apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip amžius, DSPN ir KAN, o tik CD pacientų imčiai – amžius ir metformino vartojimas (3.19 lentelė).

Vertinant poveikį HFC, geriausias modelis visai pacientų imčiai, apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip amžius, metformino

vartojimas, DSPN ir PAH, o tik CD pacientų imčiai – amžius, metformino vartojimas ir DSPN (3.20 lentelė).

Vertinant poveikį MB dažniui, geriausias modelis visai pacientų imčiai apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip amžius, lytis ir nefropatija, tik CD pacientų imčiai – amžius, lytis ir DSPN (3.21 lentelė).

Geriausias modelis vertinant poveikį SCM-IND dažniui visoje tiriamųjų imtyje apskaičiuotas, įtraukiant tokius kintamuosius kaip statinų vartojimas ir DSPN, o tik CD pacientų imtyje – amžius ir statinų vartojimas (3.22 lentelė).

Geriausias modelis vertinant poveikį MB-IND dažniui visoje tiriamųjų imtyje apskaičiuotas, įtraukiant tokius kintamuosius kaip lytis, insulino vartojimas, retinopatija ir DSPN, o tik CD pacientų imtyje – amžius ir retinopatija (3.23 lentelė).

Chromosomų aberacijų analizė dėl mažo tiriamųjų skaičiaus buvo atlikta tik bendroje imtyje (CD pacientai ir kontrolinė grupė). Kadangi chromosomų aberacijų vidurkiai nebuvo pasiskirstę pagal normalųjų skirstinį (3.2 pav. Ir 3.3 pav.), prieš atliekant daugianarę regresinę analizę, aberacijų dažnis (CTA, CSA ir bendras CA) 100-tui ląstelių buvo transformuotas naudojant formulę $Y = 0.5[(X)^{0.5} + (X+1)^{0.5}]$, kur X yra chromosomų aberacijų dažnis 100-te ląstelių ir Y yra transformuotas kintamasis. D'Agostino-Pearson testo rezultatai parodė, kad visų trijų transformuotų kintamųjų, CTA_t, CSA_t, ir CA_t, pasiskirstymas reikšmingai nesiskiria nuo normaliojo skirstinio (atitinkamai, $p = 0,6010$, $p = 0,3571$, ir $p = 0,4813$). Žingsninė daugianarė regresinė analizė buvo naudojama nepriklausomų kintamųjų atrankai. Geriausias/tinkamiausias modelis transformuotam CSA dažniui, pasižymintis aukščiausiu R^2 , tinkamumu ir daugybinių koreliacijų koeficiento reikšmėmis (angl. *coefficient of multiple correlation values*), apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip KMI, ligos stažas ir statinų vartojimas (3.24 lentelė). Šiuos kintamuosius įtraukėme į daugianarės regresinės analizės modelį skaičiuodami transformuotas CTA ir bendras CA reikšmes, nors kai kurių kintamųjų sąsajos nebuvo reikšmingos. Ligos stažas buvo statistiškai reikšmingiausias kintamasis visiems trimis transformuotiems rodikliams – CTA_t, CSA_t ir CA_t (atitinkamai, $p = 0,0042$, $p = 0,00003$, ir $p = 0,00002$), parodęs teigiamą sąsają tarp aberacijų skaičiaus ir CD stažo metų. Joks kitas rodiklis neturėjo įtakos CTA_t dažniui. Visas modelis paaiškina 11,1 % bendro CTA_t dažnio variabilumo. KMI, kitas nustatytas svarbus kintamasis, pasižymėjęs reikšminga teigiama sąsaja su CTA_t ($p = 0,0105$). Statinų vartojimui nustatyta ribinio reikšmingumo neigiama sąsaja ($p = 0,0763$). Visas modelis paaiškina 29,5 % bendro CSA_t dažnio variabilumo. Analogiškame CA_t modelyje stebėta

ta pati tendencija, tačiau nustatytas statistinis reikšmingumas ir nuo kintamųjų priklausomas dažnio variabilumo procentas (25,8%) mažesni.

Nors naudojant dvinarę analizę amžiaus kintamajam nustatyta teigiama koreliacija, pažingsninė daugianarė regresinė analizė pašalino amžių iš tolesnės analizės. Kaip minėta anksčiau, amžius koreliavo su kitais kintamaisiais, ypač su ligos trukme. Atlikus dalinę koreliacijos analizę, naudojant transformuotą CSA dažnį, nustatyta dalinė koreliacija tarp CSA_t ir ligos stažo, kuri išliko reikšminga atmetus amžiaus poveikį ($r = 0,265$, $p = 0,022$), tačiau dalinė koreliacija tarp CSA_t ir amžiaus tapo nereikšminga, atmetus ligos stažo poveikį ($r = 0,189$, $p = 0,1032$).

3.19 lentelė. Visos tiriamųjų imties ir tik CD sergančių asmenų seserinių chromatidžių mainų (SCM) dažnio dauginarės regresinės analizės rezultatai naudojant reikšmingiausius kintamuosius

Table 3.19. Results of the multivariate regression analysis of sister chromatid exchange (SCE) frequency for the entire study sample and for individuals with diabetes, using the most significant variables

Visi tiriamieji ^a				Tik CD ^b			
Kintamieji ¹	Seserinių chromatidžių mainai (SCM/last.) ^c			Kintamieji ¹	Seserinių chromatidžių mainai (SCM/last.) ^c		
	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>		Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>
Nepriklausomas narys ²	6,6651	0,3620	0,0000	Nepriklausomas narys ²	1,4444	0,2155	0,0000
Amžius ³	0,0578	0,0076	0,0000	Amžius ³	0,2062	0,0577	0,0007
DSPN ⁴	0,4782	0,1559	0,0027	Metformino vartojimas ⁶	-0,2593	0,0599	0,0001
KAN ⁵	0,2894	0,1242	0,0215				
Modelio savybės ^f							
Modelis* ⁷	$SCM = 6,665052 + 0,0577827 \ln(Amžius) + 0,478237 \ln(DSPN) + 0,289365 \ln(KAN)$			Modelis* ⁷	$SCM = 1,444404 + 0,206234 \ln(Amžius) - 0,259319 \ln(Metforminas)$		
R-kvadratas ⁸	0,4377			R-kvadratas ⁸	0,2500		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,6616			Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,5000		
Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(3,119)} = 30,8744, p = 7,6605e-15$			Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(2,65)} = 10,6638, p = 0,0001$		
Liekanų normalumas (Shapiro-Wilk test) ¹¹	$p = 0,4242$			Liekanų normalumas (Shapiro-Wilk test) ¹¹	$p = 0,1866$		

CD – cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; SCM – seserinių chromatidžių mainų dažnis.

¹Variables; ²Intercept; ³Age; ⁴Distal symmetric polyneuropathy; ⁵Cardiovascular autonomic neuropathy; ⁶Metformin; Primary arterial hypertension; ⁷Model; ⁸R square; ⁹Coefficient of multiple correlation; ¹⁰Goodness of fit; ¹¹Normality of the residuals (Shapiro-Wilk tests).

^aEntire study sample; ^bDiabetes mellitus patients; ^cSCE – sister chromatide exchange frequency; ^dRegression coefficient; ^eStandard error; ^fModel properties.

3.20 lentelė. Visos tiriamųjų imties ir tik cukriniu diabetu sergančiųjų pacientų aukšto seserinių chromatidžių mainų (SCM) dažnio ląstelių (HFC) daigianarės regresinės analizės rezultatai, naudojant reikšmingiausius kintamuosius

Table 3.20. Results of multiple regression analysis of high frequency sister chromatid exchange cells (HFC) in the entire study sample and in diabetes mellitus (DM) patients only, using the most significant variables

Visa imtis ^a				Tik CD ^b			
Kintamieji ¹	Aukšto SCM dažnio ląstelės (HFC) ^c			Kintamieji ¹	Aukšto SCM dažnio ląstelės (HFC) ^c		
	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>		Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>
Nepriklausomas narys ²	0,3701	0,0296	0,0000	Nepriklausomas narys ²	0,1641	0,0639	0,0127
Amžius ³	0,0039	0,0006	0,0000	Amžius ³	0,0033	0,0012	0,0053
Metformino vartojimas ⁴	-0,0395	0,0174	0,0251	DSPN ⁵	0,0708	0,0034	0,0423
DSPN ⁵	0,0557	0,0176	0,0019	Metformino vartojimas ⁴	-0,1297	0,0035	0,0005
PAH ⁶	0,0480	0,0236	0,0444				
Modelio savybės ^f							
Modelis* ⁷	$HFC = 0,370993 + 0,00386752 \ln(Amžius) - 0,0394965 \ln(Metforminas) + 0,0556625 \ln(DSPN) + 0,0479609 \ln(PAH)$			Modelis* ⁷	$HFC = 0,164102 + 0,00333795 \ln(Amžius) + 0,0707772 \ln(DSPN) - 0,129702 \ln(Metforminas)$		
R-kvadratas ⁸	0,3777			R-kvadratas ⁸	0,2901		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,6146			Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,5386		
Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(4,118)} = 17,9057, p = 0,0000$			Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(3,63)} = 8,5807, p = 0,0001$		
Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹¹	$p = 0,0039$			Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹¹	$p = 0,0793$		

CD – cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; HFC – aukšto seserinių chromatidžių mainų dažnio ląstelės; PAH – pirminė arterinė hipertenzija.

¹Variables; ²Intercept; ³Age; ⁴Metformin; ⁵Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy; ⁶Primary arterial hypertension; ⁷Model; ⁸R square; ⁹Coefficient of multiple correlation; ¹⁰Goodness of fit; ¹¹Normality of the residuals (Shapiro–Wilk tests).

^aEntire study sample; ^bDiabetes mellitus patients; ^cHFC – high frequency sister chromatid exchange cells; ^dRegression coefficient; ^eStandard error; ^fModel properties.

3.21 lentelė. Visos tiriamųjų imties ir tik cukriniu diabetu (CD) sergančių asmenų mikrobranduolių dažnio (MB) daugianarės regresinės analizės rezultatai, naudojant reikšmingiausius kintamuosius

Table 3.21. Results of multiple regression analysis of micronuclei frequency (MN) in the entire study sample and in diabetes mellitus (DM) patients only, using the most significant variables

Visa imtis ^a				Tik CD ^b			
Kintamieji ¹	Mikrobranduolių dažnis (MB ‰) ^c			Kintamieji ¹	Mikrobranduolių dažnis (MB ‰) ^c		
	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>		Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>
Nepriklausomas narys ²	-1,082228	0,3563	0,0030	Nepriklausomas narys ²	0,9145	0,2525	0,0005
Amžius ³	0,518834	0,1000	0,0000	Amžius ³	0,0091	0,0031	0,0041
Lytis ⁴	0,517632	0,1075	0,0000	Lytis ⁴	0,3531	0,0955	0,0004
Nefropatija ⁵	0,152307	0,1038	0,1454	DSPN ¹¹	0,2204	0,1093	0,0473
Modelio savybės ^f							
Modelis* ⁶	$MB^c = -1,082228 + 0,518834 \text{ Ln}(\text{Amžius}^3) + 0,517632 \text{ Ln}(\text{Lytis}^4) + 0,152307 \text{ Ln}(\text{Nefropatija}^5)$			Modelis* ⁶	$MB^c = 0,914501 + 0,00905861 (\text{Amžius}^3) + 0,353147 (\text{Lytis}^4) + 0,220405 (\text{DSPN}^{11})$		
R-kvadratas ⁷	0,3870			R-kvadratas ⁷	0,3710		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁸	0,6220			Dauginės koreliacijos koeficientas ⁸	0,6091		
Suderinamumo matas ⁹	$F_{(3,107)} = 22,5152, p = 0,0000$			Suderinamumo matas ⁹	$F_{(3,77)} = 15,1389, p = 0,0000$		
Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹⁰	$p = 0,2574$			Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹⁰	$p = 0,7729$		

CD – cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; MB – mikrobranduolių dažnis.

¹Variables; ²Intercept; ³Age; ⁴Gender; ⁵Nephropathy; ⁶Model; ⁷R square; ⁸Coefficient of multiple correlation; ⁹Goodness of fit; ¹⁰Normality of the residuals (Shapiro–Wilk tests); ¹¹Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy.

^aEntire study sample; ^bDiabetes mellitus patients; ^cMN – micronucleus frequency; ^dRegression coefficient; ^eStandard error; ^fModel properties.

3.22 lentelė. Visos tiriamųjų imties ir tik cukriniu diabetu sergančiųjų pacientų mutageno indukuotų seserinių chromatidžių mainų (SCM-IND) daigianarės regresinės analizės rezultatai naudojant reikšmingiausius kintamuosius.

Table 3.22. Results of multiple regression analysis of mutagen-induced sister chromatid exchange frequency (SCE-IND) in the entire study sample and in diabetes mellitus (DM) patients only, using the most significant variables.

Visa imtis ^a				Tik CD ^b			
Kintamieji ¹	Mutagenu indukuoti seserinių chromatidžių mainai (SCM-IND) ^c			Kintamieji ¹	Mutagenu indukuoti seserinių chromatidžių mainai (SCM-IND) ^c		
	Regression Coefficient ^d	Standard Error ^e	<i>p</i>		Regression Coefficient ^d	Standard Error ^e	<i>p</i>
Nepriklausomas narys ²	4,2701	0,6268	0,0000	Nepriklausomas narys ²	4,3556	0,8693	0,0000
Statinų vartojimas ³	-1,0404	0,4243	0,0157	Amžius ¹⁰	0,0507	0,0154	0,0017
DSPN ⁴	0,8118	0,2856	0,0053	Statinų vartojimas ³	-1,5378	0,4997	0,0031
Modelio savybės ^f							
Modelis ^{5*}	$SCM_IND = 4,270153 + 0,81177 Ln(DSPN^4) - 1,040377 Ln(Statinai^3)$			Modelis ^{5*}	$SCM_IND = 4,355649 + 0,0506722 Ln(Amžius^{10}) - 1,537773 Ln(Statinai^3)$		
R-kvadratas ⁶	0,0766			R-kvadratas ⁶	0,1861		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁷	0,2768			Dauginės koreliacijos koeficientas ⁷	0,4314		
Suderinamumo matas ⁸	$F_{(2,120)} = 4,9800, p = 0,0084$			Suderinamumo matas ⁸	$F_{(2,64)} = 7,3178, p = 0,0014$		
Liekantų normalumas (Shapiro–Wilk test) ⁹	$p = 0,0167$			Liekantų normalumas (Shapiro–Wilk test) ⁹	$p = 0,5755$		

CD – cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; SCM-IND – mutagenu indukuotų seserinių chromatidžių mainų dažnis.

¹Variables; ²Intercept; ³Statins; ⁴Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy; ⁵Model; ⁶R square; ⁷Coefficient of multiple correlation; ⁸Goodness of fit;

⁹Normality of the residuals (Shapiro-Wilk tests); ¹⁰Age.

^aEntire study sample; ^bDiabetes mellitus patients; ^cSCE-IND – mutagen induced sister chromatid exchange frequency; ^dRegression coefficient; ^eStandard error;

^fModel properties.

3.23 lentelė. Visos tiriamųjų imties ir tik cukriniu diabetu sergančių (CD) asmenų mutageno indukuoto mikrobranduolių dažnio (MB-IND) daigianarės regresinės analizės rezultatai, naudojant reikšmingiausius kintamuosius

Table 3.23. Results of multiple regression analysis of mutagen-induced micronuclei frequency (MN-IND) in the entire study sample and in diabetes mellitus (DM) patients only, using the most significant variables

Visi tirti asmenys ^a				Tik CD ^b			
Kintamieji ¹	Mutagenu indukuotas mikrobranduolių dažnis (MB-IND) ^c			Kintamieji ¹	Mutagenu indukuotas mikrobranduolių dažnis (MB-IND) ^c		
	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>		Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	<i>p</i>
Nepriklausomas narys ²	0,1500	0,5187	0,7729	Nepriklausomas narys ²	0,4183	0,2669	0,1211
Lytis ³	0,6460	0,2412	0,0086	Amžius ¹²	0,0064	0,0031	0,0423
Insulino vartojimas ⁴	-0,8606	0,2676	0,0017	Retinopatija ⁵	0,2984	0,1058	0,0061
Retinopatija ⁵	0,8529	0,3144	0,0078				
DSPN ⁶	0,6536	0,3240	0,0462				
Modelio savybės ^f							
Modelis ^{7*}	$MB-IND^c = 0,150042 + 0,646034 \ln(Lytis) - 0,860551 \ln(Insulinas^4) + 0,852785 \ln(Retinopatija^5) + 0,65362 \ln(DSPN^6)$			Modelis ^{7*}	$MB-IND^c = 0,418296 + 0,00641169 (Amžius^{12}) + 0,298355 (Retinopatija^5)$		
R-kvadratas ⁸	0,2221			R-kvadratas ⁸	0,1693		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,4713			Dauginės koreliacijos koeficientas ⁹	0,4115		
Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(4,106)} = 7,5669, p = 0,0000$			Suderinamumo matas ¹⁰	$F_{(2,78)} = 7,9503, p = 0,0007$		
Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹¹	$p = 0,2499$			Liekanų normalumas (Shapiro–Wilk test) ¹¹	$p = 0,3117$		

CD – cukrinis diabetas; DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; MB-IND – mutagenu indukuotų mikrobranduolių mainų dažnis.

¹Variables; ²Intercept; ³Gender; ⁴Insulin; ⁵Retinopathy; ⁶Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy; ⁷Model; ⁸R square; ⁹Coefficient of multiple correlation;

¹⁰Goodness of fit; ¹¹Normality of the residuals (Shapiro-Wilk tests); ¹²Age.

^aEntire study sample; ^bDiabetes mellitus patients; ^cMN-IND – mutagen induced micronucleus frequency; Total aberrations; ^dRegression coefficient; ^eStandard error; ^fModel properties.

3.24 lentelė. Transformuoto chromosomų aberacijų dažnio/100 ląstelių daigianarės regresinės analizės rezultatai, naudojant reikšmingiausius kintamuosius – kūno masės indeksą (KMI), ligos stažą ir statinų vartojimą

Table 3.24. Results of multiple regression of transformed frequency of chromosome aberrations per 100 cells on the most significant variables – duration of disease, body mass index (BMI), and use of statins

Kintamieji ¹	Chromatidinio tipo aberacijos (CTA) ^a			Chromosominio tipo aberacijos (CSA) ^b			Bendras aberacijų dažnis (CA) ^c		
	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	P	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	P	Regresijos koeficientas ^d	Standartinė paklaida ^e	P
Nepriklausomas kintamasis ²	1,7372	0,5614	0,0028	-1,8857	0,5963	0,0023	0,7105	0,5762	0,2216
KMI ³	-0,0882	0,1723	0,6104	0,4810	0,1831	0,0105	0,2608	0,1769	0,1448
Ligos stažas ⁴	0,1654	0,0560	0,0042	0,26348	0,0595	0,00003	0,2609	0,0575	0,00002
Statinų vartojimas ⁵	-0,1947	0,1372	0,1604	-0,26218	0,145782	0,0763	-0,2421	0,1409	0,0899
Modelio savybės ^f									
Modelis ^{6*}	$CTA_t = 1,737191 - 0,0882006 \ln(KMI^3) + 0,165427 \ln(\text{ligos stažas}^4) - 0,19466 \ln(\text{statinų vartojimas}^5)$			$CSA_t = 0,15173 \times (KMI^3)^{0,480953} \times (\text{ligos stažas}^4)^{0,26338} \times (\text{statinų vartojimas}^5)^{-0,26218}$			$CA_t = 0,710502 + 0,260791 \ln(KMI^3) + 0,260852 \ln(\text{ligos stažas}^4) - 0,24212 \ln(\text{statinų vartojimas}^5)$		
R-kvadratas ⁷	0,1106			0,2950			0,2576		
Dauginės koreliacijos koeficientas ⁸	0,3326			0,5432			0,5076		
Suderinamumo matas ⁹	$F_{(3,72)} = 2,9855, p = 0,0367$			$F_{(3,72)} = 10,0445, p = 0,00001$			$F_{(3,72)} = 8,3290, p = 0,00008$		
Liekanų normalumas (Shapiro-Wilk testas) ¹⁰	p=0,4076			p=0,1005			p=0,6373		

* Kūno masės indeksas (KMI) yra tolydusis kintamasis išreikštas kg/m²; ligos stažas yra nepriklausomas kintamasis, kur 1 = diabeto nėra, 2 = naujai diagnozuotas, 3 = trukmė <5 metai, 4 = trukmė >5–10 metų, 5 = trukmė >10–15 metų, 6 = trukmė >15–20 metų, 7 = trukmė >20–25 metai, 8 = trukmė >25 metai; statinų vartojimas yra nepriklausomas kintamasis, kur 1 = statinų nevartoja ir 2 = statinus vartoja; CTA_t, CSA_t ir CA_t yra transformuoti ($Y = 0.5[(X)0.5 + (X+1)0.5]$) atitinkamai, chromatidinio tipo, chromosominio tipo ir bendrai aberacijų dažniai 100-tui ląstelių.

¹Variables; ²Intercept; ³BMI – body mass index; ⁴Disease duration; ⁵Statins; ⁶Model; ⁷R square; ⁸Coefficient of multiple correlation; ⁹Goodness of fit;

¹⁰Normality of the residuals (Shapiro-Wilk tests);

^aChromatid-type aberrations; ^bChromosome-type aberrations; ^cTotal aberrations; ^dRegression coefficient; ^eStandard error; ^fModel properties.

3.2.6.2. Diabeto komplikacijų sąsajos su klinikiniais rodikliais ir genetiniais žymenimis

CD pacientų grupėje vertinant diabeto komplikacijų sąsajas su klinikiniais rodikliais ir genetiniais žymenimis, naudota logistinė regresinė analizė, kurios pagalba atlikta nepriklausomų kintamųjų atranka.

Vertinant poveikį polineuropatijai, geriausias modelis apskaičiuotas įtraukiant tokius kintamuosius kaip CD trukmė ($\beta = 0,115$, $p = 0,002$), HbA1c ($\beta = 0,329$, $p = 0,078$), dislipidemija ($\beta = 2,451$, $p = 0,009$) ir MB-IND ($\beta = 0,507$; $p = 0,022$); autonominei širdies neuropatijai – bloga CD kontrolė ($\beta = 1,322$, $p = 0,039$), PAH ($\beta = 1,364$, $p = 0,029$) ir SCM-IND ($\beta = 0,282$, $p = 0,079$); retinopatijai – CD trukmė ($\beta = 0,111$, $p = 0,002$), bloga CD kontrolė ($\beta = 3,310$; $p = 0,002$) ir MB-IND ($\beta = 0,750$, $p = 0,009$); nefropatijai – lėtinė inkstų liga ($\beta = 4,318$, $p = 0,000$) (3.25 lentelė).

3.25 Lentelė. Diabeto komplikacijų sąsajos su klinikiniais rodikliais ir genetiniais žymenimis cukriniu diabetu sergančių pacientų grupėje, apskaičiuota naudojant logistinę regresinę analizę

3.25 Table. Association of diabetes complications with clinical indicators and genetic markers in a cohort of diabetic patients, calculated using logistic regression analysis

	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	p	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
Polineuropatija ¹	Konstanta ⁵	-11,1778	3,3385	0,0008		
	CD trukmė ⁶	0,1145	0,0364	0,0016	1,1213	(1,0442, 1,2042)
	HbA1c	0,3286	0,1863	0,0778	1,3890	(0,9641, 2,0013)
	Dislipidemija ⁷	2,4513	0,9389	0,0090	11,6029	(1,8425, 73,0683)
	MB-IND ⁸	0,5071	0,2213	0,0219	1,6604	(1,0762, 2,5618)
	Chi-kvadratas ⁹	29,0596, df – 4, p – 0,0000				
	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	p	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
Autonominė širdies neuropatija ²	Konstanta ⁵	-3,4265	1,0811	0,0015		
	Bloga kontrolė ¹⁰	1,3215	0,6395	0,0388	3,7489	(1,0704, 13,1302)
	PAH ¹¹	1,3641	0,6226	0,0285	3,9124	(1,1547, 13,2563)
	SCM-IND ¹²	0,2815	0,1601	0,0787	1,3251	(0,9682, 1,8135)
	Chi-kvadratas ⁹	15,2053, df – 3, p – 0,0016				
	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	p	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
Retinopatija ³	Konstanta ⁵	-6,3450	1,6523	0,0001		
	CD trukmė ⁶	0,1107	0,0354	0,0018	1,1171	(1,0422, 1,1973)
	Bloga kontrolė ¹⁰	3,3095	1,0573	0,0017	27,3715	(3,4458, 217,4241)
	MB-IND ⁸	0,7500	0,2889	0,0094	2,1169	(1,2017, 3,7293)
	Chi-kvadratas ⁹	36,4303, df – 3, p – 0,0000				

3.25 Lentelė. Tęsinys

3.25 Table. Continued

Nefropatija ⁴	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	<i>p</i>	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
	Konstanta ⁵	–2,5257	0,5196	0,0000		
	Lėtinė inkstų liga ¹³	4,3175	0,9238	0,0000	75,0000	(12,2675, 458,5298)
	Chi-kvadratas ⁹	34,2000, df – 1, p – 0,0000				

CD – cukrinis diabetas; HbA1c – glikozilintas hemoglobinas; MB-IND – mutagenu indukuotų mikrobranduolių dažnis; PAH – pirminė arterinė hipertenzija; SCM-IND – mutagenu indukuotų seserinių chromatidžių mainų dažnis.

¹Diabetic sensorimotor peripheral neuropathy; ²Cardiac autonomic neuropathy; ³Retinopathy; ⁴Nephropathy; ⁵Constant; ⁶Diabetes duration; ⁷Dyslipidemia;

⁸MN-IND – mutagen induced micronuclei; ⁹Chi-Square; ¹⁰Poor glycemic control; ¹¹Primary arterial hypertension; ¹²SCE – sister chromatid exchange; ¹³CKD – chronic kidney disease;

^aVariables; ^b β coefficient; ^cStandard error; ^dOdds ratio; ^e95% Confidence interval.

3.2.7. MiRNR tyrimų rezultatai

Dėl didelio nesutapimo tarp pacientų, kuriems buvo tirti citogenetiniai rodikliai, 8-OHdG ir miRNR, miRNR analizė daryta atskirai. MiRNR ištirtos 99 asmenims – 40 CD1, 38 CD2 pacientams ir 21 kontroliniam asmeniui. Šioje dalyje ištirtų pacientų klinikiniai ir biocheminiai duomenys pateikti 3.26 lentelėje.

3.26 lentelė. Cukrinio diabeto pacientų ir kontrolinės grupės tiriamųjų klinikiniai, biocheminiai ir demografiniai rodikliai

Table 3.26. Clinical, biochemical, and demographic characteristics of patients with diabetes and the control group

Rodikliai ¹		CD1 ^a , N = 40	CD2 ^b , N = 38	Kontrolinė grupė ^c , N = 21
Lytis ²	Moteris ³ , N	15	11	13
	Vyras ⁴ , N	25	17	8
Amžius ⁵ (metais ⁶), vidurkis ⁷ , reikšmių intervalas ⁸		39 20-70	61 34-81	37 23-70
Diabeto trukmė ⁹ (metais ⁶), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		16 0-43	12 0-42	–
Blogos glikemijos kontrolės trukmė ¹⁰ (metais ⁶), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		3 0-11	3 0-8	–
Glikemijos kontrolė ¹¹	Gera ¹² , N	11	8	–
	Bloga ¹³ , N	29	29	–
Sistolinis kraujospūdis ¹⁴ (mmHG), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		123 80-159	137 107-178	121 100-128
Diastolinis kraujospūdis ¹⁵ (mmHG), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		75 50-90	81 59-95	78 65-96
HbA1c (%), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		9,3 5,6-16,3	9,1 5,8-15	–
Nežinoma ¹⁸ , N		5	5	–
Kreatinino konc. ¹⁹ (μmol/l), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸		79 40-379	78 41-240	–
Nežinoma ¹⁸ , N		1	–	–

3.26 lentelė. Tęsinys
Table 3.26. Continued

Rodikliai1	CD1a, N = 40	CD2b, N = 38	Kontrolinė grupėc, N = 21
GFG ²⁰ (ml/min./1,73 m2), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸	97 26-146	86 25-129	–
Nežinoma ¹⁸ , N	2	–	–
KMI ²¹ (kg/m2), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸	24 18-34	34 25-45	26 18-34
Liemens apimtis ²² (cm), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸	94 62-109	95 81-140	93 66-111
Klubų apimtis ²³ (cm), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸	103 64-123	104 98-140	105 87-126
Kaklo apimtis ²⁴ (cm), vidurkis ⁷ , intervalas ⁸	36 31-48	36 32-48	35 29-44
Ketoacidozė ²⁵ , N	8 / 32	1 / 37	–
Lėtinė inkstų liga ²⁶ , N	5 / 35	8 / 31	–
Nefropatija ²⁷ , N	8 / 32	7 / 31	–
Pirminė arterinė hipertenzija ²⁸ , N	15 / 25	36 / 2	–
Išeminė širdies liga ²⁹ , N	3 / 37	12 / 26	–
Širdies nepakankamumas ³⁰ , N	2 / 38	10 / 38	–
Polineuropatija ³¹ , N	12 / 28	13 / 25	–
Kardiovaskulinė autonominė neuropatija ³² , N	11 / 28	19 / 18	–
Retinopatija ³³ , N	20 / 7	14 / 10	–

CD1 – 1 tipo cukrinis diabetas, CD2 – 2 tipo cukrinis diabetas, HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, GFG – glomerulų filtracijos greitis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai.

¹Indicator; ²Gender; ³Female; ⁴Male; ⁵Age; ⁶Years; ⁷Mean; ⁸Range; ⁹Diabetes duration; ¹⁰Duration of poor glycemic control; ¹¹Glycemic control; ¹²Good; ¹³Poor; ¹⁴Systolic blood pressure; ¹⁵Diastolic blood pressure; ¹⁶Pulse; ¹⁷Beats per minute; ¹⁸No data; ¹⁹Creatinine concentration; ²⁰Glomerular filtration rate; ²¹BMI – body mass index; ²²Waist circumference; ²³Hip circumference; ²⁴Neck circumference; ²⁵Ketoacidosis; ²⁶Chronic kidney disease; ²⁷Nephropathy; ²⁸Primary arterial hypertension; ²⁹Ischemic heart disease; ³⁰Heart failure; ³¹Distal symmetric polyneuropathy; ³²Cardiovascular autonomic neuropathy; ³³Retinopathy.

^aT1DM – type 1 diabetes; ^bT2DM – type 2 diabetes; ^cControl.

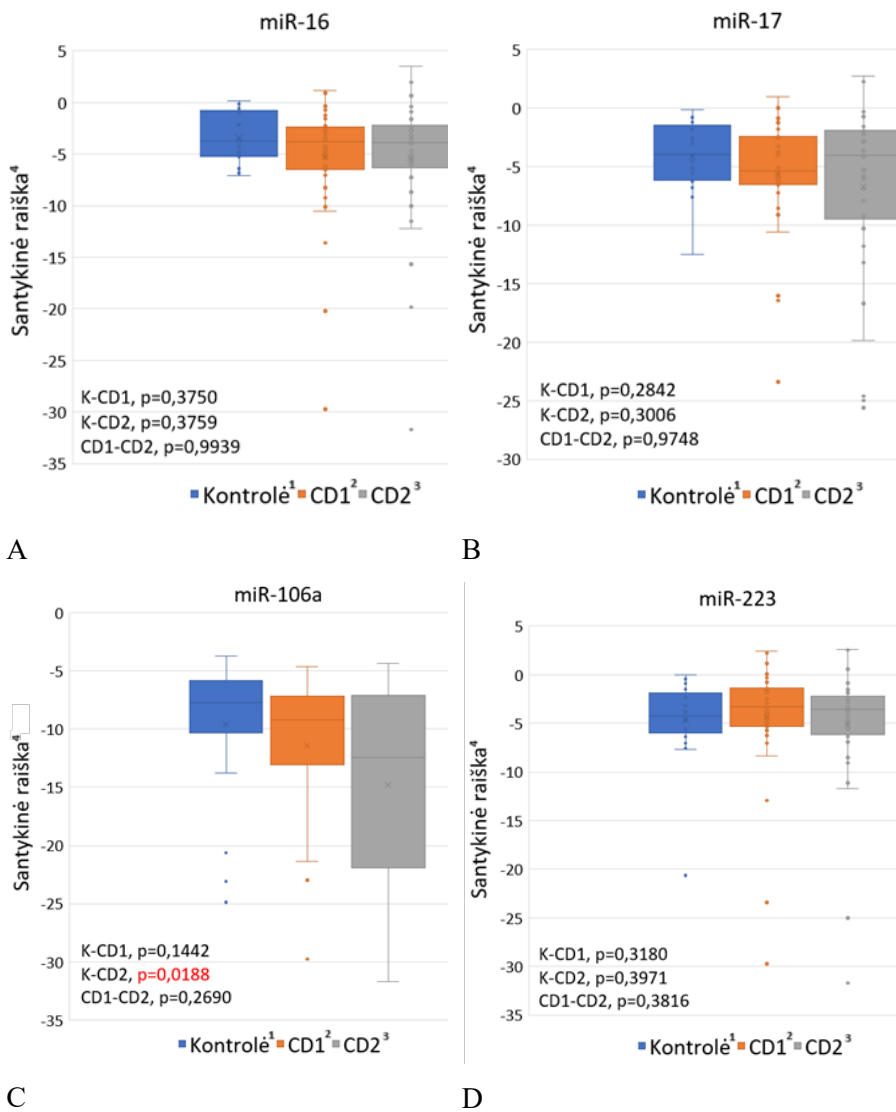
Visiems tiriamiesiems ištirta keturių miRNR raiška leukocituose – miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p ir miR-223-3p. Duomenų statistinė analizė, atlikta naudojant Kruskal-Wallis ir Dunn daugybinių palyginimų testus, neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp analizuotų grupių, išskyrus miR-106a, kurios raiška buvo statistiškai patikimai ($p = 0,0188$) sumažėjusi CD2 pacientų leukocituose, lyginant su kontroline grupe (3.10 pav.).

Sąsajos tarp miRNR raiškos pokyčių ir CD1 pacientų demografinių, klinikinių, biocheminių ir antropometrinių rodiklių buvo tirtos panaudojant koreliacinę analizę. Ilgėjant blogos glikemijos kontrolės trukmei, mažėjo miR-16 raiška ($r = -0,42$, $p = 0,0116$). Didėjant liemens apimčiai, mažėjo miR-17 ($r = -0,32$, $p = 0,0451$), miR-106a ($r = -0,38$, $p = 0,0179$) ir miR-223 ($r = -0,44$, $p = 0,0048$). Didėjant pacientų klubų apimčiai, mažėjo miR-17 raiška ($r = -0,35$, $p = 0,0325$). Taip pat buvo nustatyta miR-106a raiškos neigiama koreliacija su pacientų amžiumi ($r = -0,32$, $p = 0,0384$). Tačiau atliekant tokio pobūdžio analizę visa laiką reikia atsižvelgti į galimų klaidingai teigiamų rezultatų tikimybę, atsirandančią dėl daugybinių palyginimų. Mūsų atveju net pačiai stipriausiai koreliacijai tarp miR-223 raiškos ir pacientų liemens apimtys ($r = -0,44$, $p = 0,0048$) klaidingai teigiamo rezultato tikimybė (*false discovery rate*, FDR) yra 25 proc., kitoms nustatytoms koreliacijoms ji yra dar didesnė. Todėl tikėtina, kad visos šios anksčiau išvardytos sąsajos yra atsitiktinės ir neatspindi realios situacijos.

Taip pat nenustatytas ryšys tarp miRNR raiškos pokyčių ir CD1 pacientų mikrovaskulinių komplikacijų bei kitų lydinčių ligų.

Analogiška analizė CD2 pacientų grupėje arba neparodė ryšio tarp miRNR raiškos ir pacientų demografinių, klinikinių, biocheminių bei antropometrinių rodiklių, arba tokios analizės nebuvo įmanoma atlikti dėl labai mažo pacientų skaičiaus (≤ 5) kai kurios lyginamose kategorijose.

Aukščiau aprašyti miRNR raiškos tyrimai tarp grupių parodė, kad bent vienos miRNR, miR-106a, raiška yra sumažėjusi CD2 pacientų grupėje, lyginant su kontrole. Tačiau jau anksčiau buvo aprašyta, kad demografiniai ir antropometriniai rodikliai tarp kontrolinės grupės ir CD2 pacientų skiriasi – antrojo tipo diabetu sergantys asmenys buvo vyresni ir pasižymėjo didesne kūno mase. Todėl toliau buvo panaudota logistinė (logit) regresija, siekiant išsiaiškinti, ar miRNR raiška galėtų būti žymuo, leidžiantis atskirti kontrolinius ir diabetu sergančius asmenis. Į logistinės regresijos modelius buvo įtraukti ir tokie rodikliai, kaip tiriamųjų amžius ir kūno masės indeksas. Tyrimo rezultatai parodyti 3.27 lentelėje.



3.10 pav. MiRNR raiškos palyginimas pirmo (CD1) ir antro (CD2) tipo cukriniu diabetu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės leukocituose. A–D – atitinkamai miR-16, miR-17, miR-106a ir miR-223. Santykinė miRNR raiška pateikta log₂ skalėje

Figure 3.10. Comparison of miRNA expression in leukocytes of patients with type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes, and the control group. A–D represent miR-16, miR-17, miR-106a, and miR-223, respectively. Relative miRNA expression is presented on a log₂ scale

¹Control; ²T1DM – type 1 diabetes; ³T2DM – type 2 diabetes; ⁴Relative expression.

3.27 Lentelė. CD1 ir CD2 demografiniai, antropometriniai ir miRNR žymenys, atrinkti naudojant logistinę regresinę analizę
 Table 3.27. Demographic, anthropometric and miRNA markers of patients with type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes selected using logistic regression analysis

	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	p	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
Kontrolė¹ vs CD1²	Konstanta ⁴	2,7417	1,8405	0,1363	15,5133	-
	KMI ⁵	-0,1005	0,0721	0,1634	0,9044	(0,7852, 1,0417)
	miR-16	-0,2619	0,1296	0,0433	0,7696	(0,59695, 0,99215)
	miR-223	0,1581	0,0901	0,0791	1,1713	(0,98167, 1,3975)
	Chi-kvadratas ⁶	8,11, df – 3, $p = 0,0439$				
	Kintamieji ^a	Koeficientas ^b , β	Standartinė paklaida ^c	p	Šansų santykis ^d	95% pasikliautinis intervalas ^e
Kontrolė vs CD2³	Konstanta ⁴	-12,9072	3,6794	0,0005	0,0000025	-
	KMI ⁵	0,2443	0,1151	0,0338	1,2767	(1,0189, 1,5998)
	Amžius ⁷	0,112	0,0394	0,0044	1,1190	(1,035, 1,208)
	miR-106a	-0,0579	0,0581	0,3187	0,9437	(0,84217, 1,0576)
	Chi-kvadratas ⁶	45,28, df – 3, $p < 0,0001$				

¹Control; ²T1DM – type 1 diabetes; ³T2DM – type 2 diabetes; ⁴Constant; ⁵BMI – body mass index; ⁶Chi-square; ⁷Age; ^aVariables; ^b β coefficient;

^cStandard error; ^dOdds ratio; ^e95% Confidence interval.

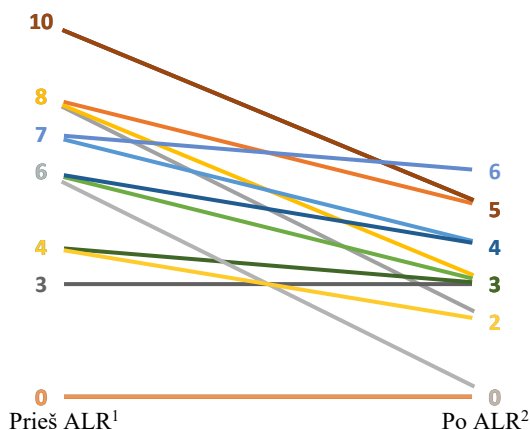
Patikimesnis modelis buvo gautas CD2 atveju, tačiau įdomu tai, kad miR-106a nepasirodė esąs antrojo tipo diabeto prediktorius ($p = 0,3187$), nepaisant to, kad anksčiau buvo aptikta sumažėjusi šios miRNR raiška CD2 pacientų leukocituose. Šiame modelyje svarbiausi rizikos veiksniai buvo vyresnis amžius ir padidėjusi kūno masė.

Nors lyginant miRNR raišką tarp kontrolinės grupės asmenų ir CD1 pacientų nebuvo nustatyti jokie statistiškai patikimi skirtumai, į geriausią logistinės regresijos modelį pateko net dvi miRNR, miR-16 ir miR-223, tačiau jų predikcinė vertė, kaip ir paties modelio, yra gana nedidelė.

3.3. Gydomo α -lipoine rūgštimi įtaka klinikiniais rodikliams, genetiniais ir epigenetiniams žymenims

Šešiolika pacientų (CD1 – 6 pacientai ir CD2 – 10 pacientų) gydyti ALR 600 mg $\times$ 1 k/d infuzijomis nuo 4 iki 9 dienų. Kraujo mėginiai buvo paimti ryte prieš pradedant gydymą ir kelios valandos po paskutinės infuzijos. 8-OHdG koncentracija ištirta 14-kai CD pacientų prieš ALR gydymą, 9-iems CD pacientams po ALR gydymo ir 14-kai kontrolinių asmenų. MB buvo ištirti 14-kai, o SCM visiems 16-kai CD pacientų prieš ir po gydymo ALR. Tiriamiesiems atlikti tyrimai, demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų rodikliai pateikti 12 priede (CD pacientai) ir 13 priede (kontroliniai asmenys)

Skausmo stiprumo rezultatai prieš ir po gydymo ALR pateikti pav. 3.11. Trys pacientai iki gydymo ALR skausmo nejuto (skausmo stiprumo vertinimas – 0), todėl šiems pacientams skausmo stiprumas po gydymo nepasikeitė. Vienam pacientui skausmo stiprumas iki gydymo ALR siekė 3 balus ir po gydymo nepasikeitė. Visiems likusiems 12-kai pacientų skausmo stiprumas po gydymo ALR sumažėjo: kai kuriems iš jų – gana ženkliai, pvz., nuo 10 iki 5, nuo 8 iki 2 arba nuo 6 iki 0 balų, o kitiems – vidutiniškai, pvz., nuo 7 iki 6 arba nuo 4 iki 2 balų. Bendrai visoje imtyje skausmo stiprumas buvo reikšmingai mažesnis po gydymo ALR, palyginus su skausmo stiprumu iki gydymo ($p = 0,0024$, Wilcoxon Signed Rank testas).



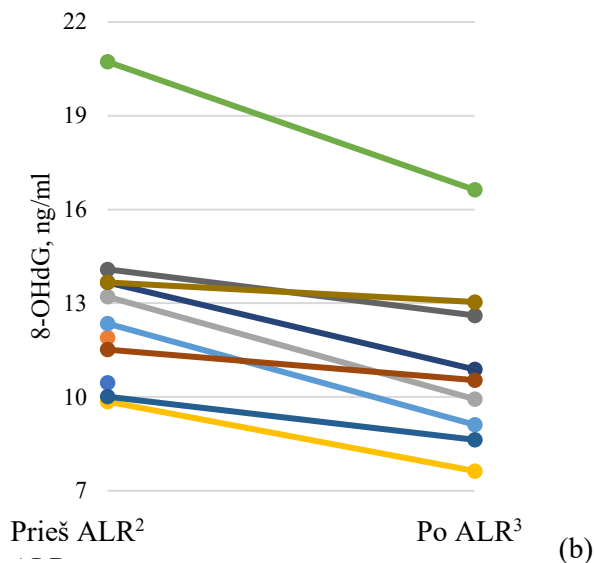
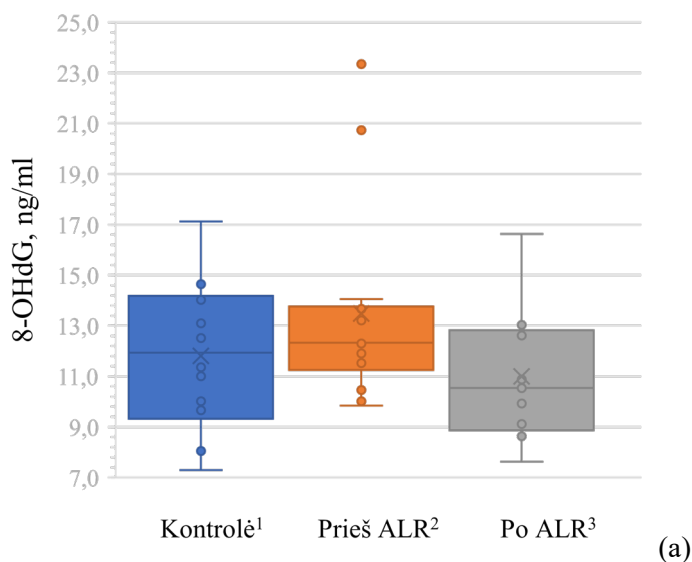
3.11 pav. Šešiolicos pacientų skausmo stiprumo pokyčiai balais po gydymo α -lipoinės r. (ALR) infuzijomis, 600 mg kasdien 4–9 dienas. Trys pacientai skausmo stiprumą iki ir po gydymo ALR įvertino nuliui, du pacientai nurodė 10 balų skausmo stiprumą iki gydymo ir 5 balus po gydymo.

Figure 3.11. Changes in pain intensity in sixteen patients after treatment with α -lipoic acid (ALA), 600 mg daily for 4–9 days. Three patients rated their pain intensity as zero both before and after treatment with ALA, while two patients reported a pain intensity of 10 before treatment and 5 after treatment.

¹Before treatment with α -lipoic acid; ²After treatment with α -lipoic acid.

CD pacientams prieš gydymą ALR nustatyta kiek aukštesnė plazmos 8-OHdG koncentracija, palyginus su kontroline grupe, daugiausiai dėl dviejų išskirčių (pav. 3.12a). Po gydymo ALR 8-OHdG koncentracija reikšmingai sumažėjo (pav. 3.12b; $p = 0,0039$, Wilcoxon Signed Rank testas). Pažymėtina, kad 8-OHdG koncentracija po gydymo ALR sumažėjo visiems 9 pacientams, kuriems 8-OHdG koncentracija buvo tirta.

SCM ir MB analizės rezultatai pavaizduoti pav. 3.13. CD pacientams, palyginus su kontroline grupe, nustatytas aukštesnis SCM dažnis ($p = 0,0075$, Manno ir Whitney U testas), tačiau MB dažnis reikšmingai tarp grupių nesiskyrė ($p = 0,5$). Nustatyta reikšminga teigiama SCM koreliacija su skausmo stiprumu (Spearmano rango koreliacijos koeficientas $r_s = 0,65$, $p = 0,006$). Po gydymo ALR statistškai reikšmingų citogenetinių pokyčių (SCM ir MB) nenustatyta.

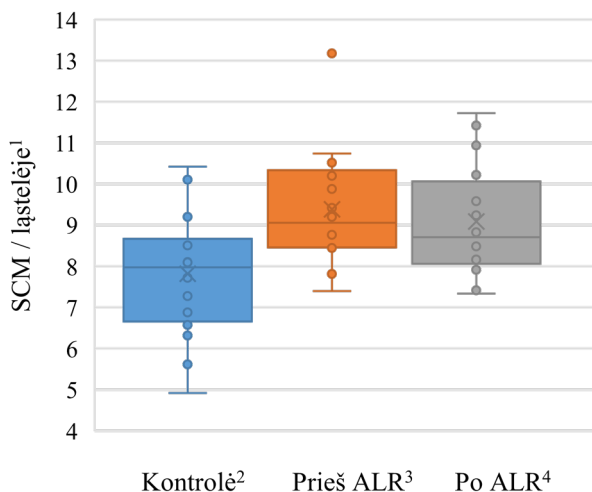


3.12 pav. Cukrinio diabeto ir gydymo α -lipoinės rūgšties (ALR) infuzijomis poveikis į kraujo plazmos 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino (8-OHdG) koncentraciją. (a) Stačiakampėse diagramose pavaizduota 8-OHdG kraujo koncentracija kontrolinėje grupėje, CD pacientų grupėje prieš gydymą ALR ir CD pacientų grupėje po gydymo ALR; (b) 8-OHdG kraujo plazmos koncentracijos pokyčiai 9 CD pacientams, kuriems 8-OHdG koncentracija tirta prieš ir po gydymo ALR.

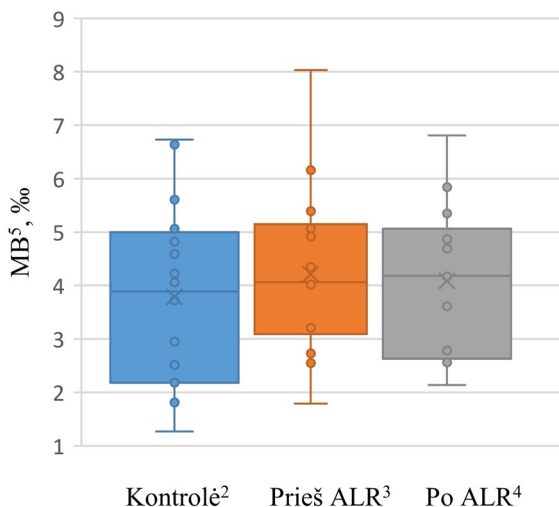
Figure 3.12. The effect of diabetes and treatment with α -lipoic acid (ALA) on plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentration. (a) Bar charts

illustrating 8-OHdG blood concentration in the control group, in the group of patients with diabetes before treatment with ALA, and in the group of patients with diabetes after treatment with ALA; (b) Changes in plasma 8-OHdG concentration in 9 patients with diabetes, for whom 8-OHdG concentration was measured before and after treatment with ALA.

¹Control; ²Before treatment with α -lipoic acid; ³After treatment with α -lipoic acid.



(a)



(b)

3.13 pav. Cukrinio diabeto ir gydymo α -lipoinės rūgšties (ALR) infuzijomis poveikis į citogenetinius DNR pažeidų žymenis. (a) Stačiakampėse

diagramose pavaizduotas SCM dažnis kontrolinėje grupėje, CD pacientų grupėje prieš gydymą ALR ir CD pacientų grupėje po gydymo ALR; (b) Stačiakampėse diagramose pavaizduotas MB dažnis kontrolinėje grupėje, CD pacientų grupėje prieš gydymą ALR ir CD pacientų grupėje po gydymo ALR.

Figure 3.13. The effect of diabetes and treatment with α -lipoic acid (ALA) on cytogenetic DNA damage markers. (a) Bar charts illustrating the frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in the control group, in the group of diabetes patients before treatment with ALA, and in the group of diabetes patients after treatment with ALA; (b) Bar charts showing the frequency of micronuclei (MN) in the control group, in the group of diabetes patients before treatment with ALA, and in the group of diabetes patients after treatment with ALA.

¹SCE – sister chromatid exchange/cell; ²Control; ³Before treatment with α -lipoic acid; ⁴After treatment with α -lipoic acid; ⁵MN - micronucleus.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šio tyrimo tikslas įvertinti ir palyginti cukriniu diabetu sergančiųjų ir kontrolinės grupės DNR pažeidimų dažnį, oksidacinius kraujo žymenis ir miRNR raišką ir susieti su tiriamųjų klinikiniais rodikliais. Tyrimo metu ištirti citogenetiniai rodikliai – chromosomų aberacijos, mikrobranduolių ir seserinių chromatidžių mainų dažnis, taip pat 8-OHdG koncentracija kraujo plazmoje ir su diabetu ir diabeto komplikacijomis susijusios miRNR – miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p ir miR-223-3p. Klinikinis pacientų ištyrimas apėmė visų tiriamųjų anamnezės surinkimą ir detalių CD pacientų ištyrimą dėl diabetinės neuropatijos. Tyrime taip pat plačiau tirti ir palyginti diabetinės polineuropatijos ir kardiovaskulinės autonominės neuropatijos, skirtumai CD1 ir CD2 sergantiems.

Epidemiologiniuose tyrimuose DSPN būdingi pakitimai pasireiškia ankstyvose CD ligos vystymosi stadijose ir nustatomi jau ir sergantiesiems prediabetu. CD2 pacientams DSPN pasireiškia dažniau ir ankstyvesnėse ligos stadijose lyginant su CD1 [200]. Savo tyrime mes nenustatėme DSPN dažnio skirtumo palygindami CD1 ir CD2, galimai, dėl specifinės hospitalizuotų tiriamųjų populiacijos su sunkia ir pažengusia liga. DSPN dažnis CD1 ir CD2 grupėse varijavo priklausomai nuo naudoto diagnostikos metodo dėl, galimai, skirtingo metodų jautrumo ir specifiškumo. Klinikinis pacientų ištyrimas naudojant Neuropatijos simptomų skalės klausimyną (NSS) ir Neuropatijos negalios skalę (NNS) – dažniausiai naudojamas metodas klinikinėje praktikoje, padedantis įvertinti smulkiųjų ir stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimą. Tačiau dėl santykinai nedidelio jautrumo (NNS siekia iki 68 %), tik pažengusios nervų pažeidimo nustatomos šiuo metodu [301], todėl DSPN dažnis mūsų tyrime tiriant šiuo metodu buvo mažiausias. Elektroneurografija (ENG) – objektyvus ir jautrus tyrimo metodas, dažniausiai naudojamas klinikiniuose tyrimuose. Tačiau šiuo metodu nustatoma tik stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimas, o dažniausiai ankstyvesnė, smulkiųjų skaidulų pažeidimas lieka neaptikta [301], todėl DSPN dažnis tiriant šiuo metodu mūsų tyrime buvo vidutinis, palyginus su klinikiniu ištyrimu ir neurometrija (NM). Tiriant NM metodu nustatoma ankstyva smulkiųjų ir stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimas, tačiau kaip ir kiti tyrimai, reikalaujantys paciento bendradarbiavimo, NM rezultatai varijuoja priklausomai nuo paciento gebėjimų, tyrėjo patirties ir kitų įtakojančių veiksnių. Atlikdami NM nustatėme didžiausią DSPN dažnį, ir šie rezultatai sutampa su kitų tyrėjų rezultatais [302, 303], todėl šis tyrimas galėtų būti naudojamas ankstyvai DSPN diagnostikai ar DSPN progresavimo stebėjimui.

Vertinant atskirus DSPN tyrimų elementus, kamertono vibracijos jutimo sutrikimas, rodantis stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimą, dažniau nustatytas CD2 nei CD1 pacientams. Šie duomenys sutampa su kitų tyrėjų rezultatais, kurie stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimą vertino biotezimetru [304] arba vibracijos jutimo analizatoriumi [305]. Nors vibracijos jutimas gali mažėti senstant, ankstesnių tyrimų rezultatai parodė ryškesnį vibracijos jutimo sutrikimą CD2 pacientams, palyginus su CD1 įvairiose amžiaus grupėse, nors ne visuose tyrimuose nurodyta, ar buvo naudotos nuo amžiaus priklausomos tyrimo normos [304–306]. Tirdami kitais metodais savo tyrime nenustatėme smulkiųjų (temperatūrinis ir skausmo jutimai) ar stambiųjų (Achilo sausgyslės refleksas) skaidulų pažeidimo skirtumo tarp CD1 ir CD2 pacientų, o kitų autorių rezultatai yra priešaringi [305, 307]. Tiriant ENG metodu sensorinių nervų, t. y. *n. suralis* ir *n. tibialis*, pažeidimo dažnis, palyginus CD1 ir CD2 pacientus, nesiskyrė, tačiau motorinio nervo, *n. peroneus*, disfunkcija dažniau nustatyta CD1 pacientams. Motorinių nervų pažeidimas rodo vėlyvesnę ir sunkesnę nervinių skaidulų pažeidimą, todėl galime daryti išvadą, kad CD1 pacientams mūsų tyrime būdinga labiau pažengusi DSPN, palyginus su CD2 pacientais. Tačiau kitų autorių tyrimų rezultatai neparodė motorinių nervų pažeidimo skirtumo palyginus CD tipus [304], arba rezultatai buvo priešingi, ir didesnę motorinių nervų pažeidimą nustatyta CD2 pacientams [307], todėl reikalingi tolesni tyrimai, siekiant įvertinti šiuos rezultatus.

NM tyrimas neparodė reikšmingo skirtumo tarp CD1 ir CD2 stambiųjų ir smulkiųjų sensorinių skaidulų pažeidimo dažnio, priešingai nei klinikinis ištyrimas, kurį atliekant CD2 pacientams dažniau nustatyta stambiųjų skaidulų pažeidimas tirtiant kamertonu. Literatūros duomenimis kamertono jautrumas siekia 62,5 %–84,6 % [308–310] ir yra ženkliai mažesnis nei NM jautrumas, siekiantis 94 % [311], todėl CD2 pacientams gali būti labiau būdinga pažengusi sensorinių stambiųjų nervinių skaidulų pažeidimas.

Skausminę DSPN ženkliai dažniau nustatėme CD2 nei CD1 pacientams. Analogiški rezultatai gauti ir kituose tyrimuose [312, 313]. Nėra tiksliai žinoma, kodėl CD2 pacientams dažniau išsivysto skausminė DSPN, galimai, lydinčios ligos, dažniau būdingos CD2 pacientams, papildomai pažeidžia smulkiasias nervines skaidulas, kurios atsakingos už skausmo jutimą [154]. Taip pat, nors skausminę DSPN dažniau nustatėme CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais, skausmo stiprumas tarp CD tipų nesiskyrė.

Tyrimų, palyginančių KAN dažnį CD1 ir CD2 pacientams, rezultatai priešaringi: viename tyrime KAN dažnesnė CD2 pacientams [127], kitame – CD1 pacientams [314], dar kituose darbuose reikšmingas skirtumas tarp CD tipų nenustatytas [137, 315]. Mūsų tyrime KAN dažnis CD2 pacientams buvo

dvigubai didesnis nei CD1 pacientams dėl dažnesnės parasimpatinės disfunkcijos, kurią parodo ŠSD atsakas į gilų kvėpavimą ir stovėjimą bei Valsalvos mėginys. ŠSD atsako į gilų kvėpimą testas buvo dažniausias patologinis testas CD2 pacientams, ir šie rezultatai atitinka Pan ir kt. [316] išvadas, kad šis testas yra jautriausias diagnozuojant KAN CD2 pacientams. Yra žinoma, kad nutukimas gali pabloginti gilaus kvėpavimo testo rezultatus dėl susilpnėjusių krūtinės refleksų, tačiau, nors dauguma CD2 pacientų mūsų tyrime buvo nutukę, reikšmingų sąsajų tarp nutukimo ir sutrikusio gilaus kvėpavimo testo nenustatyta.

Sistolinio AKS atsako į stovėjimą testas, rodantis simpatinę disfunkciją ir pažengusią KAN, buvo dažniau sutrikęs CD1 pacientams, tačiau skirtumas, palyginus su CD2 pacientais, nepasiekė statistinio reikšmingumo. Tokia tendencija galėtų parodyti, kad CD1 pacientams būdinga sunkesnė KAN, tačiau ši hipotezė turėtų būti patvirtinta tolesniais didesnės imties tyrimais.

Nustatėme, kad bloga ilgalaikė glikemijos kontrolė susijusi su DSPN ir KAN išsivystymo rizika CD1, bet ne CD2 pacientams. Tokie rezultatai sietini su esamomis žiniomis, kad hiperglikemija yra pagrindinis neuropatijų rizikos veiksnys CD1 pacientams, tačiau CD2 pacientams nervų pažeida yra labiau kompleksinė [101]. Diabeto trukmė, kuri kartu su hiperglikemija sąlygoja suminį toksinį glikemijos poveikį, mūsų tyrime taip pat buvo stipriau susijusi su DN rizika CD1 nei CD2 pacientams. HbA1c tyrimas, atspindintis glikemijos kontrolę per paskutinius 3 mėn., neparodė jokių sąsajų su DN CD1 ir CD2 pacientams, todėl šio tyrimo reikšmė skrespjūvio tyrimuose gali būti ribota.

Kiti tradiciniai rizikos veiksniai, t. y. vyresnis amžius, kitos mikrovaskulinės komplikacijos ir lydinčios ligos, buvo dažnesni CD1 ir CD2 pacientams su DSPN ir KAN, palyginus su pacientais be šių komplikacijų, tačiau reikšmingos sąsajos dažniau nustatytos CD1 nei CD2 pacientams. Teigiamos DSPN ir KAN sąsajos su aukščiau minėtais rizikos veiksniais CD1 pacientams nustatytos EURODIAB IDDM (angl. *European Insulin Dependent Diabetes Mellitus Prospective Complications Study*) tyrime [122], o tik su DSPN – CD1 – Škotijos registro tyrime (angl. *in T1D Exchange and the Scottish Register studies*) [317]. DN sąsaja su kitomis mikrovaskulinėmis komplikacijomis stebėta mūsų tyrime pasireiškia dėl bendrų hiperglikemijos sukeltų patogenetinių kelių, tačiau kiti autoriai nustatė stipresnę KAN ir kitų mikrovaskulinių komplikacijų sąsają CD2 nei CD1 pacientams [314].

Mūsų tyrime žemesnis GFG buvo reikšmingai susijęs su KAN ir DSPN CD1, bet ne CD2 pacientams. KAN susijęs su padidėjusiu glomerulų filtracijos spaudimu, glomerulių endotelio ląstelių pažeidimu ir eritropoetino

sekrecija [316], ir teigiamas ryšys tarp KAN ir blogėjančios inkstų funkcijos yra įrodytas ankstesniuose tyrimuose su CD1 [318] ir CD2 pacientais [319]. Kitų autorių taip pat aprašyta ureminė DSPN, pasireiškianti blogėjančią inkstų funkcijai dėl periferinių nervų stambiųjų skaidulų pažaidos [320].

Gana netikėtai mūsų tyrime DSPN ir KAN sąsaja su lydinčiomis ligomis buvo stipresnė CD1 pacientams, palyginus su CD2 pacientais. CD gydymo rekomendacijos siekiant išvengti CD komplikacijų akcentuoja glikemijos kontrolės svarbą CD1 pacientams ir labiau holistinę CD2 pacientų priežiūrą, apimančią AH, dislipidemijos korekciją ir svorio mažinimą [98, 101]. Tačiau toks požiūris susiformavęs dėl epidemiologiniuose tyrimuose nustatomo didesnio lydinčių ligų dažnio CD2 nei CD1 pacientams [321, 322]. Mūsų tyrime dalyvavo hospitalizuoti, su pažengusia liga ir dažna lydinčia patologija (dislipidemija, AH) CD1 pacientai, todėl tai galėjo sąlygoti stipresnes mikrovaskulinių komplikacijų ir gretutinių ligų sąsajas. Tokiems CD1 pacientams holistinė priežiūra yra ne mažiau svarbi nei CD2 pacientams.

Klinikinių ir demografinių rodiklių sąsajos su genetiniais žymenimis pirmiausiai vertintos atliekant dvinarę analizę. Tolimesniame etape atlikti daugianariai statistiniai skaičiavimai, naudojant pažingsninę daugianarę ir logistinę regresinę analizę.

Dvinariuose palyginimuose su kontroline grupe CD1 ir CD2 pacientams nustatėme didesnę SCM, HFC, MB ir SCM-IND dažnį, o 8-OHdG ir MB-IND tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. Kitų autorių tyrimuose taip pat nustatytas SCM dažnio padidėjimas gydomiems CD2 [36] ir CD1 pacientams [33, 34]. Pacientams su naujai diagnozuotu, antidiabetiniais medikamentais negydomu CD2 [35] ir dializuojamiems CD pacientams [40] nustatomas toks pats SCM dažnis, kaip ir kontrolinėje grupėje. Atskirų MB tyrimų rezultatai taip pat nėra vieningi: vienuose tyrimuose CD1 ir CD2 pacientams nustatomas didesnis MB dažnis [36, 37, 43–45, 323–326], kituose tyrimuose ši sąsaja nepasitvirtina [33, 34, 46]. Vis tik neseniai atliktoje aštuonių tyrimų metaanalizėje patvirtinta, kad CD pacientams būdingas reikšmingai didesnis MB dažnis, palyginus su kontroline grupe [42]. Didesnis MB dažnis taip pat nustatomas pacientams, sergantiems nutukimu [270, 271] ir metaboliniu sindromu [272], o šios lydinčios ligos (iki 90 % atvejų) būdingos CD2 pacientams.

Mūsų tyrimo kontrolinės grupės limfocitų bendras CA dažnis (1,83/100 ląstelių) atitinka anksčiau skelbtų tyrimų rezultatus (nuo 1,68 iki 2,11/100 ląstelių) [327, 328]. CD1 ir CD2 pacientams nustatėme aukštesnį visų tipų chromosomų aberacijų dažnį, palyginus su kontroliniais asmenimis. Šie duomenys sutampa su kitų autorių rezultatais tiriant CD2 pacientus

[37,38,329], taip pat rūkančius ir nerūkančius CD1 ir CD2 pacientus [39]. Tačiau tyrimuose, kuriuose kontroliniai tiriamieji palyginti su CD1 pacientais [33] arba naujai diagnozuotais, daugiausiai medikamentais negydytais CD2 pacientais [35], CA dažnio skirtumų nenustatyta. Mes taip pat nustatėme, CTA ir CSA dažnio priklausomybė nuo ligos stažo. Sąsaja su ligos stažu CD2 pacientams kitų autorių darbuose prieštaringa: nustatyta CA [37] ir keliuose MB tyrimuose [44, 45, 323], nenustatyta eilėje kitų MB tyrimų [36,330]. CD1 pacientų tyrimuose MB sąsaja su ligos stažu taip pat nenustatyta [268, 323]. Tačiau pastarųjų tyrimų pacientų CD stažas buvo ženkliai trumpesnis nei mūsų tiriamųjų, kuriems CD buvo diagnozuotas vidutiniškai prieš 13 metų, todėl trumpesnė ligos trukmė galimai buvo nepakankama pažaidų susidarymui. Mūsų tyrime CD2 pacientams nustatytas didesnis CA ir CSA dažnis, palyginus su CD1 pacientais. Yra atliktas dar vienas tyrimas, kuriame nustatytas aukštesnis CA dažnis CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais, tačiau skirtumo statistinis reikšmingumas nenurodytas [39]. Aukštesnis CA ir CSA dažnis CD2 pacientams galimai susijęs su lydinčiomis ligomis, t. y. nutukimu, arterine hipertenzija ir dislipidemija, dažniau būdingomis šiems pacientams, palyginus su CD1. Šios lydinčios ligos, ypač nutukimas, yra susijusios su lėtiniu uždegimu, oksidacinio streso padidėjimu, sukeliančiu DNR pažaidas, ir padidėjusia onkologinę riziką [331–333]. Savo tyrime atlikę daugianarę analizę taip pat nustatėme, kad KMI yra reikšmingas rizikos veiksnys chromosominio tipo aberacijų susidarymui. Ta pati tendencija stebėta kituose MB tyrimuose su nutukusiais asmenimis [43,270,272]. Sutrikusi DNR reparacija [334,335] ir padidėjęs DNR pažaidų lygis [331] nutukusiems pacientams nustatytas ir kituose tyrimuose. Taigi mūsų tyrime nustatyta CSA ir KMI koreliacija CD pacientams atitinka anksčiau kitų autorių atliktų tyrimų rezultatus. Viena tyrime vyrams su KMI ≥ 25 kg/m² nustatytas paradoksalus MB ir plaučių vėžio rizikos sumažėjimas, palyginus su normalaus svorio vyrais [336]. Tačiau dauguma šio tyrimo tiriamųjų buvo veikiami su profesija susijusių policiklinių aromatinių angliavandenilių, todėl autoriai sumažėjusį MB dažnį ir plaučių vėžio riziką tokiems pacientams aiškino geresniu angliavandenilių metabolizmu, būdingu nutukusiems asmenims. Kai kuriuose ankstesniuose tyrimuose CD pacientams su diabetine neuropatija [44,329] ar nefropatija [45] nustatytas padidėjęs CA ar MB dažnis. Mes nenustatėme CA sąsajos su diabeto komplikacijomis galimai dėl mažos tyrimo imties. CA sąsaja su CD gydymu (metforminu ar insulino terapija) taip pat neišryškėjo, tačiau atlikdami daugianarę analizę nustatėme, kad statinų vartojimas galėtų būti susijęs su mažesniu CA, ypač chromosominio tipo CA, dažniu. Nors nustatyta

sąsaja yra ribinio reikšmingumo ($p = 0,0763$), kitų autorių duomenys [259, 350–353] patvirtina statinų apsauginį poveikį DNR, ir ši sąsaja atrodo verta tolesnių tyrimų.

Boehm ir kt. atliktame tyrime, kuriame naudotas fluorescencinis *in situ* hibridizacijos (FISH) metodas, diabetu sergančioms pacientėms nustatytas neįprastai didelis stabilių chromosomų aberacijų (translokacijų ir inversijų) dažnis, susijęs su padidėjusia mirštamumo rizika [38]. Mes tokios sąsajos nenustatėme, galimai, dėl naudoto kito, Giemsa, dažymo metodo. Tačiau mūsų tyrime nustatytos stipresnės CSA sąsajos su diabeto stažu ir KMI, palyginus su CTA. Yra žinoma, kad CSA periferiniuose limfocituose atsiranda *in vivo*, o CTA susiformuoja tik *in vitro* iš jau anksčiau buvusių DNR pažaidų [337]. Didesnis CSA dažnis CD pacientams, ypač ilgėjant ligos stažui, galėtų geriau atspindėti kumuliacines DNR pažaidas ne tik pacientų limfocituose, bet ir kitose ląstelėse. Didesnis CSA dažnis CD pacientams galėtų būti susijęs su epidemiologiniuose tyrimuose nustatyta didesne vėžio rizika šiems pacientams [338, 339]. Šią sąsają patvirtina ir ankstesni tyrimai, kuriuose pacientams su didesniu CSA dažniu nustatyta didesnė vėžio rizika [337,340]. Tikėtina, kad šis ryšys nėra priežastinis, tačiau abi sąsajos galimai turi bendrą patogenetinį mechanizmą, kur lėtinis uždegimas galėtų būti viena iš realiausių, šias patologijas jungiančiųjų grandžių. Kita vertus, CTA dažnio padidėjimas taip pat gali atspindėti pirminių DNR pažaidų limfocituose susikaupimą, sąlygotą padidėjusio oksidacinio streso ir sutrikusios pažaidų ekscizijos [331, 335]. Šios pažaidos gali būti susijusios su diabeto komplikacijomis ir lydinčiomis ligomis.

Apibendrinant, CD1 ir CD2 pacientams nustatėme didesnę visų tipų chromosomų aberacijų dažnį, palyginus su kontroliniais asmenimis, ir šis dažnis didėja ilgėjant diabeto stažui. Didesnis kūno masės indeksas susijęs su didesniu CSA dažniu, o statinų vartojimas galimai sumažina chromosomų pažaidų kiekį, tačiau šiai sąsajai įrodyti reikalingi tolesni tyrimai.

Literatūroje aprašomas CD pacientams būdingas oksidacinio žymens 8-OHdG padidėjimas mūsų tyrime nenustatytas dėl galimai per mažos tyrimo imties, o HFC, MB-IND, SCM-IND tyrimų CD pacientams kiti autoriai neatliko. Po dvinarinio palyginimo atliekant pažingsninę daugianarę regresiją CD poveikis į DNR pažaidas neišryškėjo ir reikšmingi išliko kiti klinikiniai ir demografiniai rodikliai.

Klinikinių ir demografinių rodiklių poveikis DNR pažaidų dažniui atliekant dauginės regresijos skaičiavimus apibendrintas 4.1 lentelėje.

4.1 lentelė. Klinikinių ir demografinių rodiklių poveikis DNR pažeidų dažniui apskaičiuotas atliekant dauginę regresinę analizę
Table 4.1. The effect of clinical and demographic indicators on the frequency of DNA damage, calculated using multiple regression analysis.

	8- OhdG ^a	SCM ^b visi ^k	SCM ^b CD ^l	SCM- IND ^c visi ^k	SCM- IND ^c CD ^l	HFC ^d visi ^k	HFC ^d CD ^l	MB ^e visi ^k	MB ^e CD ^l	MB- IND ^f visi ^k	MB- IND ^f CD ^l	CTA ^g	CSA ^h	CA ⁱ
Amžius ¹		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑		↑			
Lytis ²								↑	↑	↑				
Ligos stažas ³												↑	↑	↑
KMI ⁴												↑		
DSPN ⁵		↑		↑		↑	↑		↑	↑				
KAN ⁶		↑												
Retinopatija ⁷										↑	↑			
Nefropatija ⁸								↑						
LIL ⁹	↑													
PAH ¹⁰	↑					↑								
Metforminas ¹¹			↓			↓	↓							
Statina ¹²				↓	↓								↓	
Insulinas ¹³										↓				

CA – bendras chromosomų aberacijų dažnis; CSA – chromosominio tipo aberacijos; CTA – chromatidinio tipo aberacijos DSPN – distalinė simetrinė polineuropatija; HFC – aukšto seserinių chromatidžių mainų dažnio ląstelės; KAN – kardiovaskulinė autonominė neuropatija; KMI – kūno masės indeksas; LIL – lėtinė inkstų liga; MB – mikrobranduolių dažnis; MB-IND – mutagenu 4NQO indukuotas mikrobranduolių dažnis, gaunamas iš vidutinio MB dažnio mutagenu paveiktose ląstelėse atimant vidutinį MB dažnį mutagenu nepaveiktose ląstelėse; PAH – pirminė arterinė hipertenziija; SCM – seserinių chromatidžių mainų dažnis; SCM-IND – mutagenu 4NQO indukuotas seserinių chromatidžių dažnis, gaunamas iš vidutinio SCM dažnio mutagenu paveiktose ląstelėse atimant vidutinį SCM dažnį mutagenu nepaveiktose ląstelėse; 8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas; ↑ – atliekant dauginę regresiją didina dažnį / koncentraciją; ↓ – atliekant dauginę regresiją mažina dažnį / koncentraciją.

4.1 lentelė. Tęsinys

Table 4.1. Continued

¹Age; ²Gender; ³Disease duration; ⁴BMI – body mass index; ⁵Distal symmetric polyneuropathy; ⁶CAN – cardiovascular autonomic neuropathy, ⁷Retinopathy; ⁸Nephropathy; ⁹CKD – chronic kidney disease; ¹⁰PAH – primary arterial hypertension; ¹¹Metformin; ¹²Statins; ¹³Insulin.

^a8-OHdG – 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; ^bSCE – sister chromatid exchange frequency; ^cSCE-IND – mutagen 4NQO-induced sister chromatid exchange frequency, calculated as the average SCE frequency in mutagen-treated cells minus the average SCE frequency in untreated cells; ^dHFC – high-frequency sister chromatid exchange cells; ^eMN – micronucleus frequency; ^fMN-IND – mutagen 4NQO-induced micronucleus frequency, calculated as the average MN frequency in mutagen-treated cells minus the average MN frequency in untreated cells; ^gCTA – chromatid type aberrations; ^hCSA – chromosomal type aberrations; ^jCA – total frequency of chromosome aberrations; ^kWhole sample; ^lPatients with diabetes.

↑ – increases frequency/concentration in multiple regression analysis; ↓ – decreases frequency/concentration in multiple regression analysis

Vertinant klinikinių ir demografinių rodiklių poveikį DNR pažaidų dažniui, dažniausiai pasikartojantis kintamasis buvo amžius. Amžius turėjo poveikį SCM, HFC ir MB dažniui visoje imtyje ir CD grupėje, taip pat SCM-IND ir MB-IND tik CD pacientų grupėje.

Amžiaus įtaka DNR pažaidoms gerai žinoma ir plačiai aprašyta kitų autorių – amžėjant kaupiasi išorės veiksnių, metabolinių procesų, OS poveikis ir DNR replikacijos klaidos, o DNR reparacinės sistemos pajėgumai mažėja [341]. Dėl šių veiksnių daugėja DNR trūkių, vystosi DNR ir chromosomų pažaidos, sukeliančios genomo nestabilumą, kuris pasireiškia organizmo senėjimu ir lydinčiomis ligomis, pvz. vėžinėmis ligomis [341]. MB, SCM, CA dažnio ir amžiaus koreliacija patvirtinta bendroje populiacijoje [342], o MB ir amžiaus - CD 2 pacientų [46] ir nėščiųjų, diabetu sergančiųjų tyrimuose [324].

Ligos stažas – kitas klinikinis rodiklis, mūsų tyrime dvinariuose skaičiavimuose reikšmingai susijęs su MB ir CA dažniu. Kitų autorių tyrimuose taip pat nustatyta teigiama MB dažnio ir CD trukmės sąsaja [44, 45], tačiau mūsų tyrime, atliekant daugianarę MB analizę, ligos stažas stipriai siejasi su amžiumi, todėl iš analizės buvo pašalintas. Ligos stažo poveikis chromosomų aberacijoms (CTA, CSA ir CA) išliko reikšmingas ir atliekant pažingsninę daugianarę regresiją. Nustatėme, kad KMI taip pat susijęs su MB ir visų tipų CA dažnio padidėjimu bendroje tiriamųjų imtyje, tačiau atliekant daugianarę regresinę analizę statistiškai reikšminga išliko tik KMI ir CA sąsaja. Išliekantis ligos stažo ir KMI poveikis į CA dažnį galėtų būti paaiškinamas tuo, kad CA atspindi kaupiamąsias genomo pažaidas [343], o SCM ir MB – daugiau trumpalaikes pažaidas [344]. SCM sąsajos su ligos stažu nenustatėme, kaip ir kiti autoriai tyrimuose su CD1 [33] ir CD2 [35,36] pacientais.

HbA1c rodiklio daugiamačiuose skaičiavimuose nenaudojome dėl duomenų trūkumo, tačiau kituose tyrimuose nustatytas MB [42, 44, 46, 47], SCM [36] ir blogos glikemijos kontrolės ryšys CD2, bet ne CD1 [33] pacientams.

Distalinė simetrinė polineuropatija (DSPN) – detaliausiai mūsų ištirta mikrovaskulinė diabeto komplikacija, kuriai, palyginus su kitomis komplikacijomis, gauta daugiausiai sąsajų su DNR pažaidomis – SCM ir SCM-IND – bendroje tiriamųjų imtyje, HFC – CD ir bendroje tiriamųjų imtyje, MB – CD grupėje ir MB-IND – bendroje imtyje. Literatūroje tyrimų apie DSPN ir DNR pažaidų ryšį trūksta. Yra skelbtas vienas nedidelės apimties tyrimas Prasad ir kt. [44], kuriame nustatytas didesnis MB dažnis pacientams su DSPN, palyginus su pacientais be DSPN. Tyrimų, vertinančių DSPN sąsajas su kitais mūsų tirtais DNR pažaidų rodikliais, kiek mums

žinoma, nėra atlikta, todėl gautų rezultatų neįmanoma palyginti. Tikėtina, kad išsivysčiusi komplikacija galėtų byloti apie pažengusią ligą, kuriai būdingas didesnis metabolizmo sutrikimas, OS, gausesnės DNR pažaidos bei didesnis jautrumas mutagenui, nustatomas tiriant indukuotas DNR pažaidas.

Pacientams su kita diabetine neuropatija – kardiovaskuline autonomine neuropatija (KAN), nustatėme didesnę SCM dažnį vertinant visą tiriamųjų imtį. Ši sąsaja iki šiol kitų autorių nebuvo aprašyta, tačiau bendri patogenetiniai mechanizmai su DSPN, tokie kaip OS ir lėtinis uždegimas, galėtų sąlygoti daugiau DNR pažaidų ir aukštesnę SCM dažnį pacientams su KAN. Pacientams su diabetine nefropatija nustatėme reikšmingai didesnę MB dažnį vertinant visą imtį, o pacientams su diabetine retinopatija – didesnę MB-IND vertinant visą ir CD pacientų imtį palyginus su pacientais be šios komplikacijos. Diabetinės nefropatijos ir LIL ryšys su DNR pažaidomis yra aprašytas ir kitų autorių. Mišrios kohortos (diabetu sergančių ir nesergančių) tyrimuose nustatytas MB padidėjimas sergantiems lėtine inkstų liga [345] ir dializuojamiems pacientams [40], o CD kohortoje – pacientams su diabetine nefropatija [45]. Kitame mišrios kohortos tyrime dializuojamų pacientų limfocituose nustatytas reikšmingai didesnis SCM dažnis nei sveikų kontrolinių asmenų limfocituose [41]. Didesnis SCM lygis dializuojamų pacientų limfocituose buvo susijęs ir su makrovaskuliniais pažeidimais – didesniais miego arterijos ateroskleroziniais pakitimais [41]. Klinikinių tyrimų, vertinančių diabetinės retinopatijos sąsajas su DNR pažaidomis, nėra atlikta.

DNR pažaidų sąsają su makrovaskulinėmis komplikacijomis (IŠL, miokardo infarkto, insulto) nenustatėme dėl mažo makrovaskulinių komplikacijų dažnio, tačiau kitų autorių duomenimis, didesnis SCM dažnis limfocituose dializuojamiems pacientams susijęs su didesniais miego arterijos ateroskleroziniais pakitimais [41], o tyrimuose su CD nesergančiais asmenimis nustatytas teigiamas ryšys tarp MB dažnio ir IŠL rizikos [346–348] ir sunkumo [346,349].

Mūsų nustatytas PAH ir LIL poveikis 8-OHdG gerai žinomas ir aprašytas literatūroje. Oksidacinis stresas, kuriam būdingas 8-OHdG padidėjimas, yra vienas pagrindinių PAH patogenezės veiksnių. Jis sukelia kraujagyslių endotelio uždegimą, skatina disfunkciją, kraujagyslių remodeliavimą ir AKS padidėjimą. PAH ir 8-OHdG sąsajos aprašytos A. Di Minno apžvalgoje [350]. Teigiama LIL ir 8-OHdG sąsaja aprašyta Poulsen ir kt. darbe [351].

Mūsų tyrime gydymas statinais sumažino SCM-IND visoje imtyje ir CD pacientų grupėje, taip pat CSA – visoje imtyje. Gydymas metforminu

sumažino SCM CD pacientų grupėje ir HFC – CD pacientų grupėje bei visoje imtyje, o gydymas insulinu sumažino MB-IND visoje pacientų imtyje.

Statinai, be gerai žinomo cholesterolio sintezę slopinančio poveikio, pasižymi ir antioksidaciniu veikimu. Statinais slopina oksidacinį stresą didinančius fermentus 3-hidroksi-3-metilglutaril kofermento A (HMG-CoA) reduktazę ir nikotinamido adenino dinukleotido phosphato (NADPH) oksidazę, taip pat didina antioksidacinių fermentų glutationo peroksidazės (GPx) ir superoksido dismutazės (SOD) koncentraciją, taip mažindami LR susidarymą [352]. Teigiamas statinų poveikis DNR pažaidoms įrodytas *in vitro* tyrimuose. Pavyzdžiui, ilgalaikis gydymas simvastatinu sumažino DNR pažaidų, išmatuotų kometų metodu, dažnį CD2 pacientų su dislipidemija limfocituose [353]. Kitame tyrime nustatyta neigiama statinų vartojimo ir kometų bei MB dažnio koreliacija pacientų su ŠN limfocituose, tačiau pritaikius daugiaveiksnę statistinę analizę ši sąsaja neišliko [354]. Veikiant simvastatinu hemodializuojamų pacientų limfocitus *in vitro*, stebėtas SCM sumažėjimas [41]. Eksperimentiniuose tyrimuose gydymas atorvastatinu, rosuvastatinu [355] ir simvastatinu [356] sumažino doksorubicino, antineoplastinio vaisto, didinančio ROS koncentraciją, sukeltų somatinių mutacijų dažnį drozofilai.

Metforminas taip pat pasižymi pleiotropinėmis, antioksidacinėmis savybėmis – mažina LR susidarymą mitochondrijose, didina antioksidacinių fermentų: SOD, katalazės ir GPx, koncentraciją, slopina GGP susidarymą, aktyvina AMP-aktyvinamą proteino kinazę (AMPK) ir kt. [357]. *In vitro* tyrimuose premedikacija metforminu sumažino metotreksato sukeltą SCM ir CA dažnių padidėjimą žmogaus limfocitų kultūrose [358]. *In vivo* metforminas taip pat sumažino insulino pertekliaus sukeltą kometų ir MB dažnio padidėjimą nutukusių Zuckerio diabeto žiurkių inkstų ląstelėse [359] ir cisplatinos sukeltą MB dažnio padidėjimą žiurkių kaulų čiulpų ląstelėse [360]. Svarbu tai, kad nors *in vitro* metforminas gerina mitochondrijų veiklą ir mažina oksidacinį stresą didesnės metformino dozės pasižymi priešingu veikimu – didina oksidacinį stresą [357] ir DNR pažaidų kiekį [269].

Gydymas insulinu taip pat gali gerinti ląstelės metabolizmą, sumažinti toksinį gliukozės poveikį, lėtinį uždegimą, oksidacinį stresą ir limfocitų DNR jautrumą mutagenams [361, 362]. Šis poveikis paaiškintų mūsų nustatytą mažesnę MB-IND dažnį pacientų, gydytų insulinu, limfocituose, tačiau šiam poveikiui išaiškinti reikalingi didesnės apimties ir išsamesni tyrimai, lygiagrečiai vertinantys glikemijos, uždegimo, OS lygį ir kitus klinikinius parametrus insulinu gydomų ir negydomu pacientų grupėse.

Apibendrinant, mūsų atliktuose dvinariuose palyginimuose CD pacientams būdingas didesnis DNR pažaidų lygis, palyginus su kontroliniais asmenimis, tačiau tarp CD tipų DNR pažaidų lygis reikšmingai nesiskyrė. Daugianariuose skaičiavimuose CD įtaka DNR pažaidoms neišryškėjo, o daugiausiai DNR pažaidų sukeliantis veiksnys buvo amžius. Ligos stažas ir pacientų KMI – veiksniai, didinantys kumuliacinę pažaidą atspindinčių chromosomų aberacijų dažnį, o PAH ir LIL susiję su 8-OHdG padidėjimo rizika. Daugiausiai sąsajų su DNR pažaidomis gauta su distaline simetrine polineuropatija. Gydymas metforminu, statinais ir insulinu sumažino DNR pažaidų lygį.

Siekdami įvertinti klinikinių ir demografinių rodiklių poveikį diabeto mikrovaskulinių komplikacijų išsivystymui ir sąsajas su citogenetiniais rodikliais, atlikome logistinę regresinę analizę. Gera žinoma mikrovaskulinių komplikacijų rizikos veiksniai, tokie kaip CD trukmė, aukštas HbA1c ir bloga ligos kontrolė, turėjo poveikį bent vienai iš trijų komplikacijų – DSPN, KAN arba retinopatijai. KAN ir PAH, dislipidemijos ir DSPN bei nefropatijos ir LIL ryšys taip pat kliniškai reikšmingas ir aprašytas kitų autorių [12, 14, 19–21, 135, 136, 363]. Naujai mūsų aptiktos DSPN ir MB-IND, KAN ir SCM-IND, retinopatijos ir MB-IND sąsaja rodo, kad pacientai su diabetinėmis mikrovaskulinėmis komplikacijomis galėtų būti jautresni mutageno poveikiui. Reikalingi tolesni tyrimai, vertinantys minėtas sąsajas su diabeto komplikacijų rizika ir galimą jų panaudojimą klinikinėje praktikoje.

Nors mūsų skaičiavimuose nustatytos tik silpnos ir nepatikimos miRNR koreliacijos ir sąsajos su CD ir kitais klinikiniais rodikliais galimai dėl per mažos tiriamųjų imties, kitų autorių duomenys patvirtina preliminarūs mūsų tyrimo rezultatus.

Mes nustatėme sumažėjusią mir-16 raišką CD1 pacientams ir neigiamą MiR-16 koreliaciją su blogos glikemijos kontrolės trukme CD1 pacientų imtyje. MiR-16 – viena svarbiausių molekulių, reguliuojančių insulino signalinį kelią [364]. MiR-16 taikininiai genai koduoja baltymus, tokius kaip insulino receptoriaus substratą (IRS), baltymą 1 ir 2 ir insulino receptorių, kurie būtini insulino signaliniam keliui, todėl sumažėjusi mir-16 raiška pasireiškia insulino sekrecijos sutrikimu, rezistencija insulinui ir hiperglikemija [365, 366]. Taip pat mir-16 tiksliniai genai atsakingi už kasos β-ląstelių proliferaciją ir apoptozę. Kiti autoriai taip pat aprašo mir-16 raiškos sumažėjimą CD1 [367] ir CD2 [368] pacientams, palyginus su kontroline grupe. Toksinis hiperglikemijos poveikis kasos beta-ląstelėms galėtų paaiškinti neigiamą mir-16 koreliaciją su blogos glikemijos kontrolės trukme, kurią patvirtina ir kiti CD pacientų tyrimai su ilgalaikiu, blogai

kontroliuojamu CD [367,368], tačiau šiai sąsajai patvirtinti reikalingi didesnės imties tyrimai.

CD1 pacientų grupėje taip pat nustatėme neigiamą mir-17 koreliaciją su liemens ir klubų apimtimi. Kiti autoriai aprašo mir-17 raiškos sumažėjimą CD2 pacientų riebaliniame audinyje [369] ir nutukusių pacientų kraujyje ir riebaliniame audinyje [370]. Nors nutukimas ženkliai dažniau būdingas CD2 pacientams, didėjant sergamumui nutukimu, CD1 pacientams taip pat vis dažniau pasireiškia nutukimas [371]. Šiuo atveju gali išsivystyti vadinamasis „dvigubas“ arba „trečiojo tipo“ diabetas, kuriam be absoliutaus insulino deficito būdinga ir insulino rezistencija [372]. Tokiam diabetui būdingi CD1 ir CD2 požymiai, jis yra sunkiau kontroliuojamas ir pasižymi didesne rizika [373]. Tokių pacientų gydymas – rimtas iššūkis sveikatos sistemai, todėl detalus patofiziologijos suvokimas ir tolesnė epigenetinių veiksnių analizė galėtų prisidėti sprendžiant diagnostikos ir priežiūros klausimus.

Palyginę miRNR raišką CD1, CD2 ir kontrolinės grupės kraujo leukocituose, nustatėme, kad mir-106 raiška tarp CD1 ir CD2 pacientų grupių reikšmingai nesiskyrė, tačiau buvo reikšmingai mažesnė CD2 pacientų grupėje, palyginus su kontroline grupe. Zapala ir kt. taip pat nustatė mažesnę mir-106a raišką CD2 pacientų šlapimo ekstraceliulinėse vezikulėse, palyginus su kontroline grupe [374]. CD1 pacientams didesnė liemens apimtis ir vyresnis amžius neigiamai koreliavo su mir-106a raiška. CD2, visceralinis nutukimas ir vyresnis amžius susiję su oksidacinio streso padidėjimu, kuris kitų autorių duomenis *in vitro* tyrimuose sukelia mir-106a raiškos sumažėjimą [379, 380]. *In vitro* tyrimuose mir-106a taip pat skatina riebalinio audinio diferenciaciją ir proliferaciją [379, 382].

Mes nustatėme neigiamą mir-223 ir liemens apimties koreliaciją CD1 pacientų grupėje. Literatūros duomenimis mir-223 susijęs su nutukimu, gliukozės homeostazės reguliavimu, uždegiminiu ir autoimuniniu procesu [382, 383]. Riebaliniame audinyje Mir-223 slopina nuo insulino priklausomą gliukozės pasisavinimą riebalinėje ląstelėje ir didina makrofagų infiltraciją bei uždegimą [378]. Nutukusių ar insulinui rezistentiškų tiriamųjų riebaliniame audinyje nustatomas mir-223 raiškos padidėjimas: Chuang ir kt. nustatė, kad mir-223 raiška padidėjusi insulinui rezistentiškų moterų poodiniame riebaliniame audinyje [379], Deiuliis ir kiti nustatė mir-223 raiškos padidėjimą morbidiniu nutukimu sergančių pacientų visceraliniame riebaliniame audinyje [380], o Macartney-Coxson ir kt. nustatė reikšmingą mir-223 raiškos sumažėjimą poodiniame ir visceraliniame pacientų, sergančių nutukimu, audinyje po skrandžio apylankos operacijos ir svorio sumažėjimo [381]. Duomenys dėl mir-223 raiškos pacientų, sergančių nutukimu, kraujo

plazmoje skiriasi: nutukusių vaikų tyrimuose nustatytas mir-223 kiekio padidėjimas kraujyje [389, 390], suaugusiųjų tyrimuose – mir-223 kiekio sumažėjimas [384].

Atlikę logistinę regresiją nustatėme, kad mir-223 galėtų būti CD1 žymuo. Nors mūsų skaičiavimuose p reikšmė nepasiekė statistiškai reikšmingo skirtumo ($p = 0,079$), kitų autorių duomenys patvirtina šią sąsają. Januszewski ir kt. nustatė CD1 pacientų plazmos mir-223 neigiamą koreliaciją su C-peptido koncentracija, kurio deficitas būdingas CD1 pacientams [385]. Swolin-Eide ir kt. 400 publikacijų apžvalgoje patvirtintas mir-223 raiškos padidėjimas CD1 pacientams [386]. Kai kurie autoriai apibendrina, kad mir-223 galėtų būti naudojamas kaip biožymuo CD1diagnozės nustatymui ir monitoravimui [387].

Vienas svarbiausių patogenetinių mechanizmų, sąlygojančių diabetinės neuropatijos išsivystymą ir progresavimą, yra oksidacinis stresas [388]. Padidėjęs laisvųjų radikalų kiekis organizme pažeidžia įvairias neuroono struktūras, pvz., lipidus, baltymus ir DNR, ir taip sutrikdo neuroono funkciją.

DNR pažaidos gali būti nustatomos tiriant DNR oksidacinius žymenis kraujyje ir šlapime arba atliekant citogenetinius tyrimus. Nustatyta, kad CD pacientams būdinga didesnė DNR oksidacinės pažaidos žymens, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino, koncentracija, palyginus su sveikais asmenimis [389], o didesnis šio žymens lygis susijęs su padidėjusia mikrovaskulinių komplikacijų rizika ir didesniu pacientų mirštamumu [261,390].

Daugelyje tyrimų taip pat nustatyta, kad CD pacientams, palyginus su CD nesergančiais asmenimis, būdingas didesnis citogenetiniais tyrimais nustatomų DNR pažaidų kiekis, t. y. didesnis chromosomų aberacijų, seserinių chromatidžių mainų ir mikrobranduolių dažnis [32,42,391,392]. Ryškesni DNR pažaidų kiekio pokyčiai taip pat siejami su didesne diabeto komplikacijų rizika [44, 45, 329].

Oksidacinio streso reikšmė diabeto ir diabeto komplikacijų išsivystymui sukelė susidomėjimą antioksidantais, kaip terapine priemone šių būklių gydymui. Deja, daug žadantys eksperimentinių tyrimų su antioksidantais rezultatai, klinikiniuose tyrimuose *neatsikartojo*. Vienintelis antioksidantas su įrodytu klinikiu efektyvumu ir naudojamas klinikinėje praktikoje DSPN gydymui yra α -lipoinė rūgštis (ALR) [56]. Mažindama oksidacinį stresą, ALR ne tik sumažina DSPN simptomus ir požymius, bet ir pagerina jautrumą insulinui, taip pat turi teigiamą poveikį lydinčioms ligoms, tokioms kaip nutukimas, hipertenzija, dislipidemija [212, 218, 397]. ALR pasižymi dvigubu antioksidaciniu poveikiu: veikdama tiesiogiai jungiasi prie deguonies ir azoto radikalų ir juos šalina, o netiesioginis poveikis pasireiškia regeneruojant kitus

antioksidantus [394]. ALR taip pat sumažina SCM ir MB dažnį žmogaus limfocituose *in vitro* [395] ir žiurkių kaulų čiulpų ląstelėse *in vivo* [396].

ALR efektyvumas gydant įvairios kilmės skausmą įrodytas daugelyje tyrimų su gyvūnais [397], tačiau klinikinių tyrimų rezultatai išlieka gana prieštaringi. Pavyzdžiui, vienoje, neseniai atliktoje metaanalizėje nustatyta, kad gydymas ALR nesumažina diabetinio neuropatinio skausmo [398], tačiau kitoje metaanalizėje padarytos priešingos išvados – gydymas ALR gali sumažinti neuropatinį skausmą CD pacientams [223].

Tokie skirtumai galimi dėl skirtingo ALR skyrimo būdo, nes intraveninė ALR forma yra efektyvesnė nei tabletinė forma [399]. Teigiamą ALR poveikį taip pat įrodo klinikiniai tyrimai su kitos kilmės, ne diabetiniu, skausmu, kuriuose nustatyta, kad ALR efektyviai sumažina šaknelinį [400], migreninį, riešo kanalo [223] ir nežinomos kilmės [401] skausmą.

Daugumos klinikinių ir stebimųjų tyrimų duomenimis gydymas ALR sumažina neuropatijos simptomus ir požymius 40–60 % ir pagerina CD pacientų gyvenimo kokybę [207,220,222].

Kaip minėta aukščiau, dėl trumpo veikimo pusperiodžio geriamoji forma yra mažiau efektyvi nei intraveninė [402]. Geriausias gydymo rezultatas pasiekiamas skiriant intraveninę ALR bent 3 sav. ir ilgiau [207]. Tokiam gydymui reikalinga ilgalaikė hospitalizacija arba kasdieniniai ambulatoriniai vizitai, kurie nepatogūs tiek pacientui tiek gydančiam gydytojui. Todėl dažniausiai klinikinėje praktikoje intraveninė ALR skiriama trumpesnį laikotarpį, vieną, dvi savaites, o vėliau tęsiama tabletine forma [403]. Mūsų tyrimo tikslas buvo įvertinti trumpalaikės ALR infuzijos (4–9 dienų) poveikį neuropatijos simptomams ir objektyviai išmatuojamiems rodikliams, susijusiems su oksidaciniu stresu ir DNR pažeidimais.

Neuropatijos simptomų vertinimui naudotas Universalus skausmo vertinimo įrankis (angl. UPAT – *Universal Pain Assessment Tool*) [292]. Oksidacinio streso ir DNR pažeidimų vertinimui prieš ir po gydymo ALR tirtas DNR oksidacinio žymens, 8-OHdG, kraujyje koncentracija, taip pat citogenetiniai DNR pažeidimų žymenys – MB ir SCM dažniai.

Po gydymo ALR 8-OHdG koncentracija CD pacientų kraujo plazmoje mūsų tyrime sumažėjo. 8-OHdG yra gerai žinomas oksidacinio streso žymuo, dažnai išmatuojamas padidėjęs CD pacientų kraujo plazmoje [261, 394] ir šlapime [404], tačiau ALR poveikis į 8-OHdG koncentraciją įvairių autorių duomenimis skiriasi. Pavyzdžiui, kai kuriuose tyrimuose 8-OHdG koncentracija kraujo serume [227] ir šlapime [405] po gydymo ALR sumažėjo, tačiau kituose tyrimuose teigiamas ALR poveikis į 8-OHdG [226] ar kitus oksidacinio streso žymenis [225] nenustatytas. Tyrimuose su gyvūnais

patvirtintas teigiamas ALR poveikis ir nustatytas 8-OHdG sumažėjimas įvairiuose audiniuose [410, 411].

Yra žinoma, kad kraujo plazmos 8-OHdG koncentracija taip pat priklauso nuo inkstų funkcijos, todėl ne visada tiksliai atspindi oksidacinio streso lygį organizme [351], tačiau visų mūsų tirtųjų pacientų inkstų funkcija prieš gydymą buvo normali, ALR kursas truko 4–9 dienas, inkstų funkcijos pokyčiai per tokį trumpą laiką mažai tikėtini, todėl 8-OHdG sumažėjimas mūsų pacientams tikėtina atspindi oksidacinio streso sumažėjimą.

Gydymas intravenine ALR infuzija mūsų tyrime nesumažino SCM ir MB dažnio CD pacientų limfocituose. SCM ir MB dažnis atspindi DNR pažaidas, sukaupias per ilgesnį laiką, todėl trumpa terapijos trukmė galimai buvo nepakankama DNR pažaidų pokyčiams išsivystyti. Taip pat nedidelė tyrimo imtis galėjo būti per maža statistiškai reikšmingiems MB ir SCM pokyčiams nustatyti.

Taigi mes nustatėme, kad net trumpalaikis gydymas intravenine ALR sumažina neuropatinio skausmo stiprumą ir oksidacinio streso žymens, 8-OHdG, koncentraciją, tačiau reikšmingi citogenetinių žymenų, SCM ir MB, dažnio pokyčiai nenustatyti.

Apibendrinant, mūsų tyrime siekėme įvertinti ir palyginti CD sergančių pacientų ir kontrolinės grupės DNR pažaidų biožymenis ir miRNR raišką ir juos susieti su tiriamųjų klinikiniais rodikliais. Nustatėme, kad sergantiesiems cukriniu diabetu būdingas didesnis DNR pažaidų dažnis, palyginus su kontroline grupe, tačiau tarp diabeto tipų DNR pažaidų dažnis nesiskyrė. DNR pažaidų dažnis susijęs su klinikiniais diabeto rodikliais, o pacientų su mikrovaskulinėmis diabeto komplikacijomis leukocitams būdingas didesnis jautrumas mutagenui. Sergantiesiems cukriniu diabetu būdingos miRNR raiškos sąsajos su klinikiniais rodikliais. Trumpalaikis gydymas ALR duoda klinikinį efektą ir sumažina oksidacinius kraujo žymenis, tačiau neįtakoja DNR pažaidų dažnio.

IŠVADOS

1. Palyginus diabetinių neuropatijų dažnio skirtumus tarp CD1 ir CD2 pacientų, distalinės simetrinės polineuropatijos dažnis nesiskyrė, tačiau ženkliai varijavo priklausomai nuo naudoto diagnostikos metodo. Skausminė distalinė simetrinė polineuropatija ir kardiovaskulinė autonominė neuropatija dažniau nustatyta CD2 pacientams.
2. CD1 ir CD2 pacientams, palyginus su kontroline grupe, nustatytas didesnis seserinių chromatidžių mainų, aukšto seserinių chromatidžių mainų dažnio ląstelių, mikrobranduolių, mutagenu indukuotų seserinių chromatidžių mainų, chromosomų aberacijų, chromosominio tipo aberacijų ir chromatidinio tipo aberacijų dažnis, o 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino koncentracija ir mutagenu indukuotų mikrobranduolių dažnis tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. Chromosominio tipo aberacijos reikšmingai dažniau nustatytos CD2 pacientams, palyginus su CD1 pacientais, o tiriant kitas DNR pažaidas reikšmingo skirtumo tarp CD tipų nenustatyta.
3. Veiksniai, sukėlę daugiausiai DNR pažaidų buvo paciento amžius ir distalinė simetrinė polineuropatija. Ligos stažas ir pacientų kūno masės indeksas padidino chromosomų aberacijų dažnį, o pirminė arterinė hipertenzija ir lėtinė inkstų liga – susiję su 8-hidroksi-2'-deoksiguanozino koncentracijos padidėjimo rizika. Gydytas metforminu, statiniais ir insulinu sumažino DNR pažaidų dažnį.
4. Be gerai žinomų klasikinių klinikinių rizikos veiksnių diabeto komplikacijų išsivystymo rizikai nustatytos papildomos sąsajos: distalinės simetrinės polineuropatijos ir mutagenu indukuotų mikrobranduolių dažnio, kardiovaskulinės autonominės neuropatijos ir mutagenu indukuotų seserinių chromatidžių mainų dažnio, retinopatijos ir mutagenu indukuotų mikrobranduolių dažnio. Šios sąsajos rodo, kad pacientai su diabetinėmis mikrovaskulinėmis komplikacijomis galėtų būti jautresni mutageno poveikiui.
5. MiRNR-16, miR-17, miR-106a ir miR223 raiškos pokyčiai pacientų leukocituose yra susiję su su kai kuriais klinikiniais rodikliais CD1 pacientų grupėje: mir-16 raiška neigiamai koreliavo su blogos glikemijos kontrolės trukme; mir-17 raiška neigiamai koreliavo su liemens ir klubų apimtimi, o mir-106a ir mir-223 raiška – su liemens apimtimi. Logistinės regresijos modelyje miR-16 ir mir-223 raiška gali būti naudojama kaip CD1 prognostinis rodiklis. Mažesnė mir-

106a raiška nustatyta CD2 pacientams, palyginus su kontroline grupe, tačiau logistinės regresijos modelyje mir-106a nepasiekė statistinio reikšmingumo kaip CD2 prognostinis rodiklis.

6. Trumpalaikis intraveninis gydymas α -lipoine rūgštimi (ALR) sumažina neuropatinio skausmo stiprumą ir oksidacinio streso žymens, 8-OHdG, koncentraciją, tačiau neturi įtakos citogenetinių žymenų – SCM ir MB, dažniui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Home, Resources, diabetes L with, Acknowledgement, FAQs, Contact, Policy P: IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition.
2. Banerjee J, Nema V, Dhas Y, Mishra N: Role of MicroRNAs in Type 2 Diabetes and Associated Vascular Complications. *Biochimie*. 2017, 139:9–19. 10.1016/j.biochi.2017.05.007
3. He Z, King GL: Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004, 33:215–38, xi–xii. 10.1016/j.ecl.2003.12.003
4. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA: Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*. 2005, 293:217–28. 10.1001/jama.293.2.217
5. Moulik PK, Mtonga R, Gill GV: Amputation and mortality in new-onset diabetic foot ulcers stratified by etiology. *Diabetes Care*. 2003, 26:491–4. 10.2337/diacare.26.2.491
6. Rastogi A, Goyal G, Kesavan R, et al.: Long term outcomes after incident diabetic foot ulcer: Multicenter large cohort prospective study (EDI-FOCUS investigators) epidemiology of diabetic foot complications study: Epidemiology of diabetic foot complications study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020, 162:108113. 10.1016/j.diabres.2020.108113
7. Taplin CE, Barker JM: Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008, 41:11–8. 10.1080/08916930701619169
8. Kerr M, Barron E, Chadwick P, et al.: The cost of diabetic foot ulcers and amputations to the National Health Service in England. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2019, 36:995–1002. 10.1111/dme.13973
9. Diabetes. Accessed: November 3, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
10. Tapp RJ, Shaw JE, Zimmet PZ, et al.: Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset: results from the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2004, 44:792–8.
11. Cederholm J, Eliasson B, Nilsson PM, Weiss L, Gudbjörnsdóttir S, Steering Committee of the Swedish National Diabetes Register: Microalbuminuria and risk factors in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005, 67:258–66. 10.1016/j.diabres.2004.07.021
12. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SEM, et al.: Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005, 352:341–50. 10.1056/NEJMoa032782
13. De Block CEM, De Leeuw IH, Van Gaal LF: Impact of overweight on chronic microvascular complications in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2005, 28:1649–55. 10.2337/diacare.28.7.1649
14. Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, et al.: Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes Metab*. 2009, 35:206–13. 10.1016/j.diabet.2008.11.004

15. Straub RH, Thum M, Hollerbach C, Palitzsch KD, Schölmerich J: Impact of obesity on neuropathic late complications in NIDDM. *Diabetes Care*. 1994, 17:1290–4. 10.2337/diacare.17.11.1290
16. Wat N, Wong RL, Wong IY: Associations between diabetic retinopathy and systemic risk factors. *Hong Kong Med J Xianggang Yi Xue Za Zhi*. 2016, 22:589–99. 10.12809/hkmj164869
17. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH: Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ*. 1997, 314:783–8. 10.1136/bmj.314.7083.783
18. de Boer IH, Rue TC, Cleary PA, et al.: Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. *Arch Intern Med*. 2011, 171:412–20. 10.1001/archinternmed.2011.16
19. Cho YN, Lee KO, Jeong J, et al.: The role of insulin resistance in diabetic neuropathy in Koreans with type 2 diabetes mellitus: a 6-year follow-up study. *Yonsei Med J*. 2014, 55:700–8. 10.3349/ymj.2014.55.3.700
20. Smith AG, Singleton JR: Obesity and hyperlipidemia are risk factors for early diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications*. 2013, 27:436–42. 10.1016/j.jdiacomp.2013.04.003
21. Yang C-P, Lin C-C, Li C-I, et al.: Cardiovascular Risk Factors Increase the Risks of Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: The Taiwan Diabetes Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015, 94:e1783. 10.1097/MD.0000000000001783
22. Callaghan BC, Xia R, Reynolds E, et al.: Association Between Metabolic Syndrome Components and Polyneuropathy in an Obese Population. *JAMA Neurol*. 2016, 73:1468–76. 10.1001/jamaneurol.2016.3745
23. Callaghan BC, Xia R, Banerjee M, et al.: Metabolic Syndrome Components Are Associated With Symptomatic Polyneuropathy Independent of Glycemic Status. *Diabetes Care*. 2016, 39:801–7. 10.2337/dc16-0081
24. Kwai NCG, Nigole W, Poynten AM, Brown C, Krishnan AV: The Relationship between Dyslipidemia and Acute Axonal Function in Type 2 Diabetes Mellitus In Vivo. *PloS One*. 2016, 11:e0153389. 10.1371/journal.pone.0153389
25. Han L, Ji L, Chang J, et al.: Peripheral neuropathy is associated with insulin resistance independent of metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2015, 7:14. 10.1186/s13098-015-0010-y
26. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, et al.: Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2012, 35:556–64. 10.2337/dc11-1909
27. van Leiden HA, Dekker JM, Moll AC, et al.: Risk Factors for Incident Retinopathy in a Diabetic and Nondiabetic Population: The Hoorn Study. *Arch Ophthalmol*. 2003, 121:245–51. 10.1001/archophth.121.2.245

28. Tomić M, Ljubić S, Kaštelan S, Gverović Antunica A, Jazbec A, Poljičanin T: Inflammation, Haemostatic Disturbance, and Obesity: Possible Link to Pathogenesis of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013, 2013:e818671. 10.1155/2013/818671
29. Forrest KY-Z, Maser RE, Pambianco G, Becker DJ, Orchard TJ: Hypertension as a Risk Factor for Diabetic Neuropathy: A Prospective Study. *Diabetes.* 1997, 46:665–70. 10.2337/diab.46.4.665
30. Partanen J, Niskanen L, Lehtinen J, Mervaala E, Siitonen O, Uusitupa M: Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1995, 333:89–94. 10.1056/NEJM199507133330203
31. Savage S, Estacio RO, Jeffers B, Schrier RW: Urinary albumin excretion as a predictor of diabetic retinopathy, neuropathy, and cardiovascular disease in NIDDM. *Diabetes Care.* 1996, 19:1243–8. 10.2337/diacare.19.11.1243
32. Franzke B, Schwingshackl L, Wagner K-H: Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity - A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Mutat Res.* 2020, 786:108343. 10.1016/j.mrrev.2020.108343
33. Cinkilic N, Kiyici S, Celikler S, Vatan O, Oz Gul O, Tuncel E, Bilaloglu R: Evaluation of chromosome aberrations, sister chromatid exchange and micronuclei in patients with type-1 diabetes mellitus. *Mutat Res.* 2009, 676:1–4. 10.1016/j.mrgentox.2009.02.014
34. Colak S, Geyikoglu F, Türkez H, Bakır TÖ, Aslan A: The ameliorative effect of *Cetraria islandica* against diabetes-induced genetic and oxidative damage in human blood. *Pharm Biol.* 2013, 51:1531–7. 10.3109/13880209.2013.801994
35. Vormittag W: Structural chromosomal aberration rates and sister-chromatid exchange frequencies in females with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Mutat Res.* 1985, 143:117–9. 10.1016/s0165-7992(85)80020-8
36. Binici DN, Karaman A, Coşkun M, Oğlu AU, Uçar F: Genomic damage in patients with type-2 diabetes mellitus. *Genet Couns Geneva Switz.* 2013, 24:149–56.
37. Pappuswamy M, Rajesh N, Philip AM: Analysis of Chromosomal Aberrations and Micronuclei in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Asian Pac J Cancer Biol.* 2020, 5:15–8. 10.31557/apjcb.2020.5.1.15-18
38. Boehm BO, Möller P, Högel J, et al.: Lymphocytes of type 2 diabetic women carry a high load of stable chromosomal aberrations: a novel risk factor for disease-related early death. *Diabetes.* 2008, 57:2950–7. 10.2337/db08-0274
39. Anand S, Nath B, Saraswathy R: Diabetes - Increased Risk for Cancers through Chromosomal Aberrations? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014, 15:4571–3. 10.7314/APJCP.2014.15.11.4571
40. Mamur S, Yuzbasioglu D, Altok K, Unal F, Deger SM: Determination of genotoxic effects in hemodialysis patients with chronic kidney disease and the

- role of diabetes mellitus and other biochemical parameters. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019, 844:46–53. 10.1016/j.mrgentox.2019.05.014
41. Pernice F, Floccari F, Caccamo C, et al.: Chromosomal damage and atherosclerosis. A protective effect from simvastatin. *Eur J Pharmacol*. 2006, 532:223–9. 10.1016/j.ejphar.2006.01.003
 42. Deo P, Fenech M, Dhillon VS: Association between glycation biomarkers, hyperglycemia, and micronucleus frequency: A meta -analysis. *Mutat Res Mutat Res*. 2021, 787:108369. 10.1016/j.mrrev.2021.108369
 43. Corbi SCT, Bastos AS, Orrico SRP, Secolin R, Dos Santos RA, Takahashi CS, Scarel-Caminaga RM: Elevated micronucleus frequency in patients with type 2 diabetes, dyslipidemia and periodontitis. *Mutagenesis*. 2014, 29:433–9. 10.1093/mutage/geu043
 44. Prasad M, Bronson SC, Warriar T, et al.: Evaluation of DNA damage in Type 2 diabetes mellitus patients with and without peripheral neuropathy: A study in South Indian population. *J Nat Sci Biol Med*. 2015, 6:80–4. 10.4103/0976-9668.149096
 45. Salimi M, Broumand B, Mozdarani H: Association of elevated frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of type 2 diabetes patients with nephropathy complications. *Mutagenesis*. 2016, 31:627–33. 10.1093/mutage/gew029
 46. Shettigar SKG, Shailaja C, Kulkarni RK: Elevated micronuclei frequency in type 2 diabetes with high glycosylated hemoglobin. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012, 95:246–50. 10.1016/j.diabres.2011.10.025
 47. Grindel A, Brath H, Nersesyan A, Knasmueller S, Wagner K-H: Association of Genomic Instability with HbA1c levels and Medication in Diabetic Patients. *Sci Rep*. 2017, 7:. 10.1038/srep41985
 48. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E: The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*. 2011, 26:77–83. 10.1093/mutage/geq077
 49. Yan S, Wang T, Huang S, et al.: Differential expression of microRNAs in plasma of patients with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2016, 53:693–702. 10.1007/s00592-016-0837-1
 50. Zhang T, Lv C, Li L, Chen S, Liu S, Wang C, Su B: Plasma miR-126 is a potential biomarker for early prediction of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *BioMed Res Int*. 2013, 2013:761617. 10.1155/2013/761617
 51. Zhang T, Li L, Shang Q, Lv C, Wang C, Su B: Circulating miR-126 is a potential biomarker to predict the onset of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 463:60–3. 10.1016/j.bbrc.2015.05.017
 52. Willeit P, Skrobilin P, Moschen AR, et al.: Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2017, 66:347–57. 10.2337/db16-0731

53. Seyhan AA: microRNAs with different functions and roles in disease development and as potential biomarkers of diabetes: progress and challenges. *Mol Biosyst.* 2015, 11:1217–34. 10.1039/c5mb00064e
54. Zhang Y, Bai R, Liu C, Ma C, Chen X, Yang J, Sun D: MicroRNA single-nucleotide polymorphisms and diabetes mellitus: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2019, 95:451–61. 10.1111/cge.13491
55. Barutta F, Bellini S, Mastrocola R, Bruno G, Gruden G: MicroRNA and Microvascular Complications of Diabetes. *Int J Endocrinol.* 2018, 2018:6890501. 10.1155/2018/6890501
56. Ziegler D, Tesfaye S, Spallone V, et al.: Screening, diagnosis and management of diabetic sensorimotor polyneuropathy in clinical practice: International expert consensus recommendations. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022, 186:109063. 10.1016/j.diabres.2021.109063
57. Spallone V, Bellavere F, Scionti L, et al.: Recommendations for the use of cardiovascular tests in diagnosing diabetic autonomic neuropathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* 2011, 21:69–78. 10.1016/j.numecd.2010.07.005
58. Rodiklių duomenų bazė - Oficialiosios statistikos portalas. Accessed: October 19, 2022. <https://osp.stat.gov.lt/statistiniu-rodikliu-analize?hash=425a7fb3-0275-41f4-a743-5cf0bb16f860#/>.
59. Higienos institutas. Accessed: October 22, 2022. https://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=168.
60. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, et al.: 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care.* 2023, 46:S19–40. 10.2337/dc23-S002
61. Cole JB, Florez JC: Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol.* 2020, 16:377–90. 10.1038/s41581-020-0278-5
62. Undlien DE, Lie BA, Thorsby E: HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genet TIG.* 2001, 17:93–100. 10.1016/s0168-9525(00)02180-6
63. Forbes JM, Cooper ME: Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev.* 2013, 93:137–88. 10.1152/physrev.00045.2011
64. Park Y: Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007, 77 Suppl 1:S110-115. 10.1016/j.diabres.2007.01.043
65. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA: The crucial role of IL-2/IL-2RA-mediated immune regulation in the pathogenesis of type 1 diabetes, an evidence coming from genetic and animal model studies. *Immunol Lett.* 2008, 118:1–5. 10.1016/j.imlet.2008.03.002
66. Hughes JW, Riddlesworth TD, DiMeglio LA, Miller KM, Rickels MR, McGill JB, T1D Exchange Clinic Network: Autoimmune Diseases in Children and Adults With Type 1 Diabetes From the T1D Exchange Clinic Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016, 101:4931–7. 10.1210/jc.2016-2478

67. Tillil H, Köbberling J: Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes*. 1987, 36:93–9. 10.2337/diab.36.1.93
68. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, et al.: Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 1992, 35:1060–7. 10.1007/BF02221682
69. Flannick J, Florez JC: Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. *Nat Rev Genet*. 2016, 17:535–49. 10.1038/nrg.2016.56
70. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, et al.: The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016, 536:41–7. 10.1038/nature18642
71. Zheng Y, Ley SH, Hu FB: Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018, 14:88–98. 10.1038/nrendo.2017.151
72. Ali O: Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013, 4:114–23. 10.4239/wjd.v4.i4.114
73. McCarthy MI: Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med*. 2010, 363:2339–50. 10.1056/NEJMra0906948
74. Galuška D, Dlouhá L, Hubáček JA, Kaňová K: Genetics of T2DM and Its Chronic Complications: Are We Any Closer to the Individual Prediction of Genetic Risk? *Folia Biol (Praha)*. 2022, 68:159–79.
75. Butler AE, Misselbrook D: Distinguishing between type 1 and type 2 diabetes. *BMJ*. 2020, 370:m2998. 10.1136/bmj.m2998
76. Papatheodorou K, Papanas N, Banach M, Papazoglou D, Edmonds M: Complications of Diabetes 2016. *J Diabetes Res*. 2016, 2016:6989453. 10.1155/2016/6989453
77. Alkayyali S, Lyssenko V: Genetics of diabetes complications. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. 2014, 25:384–400. 10.1007/s00335-014-9543-x
78. Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J, Abi Khalil C: Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *BioMed Res Int*. 2017, 2017:. 10.1155/2017/7839101
79. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. 1998, 352:837–53. 10.1016/S0140-6736(98)07019-6
80. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, et al.: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993, 329:977–86. 10.1056/NEJM199309303291401
81. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW: 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2008, 359:1577–89. 10.1056/NEJMoa0806470

82. Nathan DM, for the DCCT/EDIC Research Group: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care*. 2013, 37:9–16. 10.2337/dc13-2112
83. Marx N, Federici M, Schütt K, et al.: 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes: Developed by the task force on the management of cardiovascular disease in patients with diabetes of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2023, ehad192. 10.1093/eurheartj/ehad192
84. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, et al.: Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008, 358:2560–72. 10.1056/NEJMoa0802987
85. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, et al.: Glucose Control and Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2009, 360:129–39. 10.1056/NEJMoa0808431
86. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, et al.: Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *The Lancet*. 2010, 376:419–30. 10.1016/S0140-6736(10)60576-4
87. Currie CJ, Peters JR, Tynan A, et al.: Survival as a function of HbA1c in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2010, 375:481–9. 10.1016/S0140-6736(09)61969-3
88. Zoungas S, Chalmers J, Ninomiya T, et al.: Association of HbA1c levels with vascular complications and death in patients with type 2 diabetes: evidence of glycaemic thresholds. *Diabetologia*. 2012, 55:636–43. 10.1007/s00125-011-2404-1
89. Franz MJ, Boucher JL, Rutten-Ramos S, VanWormer JJ: Lifestyle Weight-Loss Intervention Outcomes in Overweight and Obese Adults with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Acad Nutr Diet*. 2015, 115:1447–63. 10.1016/j.jand.2015.02.031
90. Look AHEAD Research Group: Effects of Intensive Lifestyle Intervention on All-Cause Mortality in Older Adults With Type 2 Diabetes and Overweight/Obesity: Results From the Look AHEAD Study. *Diabetes Care*. 2022, 45:1252–9. 10.2337/dc21-1805
91. Sluik D, Buijsse B, Muckelbauer R, et al.: Physical Activity and Mortality in Individuals With Diabetes Mellitus: A Prospective Study and Meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2012, 172:1285–95. 10.1001/archinternmed.2012.3130
92. Grenet G, Le HH, Bejan-Angoulvant T, et al.: Association between difference in blood pressure reduction and risk of cardiovascular events in a type 2 diabetes population: A meta-regression analysis. *Diabetes Metab*. 2019, 45:550–6. 10.1016/j.diabet.2019.05.003
93. Fox CS, Golden SH, Anderson C, et al.: Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of

- Recent Evidence. *Circulation*. 2015, 132:691–718. 10.1161/CIR.0000000000000230
94. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D: Comparative Dose Efficacy Study of Atorvastatin Versus Simvastatin, Pravastatin, Lovastatin, and Fluvastatin in Patients With Hypercholesterolemia (The CURVES Study) fn1. *Am J Cardiol*. 1998, 81:582–7. 10.1016/S0002-9149(97)00965-X
 95. Critchley JA, Capewell S: Mortality Risk Reduction Associated With Smoking Cessation in Patients With Coronary Heart Disease: A Systematic Review. *JAMA*. 2003, 290:86–97. 10.1001/jama.290.1.86
 96. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, et al.: Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2018, 379:633–44. 10.1056/NEJMoa1800256
 97. Gæde P, Lund-Andersen H, Parving H-H, Pedersen O: Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2008, 358:580–91. 10.1056/NEJMoa0706245
 98. Sloan G, Selvarajah D, Tesfaye S: Pathogenesis, diagnosis and clinical management of diabetic sensorimotor peripheral neuropathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2021, 17:400–20. 10.1038/s41574-021-00496-z
 99. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, de Souza BM, Bauer AC, Crispim D: MicroRNAs and diabetic kidney disease: Systematic review and bioinformatic analysis. *Mol Cell Endocrinol*. 2018, 477:90–102. 10.1016/j.mce.2018.06.005
 100. Dahlström E, Sandholm N: Progress in Defining the Genetic Basis of Diabetic Complications. *Curr Diab Rep*. 2017, 17:80. 10.1007/s11892-017-0906-z
 101. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, et al.: Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017, 40:136–54. 10.2337/dc16-2042
 102. Dyck PJ, Melton LJ, O'Brien PC, Service FJ: Approaches to Improve Epidemiological Studies of Diabetic Neuropathy: Insights from the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Diabetes*. 1997, 46:S5–8. 10.2337/diab.46.2.S5
 103. Agashe S, Petak S: Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*. 2018, 14:251–6. 10.14797/mdcj-14-4-251
 104. Abraitienė A, Atstupėnaitė V, Badarienė J, et al.: Diabetas ir kardiovaskulinė rizika : monografija. Kaunas : Medicininės informacijos centras; 2020.
 105. Aglinskienė K: SERGANČIŲJŲ 2 TIPO CUKRINIŲ DIABETU NERVINIO AUDINIO PAKENKIMO IR GYVENIMO KOKYBĖS TYRIMAS. 132.
 106. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, et al.: Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ*. 2004, 328:1105. 10.1136/bmj.38070.450891.FE
 107. de Boer IH, Sibley SD, Kestenbaum B, et al.: Central obesity, incident microalbuminuria, and change in creatinine clearance in the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2007, 18:235–43. 10.1681/ASN.2006040394

108. Song K-H, Jeong J-S, Kim MK, Kwon H-S, Baek K-H, Ko S-H, Ahn Y-B: Discordance in risk factors for the progression of diabetic retinopathy and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2019, 10:745–52. 10.1111/jdi.12953
109. Hainsworth DP, Gangula A, Ghoshdastidar S, Kannan R, Upendran A: Diabetic Retinopathy Screening Using a Gold Nanoparticle-Based Paper Strip Assay for the At-Home Detection of the Urinary Biomarker 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine. *Am J Ophthalmol.* 2020, 213:306–19. 10.1016/j.ajo.2020.01.032
110. Spallone V: Update on the Impact, Diagnosis and Management of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Diabetes: What Is Defined, What Is New, and What Is Unmet. *Diabetes Metab J.* 2019, 43:3–30. 10.4093/dmj.2018.0259
111. Fisher VL, Tahrani AA: Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2017, Volume 10:419–34. 10.2147/DMSO.S129797
112. Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Smith DG: Risk Factors for Diabetic Peripheral Sensory Neuropathy: Results of the Seattle Prospective Diabetic Foot Study. *Diabetes Care.* 1997, 20:1162–7. 10.2337/diacare.20.7.1162
113. Herman WH, Aubert RE, Engelgau MM, et al.: Diabetes mellitus in Egypt: glycaemic control and microvascular and neuropathic complications. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1998, 15:1045–51. 10.1002/(SICI)1096-9136(1998120)15:12<1045::AID-DIA696>3.0.CO;2-L
114. Varma R, Macias GL, Torres M, Klein R, Peña FY, Azen SP: Biologic Risk Factors Associated with Diabetic Retinopathy: The Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology.* 2007, 114:1332–40. 10.1016/j.ophtha.2006.10.023
115. Pop-Busui R, Low PA, Waberski BH, et al.: Effects of prior intensive insulin therapy on cardiac autonomic nervous system function in type 1 diabetes mellitus: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (DCCT/EDIC). *Circulation.* 2009, 119:2886–93. 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.837369
116. Pop-Busui R, Herman WH, Feldman EL, et al.: DCCT and EDIC Studies in Type 1 Diabetes: Lessons for Diabetic Neuropathy Regarding Metabolic Memory and Natural History. *Curr Diab Rep.* 2010, 10:276–82. 10.1007/s11892-010-0120-8
117. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group, Lachin JM, White NH, Hainsworth DP, Sun W, Cleary PA, Nathan DM: Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes.* 2015, 64:631–42. 10.2337/db14-0930

118. DCCT/EDIC research group: Effect of intensive diabetes treatment on albuminuria in type 1 diabetes: long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014, 2:793–800. 10.1016/S2213-8587(14)70155-X
119. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive diabetes therapy on measures of autonomic nervous system function in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Diabetologia.* 1998, 41:416–23. 10.1007/s001250050924
120. Reichard P, Pihl M, Rosenqvist U, Sule J: Complications in IDDM are caused by elevated blood glucose level: the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) at 10-year follow up. *Diabetologia.* 1996, 39:1483–8. 10.1007/s001250050602
121. Hainsworth DP, Bebu I, Aiello LP, et al.: Risk Factors for Retinopathy in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study. *Diabetes Care.* 2019, 42:875–82. 10.2337/dc18-2308
122. Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, et al.: Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia.* 1996, 39:1377–84. 10.1007/s001250050586
123. Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, et al.: Diabetic neuropathy in Mauritius: prevalence and risk factors. *Diabetes Res Clin Pract.* 1998, 42:131–9. 10.1016/S0168-8227(98)00100-4
124. Freeman R: Diabetic autonomic neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2014, 126:63–79. 10.1016/B978-0-444-53480-4.00006-0
125. Young MJ, Breddy JL, Veves A, Boulton AJM: The Prediction of Diabetic Neuropathic Foot Ulceration Using Vibration Perception Thresholds: A prospective study. *Diabetes Care.* 1994, 17:557–60. 10.2337/diacare.17.6.557
126. Pop-Busui R, Braffett BH, Zinman B, et al.: Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Cardiovascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes Care.* 2017, 40:94–100. 10.2337/dc16-1397
127. Low PA, Benrud-Larson LM, Sletten DM, et al.: Autonomic Symptoms and Diabetic Neuropathy: A population-based study. *Diabetes Care.* 2004, 27:2942–7. 10.2337/diacare.27.12.2942
128. Ziegler D: Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Rev.* 1994, 10:339–83. 10.1002/dmr.5610100403
129. Pfeifer MA, Weinberg CR, Cook DL, Reenan A, Halter JB, Ensink JW, Porte D: Autonomic neural dysfunction in recently diagnosed diabetic subjects. *Diabetes Care.* 1984, 7:447–53. 10.2337/diacare.7.5.447

130. Walters D p., Catling W, Mullee M a., Hill R d.: The Prevalence of Diabetic Distal Sensory Neuropathy in an English Community. *Diabet Med.* 1992, 9:349–53. 10.1111/j.1464-5491.1992.tb01795.x
131. Witte DR, Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SEM, Kempler P, Fuller JH, EURODIAB Prospective Complications Study Group: Risk factors for cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2005, 48:164–71. 10.1007/s00125-004-1617-y
132. Bloom S, Till S, Sönksen P, Smith S: Use of a biothesiometer to measure individual vibration thresholds and their variation in 519 non-diabetic subjects. *Br Med J Clin Res Ed.* 1984, 288:1793–5. 10.1136/bmj.288.6433.1793
133. Wiles PG, Pearce SM, Rice PJS, Mitchell JMO: Vibration Perception Threshold: Influence of Age, Height, Sex, and Smoking, and Calculation of Accurate Centile Values. *Diabet Med.* 1991, 8:157–61. 10.1111/j.1464-5491.1991.tb01563.x
134. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al.: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005, 112:2735–52. 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404
135. Chung JO, Park S-Y, Cho DH, Chung DJ, Chung MY: Anemia, bilirubin, and cardiovascular autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Medicine (Baltimore).* 2017, 96:e6586. 10.1097/MD.00000000000006586
136. Dimova R, Tankova T, Guergueltcheva V, Tournev I, Chakarova N, Grozeva G, Dakovska L: Risk factors for autonomic and somatic nerve dysfunction in different stages of glucose tolerance. *J Diabetes Complications.* 2017, 31:537–43. 10.1016/j.jdiacomp.2016.11.002
137. Valensi P, Pariès J, Attali JR: Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications—the french multicenter study. *Metab - Clin Exp.* 2003, 52:815–20. 10.1016/S0026-0495(03)00095-7
138. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS: Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2003, 348:2285–93. 10.1056/NEJMoa021835
139. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A, KORA Study Group: Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care.* 2008, 31:464–9. 10.2337/dc07-1796
140. Cheng Y, Zhang H, Chen R, et al.: Cardiometabolic risk profiles associated with chronic complications in overweight and obese type 2 diabetes patients in South China. *PloS One.* 2014, 9:e101289. 10.1371/journal.pone.0101289
141. Costa LA, Canani LH, Lisbôa HRK, Tres GS, Gross JL: Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2004, 21:252–5. 10.1111/j.1464-5491.2004.01124.x

142. Zhang X, Saaddine JB, Chou C-F, et al.: Prevalence of Diabetic Retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA*. 2010, 304:649–56. 10.1001/jama.2010.1111
143. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al.: UKPDS 50: Risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001, 44:156–63. 10.1007/s001250051594
144. Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L: The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 2001, 44:1148–54. 10.1007/s001250100615
145. Pop-Busui R, Evans GW, Gerstein HC, et al.: Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Diabetes Care*. 2010, 33:1578–84. 10.2337/dc10-0125
146. Kempler P, Tesfaye S, Chaturvedi N, et al.: Autonomic neuropathy is associated with increased cardiovascular risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2002, 19:900–9. 10.1046/j.1464-5491.2002.00821.x
147. Charles M, Fleischer J, Witte DR, Ejekjaer N, Borch-Johnsen K, Lauritzen T, Sandbaek A: Impact of early detection and treatment of diabetes on the 6-year prevalence of cardiac autonomic neuropathy in people with screen-detected diabetes: ADDITION-Denmark, a cluster-randomised study. *Diabetologia*. 2013, 56:101–8. 10.1007/s00125-012-2744-5
148. Gambaro G, Bax G, Fusaro M, et al.: Cigarette smoking is a risk factor for nephropathy and its progression in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab*. 2001, 14:337–42.
149. Gaedt Thorlund M, Borg Madsen M, Green A, Sjølie AK, Grauslund J: Is Smoking a Risk Factor for Proliferative Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes? *Ophthalmologica*. 2013, 230:50–4. 10.1159/000350813
150. Sands ML, Shetterly SM, Franklin GM, Hamman RF: Incidence of distal symmetric (sensory) neuropathy in NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1997, 20:322–9. 10.2337/diacare.20.3.322
151. Astrup AS, Tarnow L, Rossing P, Hansen BV, Hilsted J, Parving H-H: Cardiac Autonomic Neuropathy Predicts Cardiovascular Morbidity and Mortality in Type 1 Diabetic Patients With Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care*. 2006, 29:334–9. 10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1242
152. Wirta O, Pasternack A, Mustonen J, Laippala P: Renal and cardiovascular predictors of 9-year total and sudden cardiac mortality in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Nephrol Dial Transplant*. 1997, 12:2612–7. 10.1093/ndt/12.12.2612
153. Ziegler D, Papanas N, Vinik AI, Shaw JE: Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes. *Handb Clin Neurol*. 2014, 126:3–22. 10.1016/B978-0-444-53480-4.00001-1

154. Pop-Busui R, Ang L, Boulton AJM, et al.: Diagnosis and Treatment of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. American Diabetes Association: Arlington (VA); 2022.
155. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al.: Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primer*. 2019, 5:42. 10.1038/s41572-019-0097-9
156. Alam U, Sloan G, Tesfaye S: Treating Pain in Diabetic Neuropathy: Current and Developmental Drugs. *Drugs*. 2020, 80:363–84. 10.1007/s40265-020-01259-2
157. Jensen TS, Finnerup NB: Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol*. 2014, 13:924–35. 10.1016/S1474-4422(14)70102-4
158. Ang L, Cowdin N, Mizokami-Stout K, Pop-Busui R: Update on the Management of Diabetic Neuropathy. *Diabetes Spectr Publ Am Diabetes Assoc*. 2018, 31:224–33. 10.2337/ds18-0036
159. Dotson RM: Clinical neurophysiology laboratory tests to assess the nociceptive system in humans. *J Clin Neurophysiol Off Publ Am Electroencephalogr Soc*. 1997, 14:32–45. 10.1097/00004691-199701000-00003
160. Masson EA, Veves A, Fernando D, Boulton AJ: Current perception thresholds: a new, quick, and reproducible method for the assessment of peripheral neuropathy in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989, 32:724–8. 10.1007/BF00274531
161. Wallace MS, Dyck BJ, Rossi SS, Yaksh TL: Computer-controlled lidocaine infusion for the evaluation of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*. 1996, 66:69–77. 10.1016/0304-3959(96)02980-6
162. Visockiene Z: SERGANČIŲJŲ DIABETINĖ POLINEUROPATIJA STAMBIŲJŲ MIELINIZUOTŲ SKAIDULŲ PAŽEIDIMO ĮVERTINIMAS KAMERTONU C 128 IR NEUROMETRU. 2017.
163. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, et al.: Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*. 2010, 33:2285–93. 10.2337/dc10-1303
164. Carmichael J, Fadavi H, Ishibashi F, Shore AC, Tavakoli M: Advances in Screening, Early Diagnosis and Accurate Staging of Diabetic Neuropathy. *Front Endocrinol*. 2021, 12:671257. 10.3389/fendo.2021.671257
165. Won JC, Park TS: Recent Advances in Diagnostic Strategies for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Endocrinol Metab Seoul Korea*. 2016, 31:230–8. 10.3803/EnM.2016.31.2.230
166. V-159 Dėl Cukrinio diabeto ir tarpinės hiperglikemijos diagnostikos ir gydymo vaistais, kurių įsigijimo... Accessed: September 18, 2023. <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.419228>.
167. Lozano T, Ena J: Cardiovascular autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *Rev Clin Esp*. 2017, 217:46–54. 10.1016/j.rce.2016.07.004
168. Lykke JA, Tarnow L, Parving HH, Hilsted J: A combined abnormality in heart rate variation and QT corrected interval is a strong predictor of cardiovascular

- death in type 1 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008, 68:654–9. 10.1080/00365510802018330
169. Mazzeo AT, La Monaca E, Di Leo R, Vita G, Santamaria LB: Heart rate variability: a diagnostic and prognostic tool in anesthesia and intensive care. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011, 55:797–811. 10.1111/j.1399-6576.2011.02466.x
 170. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM: Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *J Diabetes Investig.* 2013, 4:4–18. 10.1111/jdi.12042
 171. Nauman J, Janszky I, Vatten LJ, Wisløff U: Temporal changes in resting heart rate and deaths from ischemic heart disease. *JAMA.* 2011, 306:2579–87. 10.1001/jama.2011.1826
 172. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, et al.: Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011, 27:639–53. 10.1002/dmrr.1239
 173. Vinik AI, Maser RE, Ziegler D: Autonomic imbalance: prophet of doom or scope for hope? *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2011, 28:643–51. 10.1111/j.1464-5491.2010.03184.x
 174. Vinik AI, Maser RE, Ziegler D: Neuropathy: the crystal ball for cardiovascular disease? *Diabetes Care.* 2010, 33:1688–90. 10.2337/dc10-0745
 175. Vinik Aaron I, Ziegler Dan: Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Circulation.* 2007, 115:387–97. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634949
 176. Cabezas-Cerrato J, Hermida RC, Cabezas-Agricola JM, Ayala DE: Cardiac autonomic neuropathy, estimated cardiovascular risk, and circadian blood pressure pattern in diabetes mellitus. *Chronobiol Int.* 2009, 26:942–57. 10.1080/07420520903044448
 177. Pop-Busui R: Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes. *Diabetes Care.* 2010, 33:434–41. 10.2337/dc09-1294
 178. Isaacson SH, Dashtipour K, Mehdirad AA, Peltier AC: Management Strategies for Comorbid Supine Hypertension in Patients with Neurogenic Orthostatic Hypotension. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021, 21:18. 10.1007/s11910-021-01104-3
 179. Kitamura A, Hoshino T, Kon T, Ogawa R: Patients with diabetic neuropathy are at risk of a greater intraoperative reduction in core temperature. *Anesthesiology.* 2000, 92:1311–8. 10.1097/00000542-200005000-00019
 180. Burgos LG, Ebert TJ, Asiddao C, Turner LA, Pattison CZ, Wang-Cheng R, Kampine JP: Increased intraoperative cardiovascular morbidity in diabetics with autonomic neuropathy. *Anesthesiology.* 1989, 70:591–7. 10.1097/00000542-198904000-00006
 181. Spallone V, Morganti R, Fedele T, D’Amato C, Maiello MR: Reappraisal of the diagnostic role of orthostatic hypotension in diabetes. *Clin Auton Res Off J Clin Auton Res Soc.* 2009, 19:58–64. 10.1007/s10286-009-0517-0

182. Serhiyenko VA, Serhiyenko AA: Cardiac autonomic neuropathy: Risk factors, diagnosis and treatment. *World J Diabetes*. 2018, 9:1–24. 10.4239/wjd.v9.i1.1
183. Isaacson SH: Managed care approach to the treatment of neurogenic orthostatic hypotension. *Am J Manag Care*. 2015, 21:s258-268.
184. Shakespeare CF, Katritsis D, Crowther A, Cooper IC, Coltart JD, Webb-Peploe MW: Differences in autonomic nerve function in patients with silent and symptomatic myocardial ischaemia. *Br Heart J*. 1994, 71:22–9. 10.1136/hrt.71.1.22
185. Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers | Clinical Diabetes | American Diabetes Association. Accessed: November 21, 2022. <https://diabetesjournals.org/clinical/article/40/1/10/139035/Standards-of-Medical-Care-in-Diabetes-2022>.
186. Brownlee M: The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005, 54:1615–25. 10.2337/diabetes.54.6.1615
187. Hosseini A, Abdollahi M: Diabetic Neuropathy and Oxidative Stress: Therapeutic Perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2013, 2013:e168039. 10.1155/2013/168039
188. Reynolds L, Luo Z, Singh K: Diabetic complications and prospective immunotherapy. *Front Immunol*. 2023, 14:1219598. 10.3389/fimmu.2023.1219598
189. Mahmood D, Singh BK, Akhtar M: Diabetic neuropathy: therapies on the horizon. *J Pharm Pharmacol*. 2009, 61:1137–45. 10.1211/jpp/61.09.0002
190. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL: Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther*. 2008, 120:1–34. 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005
191. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL: Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*. 2012, 11:521–34. 10.1016/S1474-4422(12)70065-0
192. Babizhayev MA, Stokov IA, Nosikov VV, Savel'yeva EL, Sitnikov VF, Yegor E, Yegorov, Lankin VZ: The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients. *Cell Biochem Biophys*. 2015, 71:1425–43. 10.1007/s12013-014-0365-y
193. Viader A, Sasaki Y, Kim S, et al.: Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. *Neuron*. 2013, 77:886–98. 10.1016/j.neuron.2013.01.012
194. Smith S, Normahani P, Lane T, Hohenschurz-Schmidt D, Oliver N, Davies AH: Pathogenesis of Distal Symmetrical Polyneuropathy in Diabetes. *Life*. 2022, 12:1074. 10.3390/life12071074

195. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K: Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig.* 2011, 2:18–32. 10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x
196. Feldman EL, Nave K-A, Jensen TS, Bennett DLH: New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron.* 2017, 93:1296–313. 10.1016/j.neuron.2017.02.005
197. Rumora AE, Savelieff MG, Sakowski SA, Feldman EL: Disorders of mitochondrial dynamics in peripheral neuropathy: Clues from hereditary neuropathy and diabetes. *Int Rev Neurobiol.* 2019, 145:127–76. 10.1016/bs.irn.2019.05.002
198. Ahlqvist E, van Zuydam NR, Groop LC, McCarthy MI: The genetics of diabetic complications. *Nat Rev Nephrol.* 2015, 11:277–87. 10.1038/nrneph.2015.37
199. Callaghan BC, Gallagher G, Fridman V, Feldman EL: Diabetic neuropathy: what does the future hold? *Diabetologia.* 2020, 63:891–7. 10.1007/s00125-020-05085-9
200. Ang L, Mizokami-Stout K, Eid SA, Elafros M, Callaghan B, Feldman EL, Pop-Busui R: The conundrum of diabetic neuropathies—Past, present, and future. *J Diabetes Complications.* 2022, 36:108334. 10.1016/j.jdiacomp.2022.108334
201. O'Bryan GT, Hostetter TH: The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 1997, 17:93–100.
202. Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001, 104:503–16. 10.1016/s0092-8674(01)00238-0
203. Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995, 57:791–804. 10.1146/annurev.ph.57.030195.004043
204. Look AHEAD Research Group, Wing RR: Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial. *Arch Intern Med.* 2010, 170:1566–75. 10.1001/archinternmed.2010.334
205. American Diabetes Association Professional Practice Committee: 6. Glycemic Targets: *Standards of Medical Care in Diabetes—2022.* *Diabetes Care.* 2022, 45:S83–96. 10.2337/dc22-S006
206. The American Diabetes Association Releases the Standards of Care in Diabetes—2024. Accessed: August 24, 2024. <https://diabetes.org/newsroom/press-releases/american-diabetes-association-releases-standards-care-diabetes-2024>.
207. Ziegler D: Pathogenetic treatments for diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2023, 206 Suppl 1:110764. 10.1016/j.diabres.2023.110764
208. Packer L, Kraemer K, Rimbach G: Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2001, 17:888–95. 10.1016/s0899-9007(01)00658-x
209. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B: Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol RTP.* 2006, 46:29–41. 10.1016/j.yrtph.2006.06.004

210. Gomes MB, Negrato CA: Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol Metab Syndr.* 2014, 6:80. 10.1186/1758-5996-6-80
211. Santos JM, Kowluru RA: Role of mitochondria biogenesis in the metabolic memory associated with the continued progression of diabetic retinopathy and its regulation by lipoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011, 52:8791–8. 10.1167/iovs.11-8203
212. Nebbioso M, Federici M, Rusciano D, Evangelista M, Pescosolido N: Oxidative stress in preretinopathic diabetes subjects and antioxidants. *Diabetes Technol Ther.* 2012, 14:257–63. 10.1089/dia.2011.0172
213. Haritoglou C, Gerss J, Hammes HP, Kampik A, Ulbig MW, RETIPON Study Group: Alpha-lipoic acid for the prevention of diabetic macular edema. *Ophthalmol J Int Ophthalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd.* 2011, 226:127–37. 10.1159/000329470
214. Wang L, Wu C-G, Fang C-Q, et al.: The protective effect of α -Lipoic acid on mitochondria in the kidney of diabetic rats. *Int J Clin Exp Med.* 2013, 6:90–7.
215. Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT, Welch WJ, Maric C: Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. *Kidney Int.* 2005, 67:1371–80. 10.1111/j.1523-1755.2005.00214.x
216. Yi X, Xu L, Hiller S, Kim H-S, Nickeleit V, James LR, Maeda N: Reduced expression of lipoic acid synthase accelerates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2012, 23:103–11. 10.1681/ASN.2011010003
217. Chang JW, Lee EK, Kim TH, et al.: Effects of alpha-lipoic acid on the plasma levels of asymmetric dimethylarginine in diabetic end-stage renal disease patients on hemodialysis: a pilot study. *Am J Nephrol.* 2007, 27:70–4. 10.1159/000099035
218. Noori N, Tabibi H, Hosseinpanah F, Hedayati M, Nafar M: Effects of combined lipoic acid and pyridoxine on albuminuria, advanced glycation end-products, and blood pressure in diabetic nephropathy. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam-Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 2013, 83:77–85. 10.1024/0300-9831/a000147
219. Morcos M, Borcea V, Isermann B, et al.: Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001, 52:175–83. 10.1016/s0168-8227(01)00223-6
220. Papanas N, Ziegler D: Efficacy of α -lipoic acid in diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother.* 2014, 15:2721–31. 10.1517/14656566.2014.972935
221. Sharma R, Dy S: Non-pharmacologic treatments for symptoms of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review. *Curr Med Res Opin.* Published Online First: 17 August 2018. 10.1080/03007995.2018.1497958

222. Hsieh R-Y, Huang I-C, Chen C, Sung J-Y: Effects of Oral Alpha-Lipoic Acid Treatment on Diabetic Polyneuropathy: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Nutrients*. 2023, 15:3634. 10.3390/nu15163634
223. Cassanogo G, Rodrigues P, De Freitas Bauermann L, Trevisan G: Evaluation of the analgesic effect of α -lipoic acid in treating pain disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 2022, 177:106075. 10.1016/j.phrs.2022.106075
224. Çakici N, Fakkkel TM, van Neck JW, Verhagen AP, Coert JH: Systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med*. 2016, 33:1466–76. 10.1111/dme.13083
225. Mendoza-Núñez VM, García-Martínez BI, Rosado-Pérez J, Santiago-Osorio E, Pedraza-Chaverri J, Hernández-Abad VJ: The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 2019:3276958. 10.1155/2019/3276958
226. Huang EA, Gitelman SE: The effect of oral alpha-lipoic acid on oxidative stress in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2008, 9:69–73. 10.1111/j.1399-5448.2007.00342.x
227. Abdel Hamid DZ, Nienaa YA, Mostafa TM: Alpha-lipoic acid improved anemia, erythropoietin resistance, maintained glycemic control, and reduced cardiovascular risk in diabetic patients on hemodialysis: a multi-center prospective randomized controlled study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022, 26:2313–29. 10.26355/eurrev_202204_28461
228. Huang Y, Wang L, Chen Y, Han H, Li Q: Lipoic Acid-Modified Oligoethyleneimine-Mediated miR-34a Delivery to Achieve the Anti-Tumor Efficacy. *Mol Basel Switz*. 2021, 26:4827. 10.3390/molecules26164827
229. Khalife H, Fayyad-Kazan M, Fayyad-Kazan H, Hadchity E, Borghol N, Hussein N, Badran B: Lipoic acid alters the microRNA signature in breast cancer cells. *Pathol Res Pract*. 2024, 257:155321. 10.1016/j.prp.2024.155321
230. Nederveen JP, Mastrolonardo AJ, Xhuti D, Di Carlo A, Manta K, Fuda MR, Tarnopolsky MA: Novel Multi-Ingredient Supplement Facilitates Weight Loss and Improves Body Composition in Overweight and Obese Individuals: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2023, 15:3693. 10.3390/nu15173693
231. Li Y, Jia Y: Effect of miR-146a polymorphism on lipoic acid therapy in patients with T2DM peripheral polyneuropathy. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 2023, 69:38–43. 10.14715/cmb/2023.69.12.7
232. Biomarkers Definitions Working Group.: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001, 69:89–95. 10.1067/mcp.2001.113989
233. Strimbu K, Tavel JA: What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010, 5:463–6. 10.1097/COH.0b013e32833ed177

234. American Diabetes Association Releases 2023 Standards of Care in Diabetes to Guide Prevention, Diagnosis, and Treatment for People Living with Diabetes | American Diabetes Association. Accessed: August 24, 2024. <https://diabetes.org/newsroom/american-diabetes-association-2023-standards-care-diabetes-guide-for-prevention-diagnosis-treatment-people-living-with-diabetes>.
235. Kreienkamp RJ, Voight BF, Gloyn AL, Udler MS: Genetics of Type 2 Diabetes. In: Lawrence JM, Casagrande SS, Herman WH, Wexler DJ, Cefalu WT, eds. Diabetes in America. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK): Bethesda (MD); 2023.
236. Redondo MJ, Onengut-Gumuscu S, Gaulton KJ: Genetics of Type 1 Diabetes. In: Lawrence JM, Casagrande SS, Herman WH, Wexler DJ, Cefalu WT, eds. Diabetes in America. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK): Bethesda (MD); 2023.
237. Sebastiani G, Nigi L, Grieco GE, Mancarella F, Ventriglia G, Dotta F: Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *J Endocrinol Invest*. 2017, 40:591–610. 10.1007/s40618-017-0611-4
238. Rosen ED, Kaestner KH, Natarajan R, Patti M-E, Sallari R, Sander M, Susztak K: Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. *Diabetes*. 2018, 67:1923–31. 10.2337/db18-0537
239. Dobosz AM, Dziewulska A, Dobrzyń A: Spotlight on epigenetics as a missing link between obesity and type 2 diabetes. *Postepy Biochem*. 2018, 64:157–65. 10.18388/pb.2018_126
240. Rönn T, Ling C: DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*. 2015, 7:451–60. 10.2217/epi.15.7
241. Shigenaga MK, Ames BN: Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991, 10:211–6. 10.1016/0891-5849(91)90078-h
242. David SS, O'Shea VL, Kundu S: Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature*. 2007, 447:941–50. 10.1038/nature05978
243. Wang P, Liu Q, Lee S: Diabetes-associated oxidative damage to DNA base in colon cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2019, 51:542–4. 10.1093/abbs/gmz010
244. Xu GW, Yao QH, Weng QF, Su BL, Zhang X, Xiong JH: Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2004, 36:101–4. 10.1016/j.jpba.2004.04.016
245. Cejvanovic V, Asferg C, Kjær LK, et al.: Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016, 76:620–5. 10.1080/00365513.2016.1230776
246. Kant M, Akış M, Çalan M, Arkan T, Bayraktar F, Dizdaroglu M, İşlekel H: Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2α as potential

- biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair*. 2016, 48:1–7. 10.1016/j.dnarep.2016.09.004
247. Serdar M, Sertoglu E, Uyanik M, Tapan S, Akin K, Bilgi C, Kurt I: Comparison of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy. *Free Radic Res*. 2012, 46:1291–5. 10.3109/10715762.2012.710902
 248. Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF: Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes--Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clin Biochem*. 2015, 48:581–5. 10.1016/j.clinbiochem.2015.02.015
 249. Tatsch E, De Carvalho JAM, Hausen BS, et al.: Oxidative DNA damage is associated with inflammatory response, insulin resistance and microvascular complications in type 2 diabetes. *Mutat Res*. 2015, 782:17–22. 10.1016/j.mrfmmm.2015.10.003
 250. Liu X, Gan W, Zou Y, et al.: Elevated Levels of Urinary Markers of Oxidative DNA and RNA Damage in Type 2 Diabetes with Complications. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 2016:4323198. 10.1155/2016/4323198
 251. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, et al.: New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*. 1997, 417:150–2. 10.1016/s0014-5793(97)01273-8
 252. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF: Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2011, 164:899–904. 10.1530/EJE-11-0053
 253. Dong QY, Cui Y, Chen L, Song J, Sun L: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels in diabetic retinopathy patients. *Eur J Ophthalmol*. 2008, 18:94–8. 10.1177/112067210801800116
 254. Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, et al.: Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003, 26:1507–12. 10.2337/diacare.26.5.1507
 255. Bolajoko EB, Mossanda KS, Adeniyi F, Akinosun O, Fasanmade A, Moropane M: Antioxidant and oxidative stress status in type 2 diabetes and diabetic foot ulcer. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneeskde*. 2008, 98:614–7.
 256. Singh A, Chauhan A, Goyal P, Ramesh P: Neuropathy in Prediabetics: Is Oxidative Stress to Contribute? *J Assoc Physicians India*. 2019, 67:60–4.
 257. Sanchez M, Hoang S, Kannengiesser C, et al.: Leukocyte Telomere Length, DNA Oxidation, and Risk of Lower-Extremity Amputation in Patients With Long-standing Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2020, 43:828–34. 10.2337/dc19-0973
 258. Wakabayashi Y, Usui Y, Shibauchi Y, Uchino H, Goto H: Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010, 89:e59-61. 10.1016/j.diabres.2010.05.032

259. Chou S-T, Tseng S-T: Oxidative stress markers in type 2 diabetes patients with diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2017, 21:283–92. 10.1007/s10157-016-1283-7
260. Sanchez M, Roussel R, Hadjadj S, Moutairou A, Marre M, Velho G, Mohammedi K: Plasma concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and risk of kidney disease and death in individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2018, 61:977–84. 10.1007/s00125-017-4510-1
261. Thomas MC, Woodward M, Li Q, et al.: Relationship Between Plasma 8-OH-Deoxyguanosine and Cardiovascular Disease and Survival in Type 2 Diabetes Mellitus: Results From the ADVANCE Trial. *J Am Heart Assoc.* 2018, 7:e008226. 10.1161/JAHA.117.008226
262. Dusinska M, Collins AR: The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis.* 2008, 23:191–205. 10.1093/mutage/gen007
263. Møller P, Stopper H, Collins AR: Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis.* 2020, 35:5–18. 10.1093/mutage/gez018
264. Wilson DM, Thompson LH: Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2007, 616:11–23. 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017
265. Stults DM, Killen MW, Marco-Casanova P, Pierce AJ: The Sister Chromatid Exchange (SCE) Assay. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2020, 2102:441–57. 10.1007/978-1-0716-0223-2_25
266. Cannan WJ, Pederson DS: Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol.* 2016, 231:3–14. 10.1002/jcp.25048
267. Eukariotu Chromosomu Struktura | PDF. *Scribd.* Accessed: August 1, 2023. <https://www.scribd.com/document/474717092/eukariotu-chromosomu-struktura>.
268. Witczag: Elevated frequencies of micronuclei in pregnant women with type 1 diabetes mellitus and in their newborns - PubMed. Accessed: October 16, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24561380/>.
269. Yuzbasioglu D, Mahmoud JH, Mamur S, Unal F: Cytogenetic effects of antidiabetic drug metformin. *Drug Chem Toxicol.* 2022, 45:955–62. 10.1080/01480545.2020.1844226
270. Donmez-Altuntas H, Sahin F, Bayram F, et al.: Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2014, 771:30–6. 10.1016/j.mrgentox.2014.06.006
271. Santovito A, Gendusa C: Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects living in Turin (North-Italy): contribution of body mass index, age and sex. *Ann Hum Biol.* 2020, 47:48–54. 10.1080/03014460.2020.1714728

272. Karaman A, Aydın H, Geçkinli B, Çetinkaya A, Karaman S: DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015, 782:30–5. 10.1016/j.mrgentox.2015.03.009
273. Ebert MS, Sharp PA: Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell.* 2012, 149:515–24. 10.1016/j.cell.2012.04.005
274. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19:92–105. 10.1101/gr.082701.108
275. Vaishya S, Sarwade RD, Seshadri V: MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications. *Front Endocrinol.* 2018, 9:180. 10.3389/fendo.2018.00180
276. Zhang Y, Sun X, Icli B, Feinberg MW: Emerging Roles for MicroRNAs in Diabetic Microvascular Disease: Novel Targets for Therapy. *Endocr Rev.* 2017, 38:145–68. 10.1210/er.2016-1122
277. Feng J, Xing W, Xie L: Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2016, 17:1729. 10.3390/ijms17101729
278. Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG: Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem.* 2015, 71:51–8. 10.1007/s13105-014-0378-4
279. Zhang X, Gong X, Han S, Zhang Y: MiR-29b protects dorsal root ganglia neurons from diabetic rat. *Cell Biochem Biophys.* 2014, 70:1105–11. 10.1007/s12013-014-0029-y
280. Gong Q, Lu Z, Huang Q, et al.: Altered microRNAs expression profiling in mice with diabetic neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 456:615–20. 10.1016/j.bbrc.2014.12.004
281. Mastropasqua R, Toto L, Cipollone F, Santovito D, Carpineto P, Mastropasqua L: Role of microRNAs in the modulation of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2014, 43:92–107. 10.1016/j.preteyeres.2014.07.003
282. Hu G, Drescher KM, Chen X-M: Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet.* 2012, 3:56. 10.3389/fgene.2012.00056
283. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105:10513–8. 10.1073/pnas.0804549105
284. Ibarra A, Vega-Guedes B, Brito-Casillas Y, Wägner AM: Diabetes in Pregnancy and MicroRNAs: Promises and Limitations in Their Clinical Application. *Non-Coding RNA.* 2018, 4:32. 10.3390/ncrna4040032
285. Bansal A, Simmons RA: Epigenetics and developmental origins of diabetes: correlation or causation? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018, 315:E15–28. 10.1152/ajpendo.00424.2017
286. Ciccacci C, Latini A, Colantuono A, et al.: Expression study of candidate miRNAs and evaluation of their potential use as biomarkers of diabetic neuropathy. *Epigenomics.* 2020, 12:575–85. 10.2217/epi-2019-0242

287. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al.: MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*. 2011, 474:649–53. 10.1038/nature10112
288. Pang B, Qiao L, Wang S, Guo X, Xie Y, Han L: MiR-214-3p plays a protective role in diabetic neuropathic rats by regulating Nav1.3 and TLR4. *Cell Biol Int*. 2021, 45:2294–303. 10.1002/cbin.11677
289. Multiple Chronic Conditions: A Strategic Framework Optimum Health and Quality of Life for Individuals with Multiple Chronic Conditions. 2010. 10.1037/e507192011-001
290. Holzer BM, Siebenhuener K, Bopp M, Minder CE: Overcoming cut-off restrictions in multimorbidity prevalence estimates. *BMC Public Health*. 2014, 14:780. 10.1186/1471-2458-14-780
291. Dugashvili G, Van den Berghe L, Menabde G, Janelidze M, Marks L: Use of the universal pain assessment tool for evaluating pain associated with TMD in youngsters with an intellectual disability. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017, 22:e88–94. 10.4317/medoral.21584
292. Gupta R, Sharma K, Dhiman UK: Effect of a combination of oral midazolam and low-dose ketamine on anxiety, pain, swelling, and comfort during and after surgical extractions of mandibular third molars. *Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dent Res*. 2012, 23:295–6. 10.4103/0970-9290.100460
293. Carrano AV, Moore DH: Chapter 10 - The Rationale and Methodology for Quantifying Sister Chromatid Exchange in Humans. In: Heddle JA, ed. *Mutagenicity*. Academic Press; 1982. 267–304.10.1016/B978-0-12-336180-6.50014-4
294. Bonassi S, Fenech M, Lando C, et al.: HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 2001, 37:31–45.
295. Hsu TC: Genetic instability in the human population: A working hypothesis1,2. *Hereditas*. 1983, 98:1–9. 10.1111/j.1601-5223.1983.tb00574.x
296. Bailleul B, Daubersies P, Galiègue-Zouitina S, Loucheux-Lefebvre M: Molecular Basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res Gann*. 1989, 80:691–7. 10.1111/j.1349-7006.1989.tb01698.x
297. Nagao M, Sugimura T: Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv Cancer Res*. 1976, 23:131–69. 10.1016/s0065-230x(08)60545-x
298. Whorton EB: Some experimental design and analysis considerations for cytogenetics studies. *Environ Mutagen*. 1985, 7 Suppl 4:9–15. 10.1002/em.2860070804
299. Statistics online - checks assumptions, interprets results. Accessed: July 19, 2023. <https://www.statskingdom.com/>.
300. Online Statistics Suite. Accessed: August 21, 2024. <https://stats.blue/index.html>.
301. Yu Y: Gold Standard for Diagnosis of DPN. *Front Endocrinol*. 2021, 12:.

302. Nather A, Keng Lin W, Aziz Z, Hj Ong C, Mc Feng B, B Lin C: Assessment of sensory neuropathy in patients with diabetic foot problems. *Diabet Foot Ankle*. 2011, 2:. 10.3402/dfa.v2i0.6367
303. Cheng WY, Jiang YD, Chuang LM, et al.: Quantitative sensory testing and risk factors of diabetic sensory neuropathy. *J Neurol*. 1999, 246:394–8. 10.1007/s004150050370
304. Balducci S, Sacchetti M, Orlando G, et al.: Correlates of muscle strength in diabetes: The study on the assessment of determinants of muscle and bone strength abnormalities in diabetes (SAMBA). *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014, 24:18–26. 10.1016/j.numecd.2013.04.010
305. Aulich J, Cho YH, Januszewski AS, et al.: Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth. *Pediatr Diabetes*. 2019, 20:1118–27. 10.1111/pedi.12913
306. Meyer MF, Rose CJ, Hülsmann J-O, Schatz H, Pfohl M: Impaired 0.1-Hz vasomotion assessed by laser Doppler anemometry as an early index of peripheral sympathetic neuropathy in diabetes. *Microvasc Res*. 2003, 65:88–95. 10.1016/S0026-2862(02)00015-8
307. Schamarek I, Herder C, Nowotny B, et al.: Adiponectin, markers of subclinical inflammation and nerve conduction in individuals with recently diagnosed type 1 and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2016, 174:433–43. 10.1530/EJE-15-1010
308. Baraz S, Zarea K, Shahbazian HB, Latifi SM: Comparison of the accuracy of monofilament testing at various points of feet in peripheral diabetic neuropathy screening. *J Diabetes Metab Disord*. 2014, 13:19. 10.1186/2251-6581-13-19
309. Abraham A, Alabdali M, Alsulaiman A, et al.: The sensitivity and specificity of the neurological examination in polyneuropathy patients with clinical and electrophysiological correlations. *PloS One*. 2017, 12:e0171597. 10.1371/journal.pone.0171597
310. Jayaprakash P, Bhansali A, Bhansali S, Dutta P, Anantharaman R, Shanmugasundar G, Ravikiran M: Validation of bedside methods in evaluation of diabetic peripheral neuropathy. *Indian J Med Res*. 2011, 133:645–9.
311. Katims JJ, Long DM, Ng LK: Transcutaneous nerve stimulation. Frequency and waveform specificity in humans. *Appl Neurophysiol*. 1986, 49:86–91.
312. Young MJ, Boulton AJM, Macleod AF, Williams DRR, Sonksen PH: A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*. 1993, 36:150–4. 10.1007/BF00400697
313. Abbott CA, Malik RA, van Ross ERE, Kulkarni J, Boulton AJM: Prevalence and Characteristics of Painful Diabetic Neuropathy in a Large Community-Based Diabetic Population in the U.K. *Diabetes Care*. 2011, 34:2220–4. 10.2337/dc11-1108

314. Moțățăianu A, Maier S, Bajko Z, Voidazan S, Bălașa R, Stoian A: Cardiac autonomic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes patients. *BMC Neurol.* 2018, 18:126. 10.1186/s12883-018-1125-1
315. Ayad F, Belhadj M, Pariés J, Attali JR, Valensi P: Association between cardiac autonomic neuropathy and hypertension and its potential influence on diabetic complications. *Diabet Med.* 2010, 27:804–11. 10.1111/j.1464-5491.2010.03027.x
316. Pan Q, Li Q, Deng W, et al.: Prevalence and Diagnosis of Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Beijing, China: A Retrospective Multicenter Clinical Study. *Front Neurosci.* 2019, 13:1144. 10.3389/fnins.2019.01144
317. Mizokami-Stout KR, Li Z, Foster NC, et al.: The Contemporary Prevalence of Diabetic Neuropathy in Type 1 Diabetes: Findings From the T1D Exchange. *Diabetes Care.* 2020, 43:806–12. 10.2337/dc19-1583
318. Burger AJ, D'Elia JA, Weinrauch LA, Lerman I, Gaur A: Marked abnormalities in heart rate variability are associated with progressive deterioration of renal function in type I diabetic patients with overt nephropathy. *Int J Cardiol.* 2002, 86:281–7. 10.1016/s0167-5273(02)00346-7
319. Tahrani AA, Dubb K, Raymond NT, et al.: Cardiac autonomic neuropathy predicts renal function decline in patients with type 2 diabetes: a cohort study. *Diabetologia.* 2014, 57:1249–56. 10.1007/s00125-014-3211-2
320. Said G: Uremic neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2013, 115:607–12. 10.1016/B978-0-444-52902-2.00035-7
321. Nørgaard K, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Saelan H, Deckert T: Prevalence of hypertension in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1990, 33:407–10. 10.1007/BF00404089
322. Shah VN, Bailey R, Wu M, et al.: Risk Factors for Cardiovascular Disease (CVD) in Adults with Type 1 Diabetes: Findings from Prospective Real-life T1D Exchange Registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020, 105:e2032–8. 10.1210/clinem/dgaa015
323. Quintero Ojeda JE, Aguilar-Medina M, Olimón-Andalón V, et al.: Increased Micronuclei Frequency in Oral and Lingual Epithelium of Treated Diabetes Mellitus Patients. *BioMed Res Int.* 2018, 2018:4898153. 10.1155/2018/4898153
324. Toljic M, Egic A, Munjas J, et al.: Increased oxidative stress and cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2017, 71:55–62. 10.1016/j.reprotox.2017.04.002
325. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, et al.: Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2007, 634:126–34. 10.1016/j.mrgentox.2007.06.006

326. Bankoglu EE, Arnold C, Hering I, Hankir M, Seyfried F, Stopper H: Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. *Sci Rep.* 2018, 8:11195. 10.1038/s41598-018-29581-6
327. Lazutka JR, Lekevicius R, Dedonyte V, Maciuleviciute-Gervers L, Mierauskiene J, Rudaitiene S, Slapsyte G: Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures. *Mutat Res.* 1999, 445:225–39. 10.1016/s1383-5718(99)00128-x
328. Lazutka JR: Chromosome aberrations and rogue cells in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers. *Mutat Res.* 1996, 350:315–29. 10.1016/0027-5107(95)00170-0
329. Saraswathy R, Anand S, Kunnumpurath SK, Kurian RJ, Kaye AD, Vadivelu N: Chromosomal Aberrations and Exon 1 Mutation in the AKR1B1 Gene in Patients with Diabetic Neuropathy. *Ochsner J.* 2014, 14:339–42.
330. Palazzo RP, Bagatini PB, Schefer PB, de Andrade FM, Maluf SW: Genomic instability in patients with type 2 diabetes mellitus on hemodialysis. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2012, 34:31–5. 10.5581/1516-8484.20120011
331. Włodarczyk M, Nowicka G: Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019, 20:1146. 10.3390/ijms20051146
332. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM: Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol.* 2018, 34:575–84. 10.1016/j.cjca.2017.12.005
333. Roberts CK, Sindhu KK: Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009, 84:705–12. 10.1016/j.lfs.2009.02.026
334. Tyson J, Caple F, Spiers A, et al.: Inter-individual variation in nucleotide excision repair in young adults: effects of age, adiposity, micronutrient supplementation and genotype. *Br J Nutr.* 2009, 101:1316–23. 10.1017/S0007114508076265
335. Crespo-Orta I, Ortiz C, Encarnación J, Suárez E, Matta J: Association between DNA repair capacity and body mass index in women. *Mutat Res.* 2023, 826:111813. 10.1016/j.mrfmmm.2022.111813
336. Li X, Bai Y, Wang S, et al.: Association of body mass index with chromosome damage levels and lung cancer risk among males. *Sci Rep.* 2015, 5:9458. 10.1038/srep09458
337. Norppa H, Bonassi S, Hansteen I-L, et al.: Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006, 600:37–45. 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.030
338. Bonagiri PR, Shubrook JH: Review of Associations Between Type 2 Diabetes and Cancer. *Clin Diabetes Publ Am Diabetes Assoc.* 2020, 38:256–65. 10.2337/cd19-0077
339. Shahid RK, Ahmed S, Le D, Yadav S: Diabetes and Cancer: Risk, Challenges, Management and Outcomes. *Cancers.* 2021, 13:5735. 10.3390/cancers13225735

340. Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, et al.: Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007, 165:36–43. 10.1093/aje/kwj367
341. Vijg J, Suh Y: Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013, 75:645–68. 10.1146/annurev-physiol-030212-183715
342. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, et al.: Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 1997, 6:249–56.
343. Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 1998, 58:4117–21.
344. Natarajan AT, Darroudi F: Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis.* 1991, 6:399–403. 10.1093/mutage/6.5.399
345. Stopper H, Bankoglu EE, Marcos R, Pastor S: Micronucleus frequency in chronic kidney disease patients: A review. *Mutat Res Mutat Res.* 2020, 786:108340. 10.1016/j.mrrev.2020.108340
346. Botto N, Rizza A, Colombo MG, et al.: Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res.* 2001, 493:23–30. 10.1016/s1383-5718(01)00162-0
347. Murgia E, Maggini V, Barale R, Rossi AM: Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2007, 621:113–8. 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.015
348. Guven M, Guven GS, Oz E, et al.: DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency. *Heart Vessels.* 2007, 22:355–60. 10.1007/s00380-007-0986-9
349. Federici C, Botto N, Manfredi S, Rizza A, Fiandra MD, Andreassi MG: Relation of Increased Chromosomal Damage to Future Adverse Cardiac Events in Patients With Known Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2008, 102:1296–300. 10.1016/j.amjcard.2008.07.024
350. Di Minno A, Turnu L, Porro B, Squellerio I, Cavalca V, Tremoli E, Di Minno MND: 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxid Redox Signal.* 2016, 24:548–55. 10.1089/ars.2015.6508
351. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A: Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014, 1840:801–8. 10.1016/j.bbagen.2013.06.009

352. Zinellu A, Mangoni AA: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Statins on Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase. *Antioxidants*. 2021, 10:1841. 10.3390/antiox10111841
353. Manfredini V, Biancini GB, Vanzin CS, et al.: Simvastatin treatment prevents oxidative damage to DNA in whole blood leukocytes of dyslipidemic type 2 diabetic patients. *Cell Biochem Funct*. 2010, 28:360–6. 10.1002/cbf.1654
354. Tubić Vukajlović J, Simić I, Smiljanić Z, Grujičić D, Milošević-Djordjević O: Genome instability in peripheral blood lymphocytes of patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Mutagenesis*. 2023, 38:84–92. 10.1093/mutage/gead002
355. Orsolin PC, Silva-Oliveira RG, Nepomuceno JC: Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2015, 81:111–9. 10.1016/j.fct.2015.04.004
356. Orsolin PC, Silva-Oliveira RG, Nepomuceno JC: Modulating effect of simvastatin on the DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2016, 90:10–7. 10.1016/j.fct.2016.01.022
357. Buczyńska A, Sidorkiewicz I, Krętowski AJ, Adamska A: Examining the clinical relevance of metformin as an antioxidant intervention. *Front Pharmacol*. 2024, 15:1330797. 10.3389/fphar.2024.1330797
358. Rababa’H AM, Alzoubi KH, Khabour OF, Ababneh M: Ameliorative effect of metformin on methotrexate-induced genotoxicity: An in vitro study in human cultured lymphocytes. *Biomed Rep*. 2021, 15:59. 10.3892/br.2021.1435
359. Othman EM, Oli RG, Arias-Loza P-A, Kreissl MC, Stopper H: Metformin Protects Kidney Cells From Insulin-Mediated Genotoxicity In Vitro and in Male Zucker Diabetic Fatty Rats. *Endocrinology*. 2016, 157:548–59. 10.1210/en.2015-1572
360. Cheki M, Ghasemi MS, Rezaei Rashnoudi A, Erfani Majd N: Metformin attenuates cisplatin-induced genotoxicity and apoptosis in rat bone marrow cells. *Drug Chem Toxicol*. 2021, 44:386–93. 10.1080/01480545.2019.1609024
361. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C: Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1840:2709–29. 10.1016/j.bbagen.2014.05.017
362. Poetsch AR: The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020, 18:207. 10.1016/j.csbj.2019.12.013
363. de Boer IH, Khunti K, Sadusky T, et al.: Diabetes Management in Chronic Kidney Disease: A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Diabetes Care*. 2022, 45:3075–90. 10.2337/dci22-0027

364. Juchnicka I, Kuźmicki M, Niemira M, et al.: miRNAs as Predictive Factors in Early Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol.* 2022, 13:839344. 10.3389/fendo.2022.839344
365. Geng Y, Ju Y, Ren F, et al.: Insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/2) regulates Wnt/ β -catenin signaling through blocking autophagic degradation of dishevelled2. *J Biol Chem.* 2014, 289:11230–41. 10.1074/jbc.M113.544999
366. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, et al.: Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obes Silver Spring Md.* 2017, 25:102–10. 10.1002/oby.21709
367. Garcia-Contreras M, Shah SH, Tamayo A, Robbins PD, Golberg RB, Mendez AJ, Ricordi C: Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. *Sci Rep.* 2017, 7:5998. 10.1038/s41598-017-05787-y
368. Bork-Jensen J, Scheele C, Christophersen DV, et al.: Glucose tolerance is associated with differential expression of microRNAs in skeletal muscle: results from studies of twins with and without type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2015, 58:363–73. 10.1007/s00125-014-3434-2
369. Klöting N, Berthold S, Kovacs P, et al.: MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PloS One.* 2009, 4:e4699. 10.1371/journal.pone.0004699
370. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ: Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96:E846-850. 10.1210/jc.2010-2701
371. Kueh MTW, Chew NWS, Al-Ozairi E, le Roux CW: The emergence of obesity in type 1 diabetes. *Int J Obes.* 2024, 48:289–301. 10.1038/s41366-023-01429-8
372. Bielka W, Przekaz A, Molęda P, Pius-Sadowska E, Machaliński B: Double diabetes—when type 1 diabetes meets type 2 diabetes: definition, pathogenesis and recognition. *Cardiovasc Diabetol.* 2024, 23:62. 10.1186/s12933-024-02145-x
373. Kietsirotje N, Pearson S, Campbell M, Ariëns RAS, Ajjan RA: Double diabetes: A distinct high-risk group? *Diabetes Obes Metab.* 2019, 21:2609–18. 10.1111/dom.13848
374. Zapała B, Kamińska A, Piwowar M, Paziewska A, Gala-Błądzińska A, Stępień EŁ: miRNA Signature of Urine Extracellular Vesicles Shows the Involvement of Inflammatory and Apoptotic Processes in Diabetic Chronic Kidney Disease. *Pharm Res.* 2023, 40:817–32. 10.1007/s11095-023-03481-5
375. Tai L, Huang C-J, Choo KB, Cheong SK, Kamarul T: 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. *Int J Med Sci.* 2020, 17:457–70. 10.7150/ijms.38832

376. Wang Z, Liu Y, Han N, Chen X, Yu W, Zhang W, Zou F: Profiles of oxidative stress-related microRNA and mRNA expression in auditory cells. *Brain Res.* 2010, 1346:14–25. 10.1016/j.brainres.2010.05.059
377. Li H, Li T, Wang S, et al.: miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* 2013, 10:313–24. 10.1016/j.scr.2012.11.007
378. Estrella Ibarra P, García-Solís P, Solís-Sáinz JC, Cruz-Hernández A: Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review. *Endokrynol Pol.* 2021, 72:73–80. 10.5603/EP.a2021.0002
379. Chuang T-Y, Wu H-L, Chen C-C, et al.: MicroRNA-223 Expression Is Upregulated in Insulin Resistant Human Adipose Tissue. *J Diabetes Res.* 2015, 2015:943659. 10.1155/2015/943659
380. Deiluiis JA, Syed R, Duggineni D, et al.: Visceral Adipose MicroRNA 223 Is Upregulated in Human and Murine Obesity and Modulates the Inflammatory Phenotype of Macrophages. *PloS One.* 2016, 11:e0165962. 10.1371/journal.pone.0165962
381. Macartney-Coxson D, Danielson K, Clapham J, et al.: MicroRNA Profiling in Adipose Before and After Weight Loss Highlights the Role of miR-223-3p and the NLRP3 Inflammasome. *Obesity.* 2020, 28:570–80. 10.1002/oby.22722
382. Thompson MD, Cismowski MJ, Serpico M, Pusateri A, Brigstock DR: Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clin Obes.* 2017, 7:216–21. 10.1111/cob.12192
383. Ma F, Cao D, Liu Z, Li Y, Ouyang S, Wu J: Identification of novel circulating miRNAs biomarkers for healthy obese and lean children. *BMC Endocr Disord.* 2023, 23:238. 10.1186/s12902-023-01498-w
384. Wen D, Qiao P, Wang L: Circulating microRNA-223 as a potential biomarker for obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2015, 9:398–404. 10.1016/j.orcp.2015.01.006
385. Januszewski AS, Cho YH, Joglekar MV, et al.: Insulin micro-secretion in Type 1 diabetes and related microRNA profiles. *Sci Rep.* 2021, 11:11727. 10.1038/s41598-021-90856-6
386. Swolin-Eide D, Forsander G, Pundziute Lyckå A, et al.: Circulating microRNAs in young individuals with long-duration type 1 diabetes in comparison with healthy controls. *Sci Rep.* 2023, 13:11634. 10.1038/s41598-023-38615-7
387. Senyigit A, Durmus S, Oruc A, Gelisgen R, Uzun H, Tabak O: Dysfunction of PTEN-Associated MicroRNA Regulation: Exploring Potential Pathological Links in Type 1 Diabetes Mellitus. *Medicina (Mex).* 2024, 60:1744. 10.3390/medicina60111744
388. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev.* 2004, 25:612–28. 10.1210/er.2003-0019

389. Bigagli E, Lodovici M: Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Clinical Studies on Type 2 Diabetes and Its Complications. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 2019:5953685. 10.1155/2019/5953685
390. Pan H, Zhang L, Guo M, et al.: The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*. 2010, 47 Suppl 1:71–6. 10.1007/s00592-009-0128-1
391. Šiaulienė L, Kazlauskaitė J, Jurkėnaitė D, Visockienė Ž, Lazutka JR: Influence of Body Mass Index and Duration of Disease on Chromosome Damage in Lymphocytes of Patients with Diabetes. *Life Basel Switz*. 2023, 13:1926. 10.3390/life13091926
392. Eremina NV, Вахитовна EH, Zhanataev AK, et al.: Genotoxic markers in patients with diabetes mellitus (Literature review). *Ecol Genet*. 2021, 19:143–68. 10.17816/ecogen65073
393. Najafi N, Mehri S, Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H: Effects of alpha lipoic acid on metabolic syndrome: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2022, 36:2300–23. 10.1002/ptr.7406
394. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C: Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015, 93:1021–7. 10.1139/cjpp-2014-0353
395. Unal F, Taner G, Yuzbasioglu D, Yilmaz S: Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*. 2013, 65:553–65. 10.1007/s10616-012-9504-8
396. Selvakumar E, Prahalthan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P: Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. *Arch Toxicol*. 2006, 80:115–9. 10.1007/s00204-005-0015-7
397. Viana MDM, Lauria PSS, Lima AA de, Opretzka LCF, Marcelino HR, Villarreal CF: Alpha-Lipoic Acid as an Antioxidant Strategy for Managing Neuropathic Pain. *Antioxid Basel Switz*. 2022, 11:2420. 10.3390/antiox11122420
398. Orellana-Donoso M, López-Chaparro M, Barahona-Vásquez M, Santana-Machuca A, Bruna-Mejías A, Nova-Baeza P, Valenzuela-Fuenzalida JJ: Effectiveness of alpha-lipoic acid in patients with neuropathic pain associated with type I and type II diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2023, 102:e35368. 10.1097/MD.00000000000035368
399. Mijnhout GS, Kollen BJ, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo HJG: Alpha lipoic Acid for symptomatic peripheral neuropathy in patients with diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Endocrinol*. 2012, 2012:456279. 10.1155/2012/456279
400. Abdelrahman KA, Ibrahim AS, Osman AM, Aly MG, Ali AS, Farrag WS: Alpha lipoic acid with pulsed radiofrequency in treatment of chronic lumbosacral radicular pain: A prospective, randomized study. *Medicine (Baltimore)*. 2021, 100:e26344. 10.1097/MD.00000000000026344

401. Esposito C, Ugo Garzarella E, Santarcangelo C, et al.: Safety and efficacy of alpha-lipoic acid oral supplementation in the reduction of pain with unknown etiology: A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2021, 144:112308. 10.1016/j.biopha.2021.112308
402. Evans JL, Goldfine ID: Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2000, 2:401–13. 10.1089/15209150050194279
403. Bondar A, Popa AR, Papanas N, et al.: Diabetic neuropathy: A narrative review of risk factors, classification, screening and current pathogenic treatment options (Review). *Exp Ther Med*. 2021, 22:690. 10.3892/etm.2021.10122
404. Broedbaek K, Weimann A, Stovgaard ES, Poulsen HE: Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011, 51:1473–9. 10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.007
405. Porasuphatana S, Suddee S, Nartnampong A, Konsil J, Harnwong B, Santaweek A: Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of alpha-lipoic acid: a randomized double-blinded placebo-controlled study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012, 21:12–21.
406. Kowluru RA, Odenbach S: Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes*. 2004, 53:3233–8. 10.2337/diabetes.53.12.3233
407. Zalejska-Fiolka J, Wielkoszyński T, Rokicki W, et al.: The Influence of α -Lipoic Acid and Garlic Administration on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Rabbits Exposed to Oxidized Nutrition Oils. *BioMed Res Int*. 2015, 2015:827879. 10.1155/2015/827879
408. Katsiki N, Anagnostis P, Kotsa K, Goulis DG, Mikhailidis DP: Obesity, Metabolic Syndrome and the Risk of Microvascular Complications in Patients with Diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*. 2019, 25:2051–9. 10.2174/1381612825666190708192134
409. Calimlioglu B, Karagoz K, Sevimoglu T, Kilic E, Gov E, Arga KY: Tissue-Specific Molecular Biomarker Signatures of Type 2 Diabetes: An Integrative Analysis of Transcriptomics and Protein-Protein Interaction Data. *Omics J Integr Biol*. 2015, 19:563–73. 10.1089/omi.2015.0088
410. Marrone AK, Stolz DB, Bastacky SI, Kostka D, Bodnar AJ, Ho J: MicroRNA-17~92 Is Required for Nephrogenesis and Renal Function. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014, 25:1440–52. 10.1681/ASN.2013040390
411. Fan X, Hao Z, Li Z, Wang X, Wang J: Inhibition of miR-17~92 Cluster Ameliorates High Glucose-Induced Podocyte Damage. *Mediators Inflamm*. 2020, 2020:6126490. 10.1155/2020/6126490
412. Nandakumar P, Tin A, Grove ML, Ma J, Boerwinkle E, Coresh J, Chakravarti A: MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in

- chronic kidney disease with hypertension. PLoS ONE. 2017, 12:e0176734. 10.1371/journal.pone.0176734
413. Platania CBM, Maisto R, Trotta MC, et al.: Retinal and circulating miRNA expression patterns in diabetic retinopathy: An in silico and in vivo approach. Br J Pharmacol. 2019, 176:2179–94. 10.1111/bph.14665
414. He X, Zeng X: LncRNA SNHG16 Aggravates High Glucose-Induced Podocytes Injury in Diabetic Nephropathy Through Targeting miR-106a and Thereby Up-Regulating KLF9. Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther. 2020, 13:3551–60. 10.2147/DMSO.S271290
415. Tusong H, Maolakuerban N, Guan J, et al.: Functional analysis of serum microRNAs miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma. Cancer Biomark. 2017, 18:79–85. 10.3233/CBM-160676

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai:

1. Šiaulienė, L.; Kazlauskaitė, J.; Jurkėnaitė, D.; Visockienė, Ž.; Lazutka, J.R. “Influence of Body Mass Index and Duration of Disease on Chromosome Damage in Lymphocytes of Patients with Diabetes”. *Life* 2023, 13, 1926. <https://doi.org/10.3390/life13091926>
2. Juozas R. Lazutka, Kristina Daniūnaitė, Veronika Dedonytė, Aistė Popandopula, Karolina Žukaitė, Žydrūnė Visockienė and Laura Šiaulienė. “Effects of Short-Term Treatment with α -Lipoic Acid on Neuropathic Pain and Biomarkers of DNA Damage in Patients with Diabetes Mellitus”. *Žurnalas Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph17111538>

Pranešimai mokslinėse konferencijose:

1. Šiaulienė L., Sereikė I., Lazutka J.R., Visockienė Ž. Stendinis pranešimas „Differences in diabetic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes mellitus“. Europos endokrinologų draugijos konferencija. 2022 05 21-24. Milanas
2. Šiaulienė L., Lazutka J.R., Visockienė Ž. Žodinis pranešimas „Diabetic neuropathy, DNA damage and mutagen-induced sensitivity in vitro“. Neurodiab konferencija. 2022 09 15-18. Bergenas
3. Šiaulienė L., Lazutka J.R., Visockienė Ž. Žodinis pranešimas „DNA damage and compromised DNA repair in patients with diabetes mellitus and diabetic neuropathy“. 10th Baltic Congress of Endocrinology and the Commemorative Event of 100 years of Insulin in Clinical Practice. 10th Baltic Congress of Endocrinology, 2022 Spalio 07-08, Kaunas, Lietuva
4. Šiaulienė L., Lazutka J.R., Visockienė Ž. Žodinis pranešimas „Citogenetinių žymenų tyrimas diabetu sergančių pacientų limfocituose“. Mokslinė praktinė Lietuvos endokrinologų draugijos konferencija Psichoneuroendokrinologija. 2024 11 15-16, Kaunas, Lietuva.

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ

Asmens duomenys

Vardas Pavardė Laura Šiaulienė
El. paštas laura.siauliene@santa.lt
Darbovietė Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos
Santariškių g. 2 LT-08661, Vilnius

Išsilavinimas

Nuo 2018 Doktorantūros studijos, Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
2008–2013 Endokrinologijos rezidentūra, Vilniaus universiteto
ligoninės Santaros klinikos
2007–2008 Internatūra, Ukmergės ligoninė
2000–2007 Medicinos studijos, Vilniaus universiteto Medicinos
fakultetas
1992–2000 Vidurinis išsilavinimas, Prienų „Žiburio“
gimnazija

Licenzija Endokrinologo licenzijos nr. MPL – 18436, išduota
2013 07 03

Klinikinio darbo patirtis

2022 VšĮ Trakų poliklinika, gydytoja endokrinologė
2020–2021 VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros
klinikos Covid II skyrius, medicinos gydytoja
Nuo 2016 VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros
klinikos, gydytoja endokrinologė
Nuo 2013 UAB „Kardiolitos Klinikos“, gydytoja
endokrinologė
2013–2018 VšĮ Karoliniškių poliklinika, gydytoja
endokrinologė

Kalbos Lietuvių, anglų, rusų
Narystė Vilniaus endokrinologų draugija (VED)
Lietuvos endokrinologų draugija (LED)
Europos diabeto asociacija (EASD)

PADĖKA

Nuoširdus ačiū darbo vadovui prof. Juozui Rimantui Lazutkai už įsitraukimą, konstruktyvų vadovavimo stilių, kantrybę ir optimizmą. Ačiū už tą žinojimą, kad iki vidurnakčio konsultuotis normalu, o po vidurnakčio gal ir nenormalu, bet atsakymo sulaukti vis tiek galima.

Dėkoju konsultantei doc. Žydrūnei Visockienei už pirmą pažintį su mokslu, „mokslinių pagrindų suklojimą“ ir pagalbą derinant mokslinę veiklą su klinikiniu ir pedagoginiu darbu.

Dr. Veronikai Dedonytei pirmiausiai dėkoju už skleidžiamą šilumą, betarpišką bendravimą, nuoširdumą, perduotas žinias ir netikėtus skanėstus darbų citogenetikos laboratorijoje metu. Ačiū už milžinišką darbą vadovaujant ir atliekant citogenetinius tyrimus ir disertacijos redagavimą. Taip pat dėkoju laboratorijoje dirbusiems dr. Jūratei Kazlauskaitei ir studentams Daliai Jurkėnaitei, Rokui Reventui, Ivetai Žukauskaitei, Martynai Šalčiūtei, Ugniui Kliukui, Ugnei Jautžemytei, Karolinai Žukaitei ir Kornelijai Slavinskaitei. Padėka Kasparui Veličkevičiui už HFC analizę.

Ačiū dr. Kristinai Daniūnaitei už rastą finansavimą ir vadovavimą atliekant miRNR ir DNR pažaidų tyrimus. Dėkoju studentei Bernadetai Kaminskaitei, jaun. asist. Rūtai Maleckaitei ir kitiems molekulinės genetikos laboratorijos tyrėjams - praktikantams už atliktus miRNR tyrimus ir galimybę susipažinti su šių tyrimų atlikimo technika. Studentei Aistei Popandopulai dėkoju už atliktus 8-OHdG tyrimus. Dėkoju VU BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriui už suteiktą galimybę pasinaudoti moksline įranga ir konsultacijas.

Dėkoju dr. Ievai Sereikei už neurologinį pacientų ištyrimą atliekant elektroneurografijas, nuoširdų palaikymą ir reguliarias „sveiko proto“ injekcijas.

Taip pat dėkoju dr. Greta Burneikaitei už pagalbą rašant tyrimo protokolą ir ilgus prasmingus pokalbius mokslo ir ne mokslo temomis.

Ačiū skyriaus gydytojams ir slaugytojoms už puikią darbinę atmosferą, palaikymą ir pagalbą įtraukiant ir tiriant pacientus. Atskiras ačiū diabeto slaugytojai Violetai Bičkauskienei už skirtą laiką.

Jekaterinai Patrovai dėkoju už besąlygišką, nuoširdžią draugystę, rūpestį ir visokeriopą palaikymą. Dėkoju ir savo „gangui“ Lijanai Kecorienei, Vitai Žeromskienei ir Jurgitai Kemėšienei už įkurtą „tarpusavio motyvacinio palaikymo grupę“ ir už dešimtmečius trunkančią draugystę, galimybę kartu augti ir švęsti gyvenimą.

Ačiū visiems kitiems draugams, kolegoms, buvusiems kursiočiams, doktorantams, kurių „palaikymo burbulas“ padėjo mokslo metais stumtis į priekį.

Didžiausias ačiū tėvams Zofijai Dagilienei ir Viktorui Dagiliui už įdiegtas vertybes, darbštumą, užsispyrimą, pasitikėjimą savimi ir žinojimą, kad, jei tik panorėsiu, nieko nėra neįmanomo. Ačiū už tuos „tai žinoma“ tiek kai viską mesdavau, tiek kai pradėdavau iš naujo. Ačiū už pagalbą ir begalinę meilę anūkams, ištvermę ir besąlygišką palaikymą.

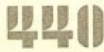
Ir, žinoma, ačiū mano mylimiausiems, mano gyvenimo džiaugsmui ir prasmei, vaikams Beatričei, Mykolui, Povilui ir vyrui Jonui už rūpestį, laisvę rinktis ir būti savimi.

Disertacijoje aprašyti tyrimai buvo dalinai finansuoti doktorantūros studijų lėšomis ir VU GMC Studijų skyriaus lėšomis, skirtomis studentų baigiamųjų darbų rengimui. MiRNR tyrimai taip pat dalinai finansuoti VU Mokslo skatinimo fondo projekto Nr. MSF-JM-10 ir doc. dr. K. Daniūnaitės vadovaujamos mokslinių tyrimų grupės nuosavomis lėšomis.

PRIEDAI

1. Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas.
2. Informuoto asmens sutikimo forma diabetu sergantiems
3. Informuoto sutikimo formo diabetu nesergantiesiems
4. Tiriamųjų ištyrimo planas
5. Paciento apklausos anketa
6. Neuropatijos simptomų skalės klausimynas
7. Objektyvaus ištyrimo forma
8. Neurometrijos protokolai
9. Neurografijos protokolai
10. Autonominų kardiovaskulinių refleksų tyrimo (AKRT) atlikimo technika ir vertinimas
11. Autonominės širdies neuropatijos protokolai
12. Cukriniu diabetu sergančių pacientų, gydytų α -lipoine rūgštimi, klinikiniai ir citogenetiniai duomenys
13. Kontrolinių asmenų, palygintų su α -lipoine rūgštimi gydytais, diabetu sergančiais pacientais, klinikiniai ir citogenetiniai duomenys

Priedas 1. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas



VILNIAUS UNIVERSITETO
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

LEIDIMAS
ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2019-06-25 Nr.2019/6-1146-635

Tyrimo pavadinimas:

**Genetinių, epigenetinių veiksnių ir gyvenimo būdo įtaka komplikacijų išsivystymui
cukriniu diabetu sergantiems pacientams**

Protokolo Nr.:1
Versija:1.4
Data:2019 07 02

Informuoto asmens sutikimo forma:1.3 (sergantiems diabetu)
2019 07 02
1.3 (nesergantiems diabetu)
2019 07 02

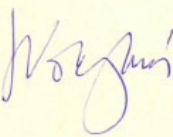
Pagrindinis tyrėjas:**Žydrūnė Visockienė**

[staigos pavadinimas:VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos
Adresas:Santariškių g. 2, Vilnius

Leidimas galioja iki:**2032 06**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio
(protokolas Nr. 2019/6), vykusio 2019 m. birželio 25 d. sprendimu.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101 Vilnius
Tel. (+8 5) 268 6998, el. p. rbeek@mf.vu.lt

Priedas 2. Informuoto asmens sutikimo forma diabetu sergantiesiems

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA DIABETU SERGANTIESIEMS

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: Genetinių, epigenetinių veiksnių ir gyvenimo būdo įtaka komplikacijų išsivystymui cukriniu diabetu sergantiems pacientams.

Protokolo Nr.: 1.5

Užsakovas: Viešoji įstaiga Vilniaus universitetas

Adresas: Universiteto g. 3, Vilnius

Tel.: 868723382

El. paštas: mokslas@cr.vu.lt

Užsakovo atstovas: mokslo prorektorius prof. Rimantas Jankauskas

Atsakingas tyrėjas: doc. Dr. Žydrūnė Visockienė

Tyrimo centro pavadinimas: Jungtinis kompetencijų ir biomedicininio tyrimų centras, Vilniaus universiteto ligoninė Santaros Klinikos.

Adresas: Santariškių g. 2, 08661 Vilnius

Tel.: (+370) 5 236 5000

El. paštas: info@santa.lt

Gerbiamas paciente,

Jums nustatyta cukrinis diabetas ir Jūs esate kviečiamas dalyvauti biomediciniame tyrime. Šio tyrimo tikslas – surinkti klinikinius duomenis apie cukriniu diabetu sergančius asmenis. Surinkti duomenys tarnautų moksliniais tikslais ir galbūt ateityje pagerintų cukriniu diabetu sergančių asmenų priežiūrą ir gydymą.

1. Kokia šio dokumento paskirtis?

Šioje formoje pateikiama Jums skirta informacija apie biomedicininį tyrimą, aptariamą tyrimo atlikimo priežastys, mokslinio tyrimo procedūros, nauda, rizika, galimi nepatogumai ir kita svarbi informacija. Tam, kad galėtumėme įtraukti Jus į mokslinį tyrimą, turite žinoti, jog Jums reikės pateikti tyrimui reikalingus asmens duomenis. Jei nuspręsite dalyvauti, prašysime Jūsų pasirašyti šią sutikimo formą, kuria sutinkate tyrimo metu vykdyti gydytojo tyrėjo ir tyrimo komandos nurodymus. Pasirašydami šį dokumentą, sutinkate dalyvauti moksliniame tyrime. Neskubėkite ir atidžiai perskaitykite šį dokumentą, jei nesupratote kokio nors žodžio ar teiginio, visus iškilusius klausimus būtinai užduokite tyrimo gydytojui ar kitiems tyrimo komandos nariams. Prieš priimdami sprendimą, galite pasitarti su šeimos nariais, draugais ar savo gydytoju.

2. Kodėl atliekami biomedicininiai tyrimai?

Svarbu suprasti, kad nors biomedicininio tyrimo metu Jums bus atliekami sveikatos patikrinimai ar medicininės procedūros, biomedicininis tyrimas iš esmės skiriasi nuo įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos. Įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos tikslas yra Jus (t. y. konkretų asmenį, pacientą) išgydyti ir/ar pagerinti Jūsų sveikatos būklę. Pagrindinis biomedicininio (mokslinio) tyrimo tikslas – gauti naujų medicinos mokslo žinių, kurios ateityje padėtų kitų šia liga sergančių pacientų sveikatai. Kitaip tariant, pagrindinis šio tyrimo tikslas nėra tiesioginė nauda Jūsų sveikatai.

3. Kodėl atliekamas šis tyrimas?

Cukrinis diabetas (CD) grėsmingas sukeliamomis komplikacijomis, kurios pasireiškia tiek pirmo (CD1), tiek antro (CD2) cukrinio diabeto tipo atveju. Diabetinės komplikacijos yra vienos dažniausių pacientų aklumo, inkstų funkcijos nepakankamumo ir dializės, kojų opų ir netrauminių kojų amputacijų, infarkto, insulto priežasčių. Šios komplikacijos ženkliai pablogina pacientų gyvenimo kokybę, padidina sergamumą, mirštamumą ir sveikatos priežiūros kaštus.

Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami diabeto biožymenys (glikozilintas hemoglobinas, glikemija) ne visada atspindi diabeto komplikacijų išsivystymo riziką. Tyrimų duomenys rodo, kad diabeto komplikacijos daliai pacientų gali išsivystyti esant santykinai žemai glikemijai (sergant prediabetu) arba, priešingai, tam tikrai daliai ilgai diabetu sergančių pacientų komplikacijos neišsivysto, nepriklausomai nuo glikemijos kontrolės. Manoma, kad diabeto komplikacijų išsivystymas iš dalies priklauso nuo genetinių veiksnių. Šio tyrimų tikslas yra įvertinti tam tikrus diabeto komplikacijų vystymosi mechanizmus ir nustatyti genetinius, epigenetinius ir gyvenimo būdo veiksnius, įtakojančius diabeto komplikacijų išsivystymą, klinikinį pasireiškimą ir progresavimą. Nustatyti rizikos veiksniai ir gyvenimo būdo korekcija galėtų pristabdyti diabeto komplikacijų išsivystymą. Taikant genetinius tyrimus klinikinėje praktikoje būtų galima anksti nustatyti didelės rizikos pacientus, kuriems ypač naudingas intensyvus gydymas ir griežta ligos kontrolė. Šios žinios leistų prognozuoti diabeto komplikacijų vystymosi tikimybę ir atsaką į gydymą ir taip įgalintų personalizuotą diabetu sergančių pacientų priežiūrą.

4. Kokie asmenys pasirenkami dalyvauti šiame tyrime?

Tyrime dalyvauti bus kviečiami nuo 18 iki 89 metų amžiaus pacientai, sergantys pirmo ir antro tipo cukriniu diabetu gydomi VUL SK ir sveiki asmenys (kontrolinė grupė), gydomi VULSK ar kitoje gydymo įstaigoje. Jūs būtumėte įtrauktas į tiriamųjų grupę. Visiems pacientams tyrimai bus atliekami pagal protokole aprašytą tvarką.

5. Kas atlieka / užsako šį biomedicininį?

Šio biomedicininio tyrimo užsakovas yra Vilniaus universitetas.

Tyrimų centras – Vilniaus universiteto Santaros klinikų Jungtinis kompetencijų ir biomedicininių tyrimų centras.

6. Tikimybė patekti į skirtingas tiriamųjų grupes ir dalyvavimo šiose grupėse ypatybės.

Asmenys, kuriems nustatytas cukrinis diabetas pateks į tiriamųjų grupę, o nesergantys bus priskiriami kontrolinei grupei. Visiems tiriamiesiems bus papildomai atliekami genetiniai kraujo tyrimai, epigenetiniai šlapimo ir kraujo tyrimai, pėdų odos pasėlis.

Tiriamųjų grupei papildomai bus atliekami biocheminiai ir instrumentiniai tyrimai – širdies echoskopija, tyrimai nustatantys širdies nervų ir kojų periferinių nervų pakenkimą, akių dugno vertinimas.

7. Kiek truks Jūsų dalyvavimas šiame tyrime?

Dalyvavimo tyrime trukmė – dešimt metų.

Nuo pirmo vizito, kai pasirašysite informuoto asmens sutikimo formą, turėsite apsilankyti pas gydytoją tyrėją 1 kartą kas 2 metus, iš viso – 6 vizitai.

8. Kokiose šalyse bus vykdomas šis tyrimas?

Lietuvoje

9. Kiek tiriamųjų dalyvaus numatyta šiame tyrime?

Tikimasi, kad šiame biomedicininiam tyrime dalyvaus apie 600 žmonių, iš jų 300 sergantieji diabetu ir 300 sveiki asmenys.

10. Ką Jums reikės daryti?

Sutikus dalyvauti biomedicininiam tyrime ir pasirašius sutikimo formą, šio tyrimo tikslu pirmojo vizito metu prašysime leisti:

– naudotis medicinos dokumentais, esančiais įtaigoje. Iš medicinos dokumentų rinksime duomenis apie Jūsų sveikatą, gretutinius susirgimus, atliktų tyrimų duomenis;

– atlikti objektyvią apžiūrą (ūgis, svoris, AKS, pulsas, liemens apimtis, pėdų būklė)

– paimti kraujo iš venos papildomiems tyrimams iki 16 ml (3 arbatiniai šaukšteliai); Jei sutiksite, hospitalizacijos pabaigoje pakartotinai bus paimta 7,5 ml (1,5 arbatinio šaukštelio) veninio kraujo.

– taip pat prašysime atsakyti į klausimynų klausimus:

- kiekvieno vizito metu, t.y. kas 2 metus visų pacientų prašysime užpildyti klausimyną apie diabeto sukeliamus kojų simptomus. Šio klausimyno užpildymas užtrunka iki 5 minučių.
- jei Jums nustatytas pirmo tipo cukrinis diabetas pirmo vizito metu ir pakartotinai po 4 metų ir 8 metų papildomai prašysime atsakyti į klausimus apie Jūsų patiriamus ligos simptomus, ligų ir šeiminių anamnezę, kasdienę mitybą, fizinį aktyvumą, išsimokslinimą, socialinę padėtį, gyvenimo kokybę. Klausimynų pildymas užtruks apie 1,5 val.
- jei Jums nustatytas antro tipo diabetas pirmo vizito metu ir pakartotinai po 4 metų ir 8 metų prašysime atsakyti į papildomus klausimus apie diabeto sukeliamus kojų simptomus. Šios anketos pildymas užtruks iki 10 min.

Jei sutiksite dalyvauti tyrime, gydytojas papildomai Jums atliks neurometriją (pėdų jautrumo tyrimą), neurografiją (nervų laidumo tyrimą), pėdų odos pasėlį, širdies echoskopiją, širdies autonominius mėginius, kurių metu, atliekant kvėpavimo ir fizinio krūvio mėginius vertinimas širdies susitraukimų dažnis ir arterinis kraujospūdis. Atliekant šiuos tyrimus, galite patirti nemalonių pojūčių.

Įprastai kiekviena procedūra trunka apie 20–30 min.

Pakartotinių vizitų metu bus renkama informacija apie jūsų sveikatą, atliekama objektyvi apžiūra, imamas kraujas iš venos papildomiems tyrimams (10,5 ml – 2

arbatiniai šaukšteliai), atliekamas šlapimo tyrimas, pėdų odos pasėlis, instrumentiniai tyrimai (neurometrija, neurografija, širdies echoskopija, širdies autonominiai mėginiai).

11. Ar dalyvavimas biomedicininiam tyrimui Jums bus naudingas? / Kokios naudos galite tikėtis dalyvaudami šiame tyrimui?

Šio tyrimo metu Jūs būsite ištirtas dėl diabeto komplikacijų, o reguliarius kasmetiniai tyrimai ir gydymo koregavimas leis atitolinti diabeto komplikacijų išsivystymą.

Jūsų genomo ir epigenomo tyrimai leis nustatyti genetinius žymenis ir asociacijas, susijusias diabeto komplikacijų išsivystymu ir pasitarnaus mokslo vystymui.

12. Kokia su dalyvavimu šiame tyrimui susijusi rizika ir nepatogumai?

Dalyvaudami šiame tyrimui galite patirti tokių nepatogumų kaip sugaištas laikas pildant sutikimo formą ir tyrimo klausimynus, jaučiamas diskomfortas atliekant instrumentinius tyrimus – kai ultragarsinis daviklis yra spaudžiamas prie krūtinės ląstos sienos širdies echoskopijos metu, uždedami elektrodai elektrokardiogramos, širdies inervacijos ir neurometrijos užregistravimo metu. Tačiau atliekami instrumentiniai tyrimai yra saugūs ir rizikos sveikatai nesukels.

Kraujo mėginius imsime rutininio tyrimo metu, kuomet kraujas iš venos imamas visiems diabetu sergantiems pacientams.

Dėl nenumatytų aplinkybių konfidenciali informacija gali tapti prieinama tretiesiems asmenims, kuriems ją suteikti nebuvote davęs sutikimo, tačiau tyrėjai dės visas pastangas, kad taip nenutiktų.

13. Jei atsitiktų kas nors negero?

Jūs turite teisę į žalos sveikatai ir su tuo susijusios neturtinės žalos, patirtos dalyvaujant šiame tyrimui, atlyginimą.

Sveikatos priežiūros įstaiga yra sudariusi draudimo sutartį, kurioje numatytas žalos, galinčios atsirasti šio biomedicininio tyrimo metu, atlyginimas.

Tyrimo pagrindinis tyrėjas apdraustas biomedicininio tyrimo civilinės atsakomybės privalomuoju draudimu. Vadinasi, Jūs turite teisę į žalos sveikatai ir su tuo susijusios neturtinės žalos, patirtos dalyvaujant šiame tyrimui, atlyginimą. Su draudimo taisyklėmis galite susipažinti tyrimo vietoje, kreipdamiesi į gydytoją tyrėją.

14. Ar galėsite nutraukti dalyvavimą tyrimui?

Dalyvavimas tyrimui yra savanoriškas. Jūs turite teisę atsisakyti dalyvauti tyrimui, o pradėjus dalyvauti tyrimui, galite bet kada pasitraukti iš tyrimo.

Jūsų sprendimas atsisakyti dalyvauti ar nutraukti dalyvavimą tyrimui nedarys jokios įtakos Jūsų sveikatos priežiūrai. Jei nuspręsite pasitraukti iš tyrimo jam nepasibaigus, tyrėjai Jūsų paprašys parašyti laisvos formos atsisakymo prašymą nenurodant priežasčių ar motyvų arba užpildyti atsisakymo formą, kurią Jums pateiks tyrėjas.

15. Jūsų dalyvavimo tyrimui nutraukimo aplinkybės ir kriterijai

Jei nesilaikysite gydytojo tyrėjo nurodymų Jūs daugiau nebegalėsite dalyvauti tyrimui. Tyrimo gydytojas ar užsakovas turi teisę bet kuriuo metu sustabdyti tyrimą ar Jūsų dalyvavimą jame, jei neatvyksite į suplanuotus vizitus.

16. Kokias pasirinkimo galimybes turėsite, jeigu nesutiksite dalyvauti šiame tyrimui arba atšauksite sutikimą jame dalyvauti?

Tyrimė dalyvaujate savanoriškai, todėl turite teisę atsisakyti, o pradėjęs galite bet kada iš jo pasitraukti.

Jūsų sprendimas atsisakyti dalyvauti ar nutraukti dalyvavimą tyrimė nedarys jokios įtakos teikiamai įprastinei sveikatos priežiūrai.

17. Ar dalyvaudami šiame tyrimė patirsite kokių nors išlaidų?

Dėl dalyvavimo tyrimė nepatirsite išlaidų.

18. Ar Jūsų asmens duomenys bus konfidencialūs?

Biomedicininį tyrimą atliekant gauta sveikatos informacija, leidžianti nustatyti asmens tapatybę, yra konfidenciali ir gali būti teikiama tik pacientų teisės ir asmens duomenų apsaugą reglamentuojančių įstatymų nustatyta tvarka.

Duomenų valdytojas yra Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos.

Siekiant apsaugoti duomenų konfidencialumą, Jums bus suteiktas specialus kodas, kuris bus nurodomas visuose dokumentuose, išskyrus sutikimo formą ir tiriamųjų kodavimo formą (šiuose dokumentuose bus nurodyti Jūsų asmeniniai duomenys).

Kompiuteriai, kuriuose saugomi elektroniniai tyrimo dokumentai ir duomenys, apsaugoti

slaptažodžiu. Prisijungimo kodus žino tik tyrėjai.

Dokumentai saugomi rakinamoje spintoje, kurios raktą turi tik tyrėjai.

19. Kas ir koku tikslu galės susipažinti su Jūsų asmens duomenimis?

Pasirašydami šią formą sutinkate, kad tyrimo centro tyrėjai, tyrimus kontroliuojančios institucijos (etikos komitetai) ir įgalioti tyrimo užsakovo tyrimą prižiūrintys asmenys galės susipažinti su visa šio tyrimo tikslais apie Jus surinkta informacija. Kitiems asmenims ar įmonėms bus teikiami tik užkoduoti sveikatos duomenys, neleidžiantys tiesiogiai nustatyti Jūsų tapatybės.

Surinktus duomenis tyrimo gydytojai naudos tik šio klinikinio tyrimo tikslais viešojo intereso labui.

Turite teisę prašyti, kad duomenų valdytojas leistų susipažinti su savo asmens duomenimis, juos ištaisyti, ištrinti arba apriboti ar sustabdyti duomenų tvarkymą, turite teisę nesutikti, kad duomenys būtų tvarkomi bei teisę į duomenų perkėliamumą.

20. Kiek laiko bus saugomi tyrimo metu surinkti duomenys ir kas už tai bus atsakingas?

Visa informacija bus renkama specialiai klinikiniam tyrimui sudaromuose elektroniniuose ir

popieriniuose dokumentuose tiek, kiek užtruks biomedicininis tyrimas. Už dokumentų saugojimą tyrimo centre bus atsakingas sveikatos priežiūros įstaiga kartu su pagrindiniu tyrėju. Baigus tyrimą asmeniniai duomenys bus sunaikinti per metus nuo tyrimo pabaigos. Kita dokumentacija susijusi su tyrimu bus saugoma 5 metus Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos centralizuotame archyve pagal Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos Generalinio direktoriaus patvirtintą įsakymą, po to dokumentacija yra sunaikinama pagal teisės aktais reglamentuotą tvarką archyve.

21. Kas įvertino šį biomedicininį tyrimą? / Į ką kreiptis, jeigu iškiltų klausimų?

Dėl savo kaip tyrimo dalyvio teisių galite kreiptis į leidimą atlikti šį biomedicininį tyrimą išdavusį Vilniaus regioninį biomedicininį tyrimų etikos komitetą, M. K. Čiurlionio g. 21/27 (231 kab.), LT-03101, Vilnius, tel. (8-5) 2686998, el. paštas: rbtek@mf.vu.lt.

Jei Jums kils bet kokių klausimų ar neaiškumų dėl Jūsų asmens duomenų naudojimo ir saugojimo, galėsite susisiekti su tyrimą atliekančiu gydytoju, kuris savo ruožtu susisieks su tyrimo užsakovu. Jūs taip pat galėsite susisiekti su atsakinguoju duomenų apsaugos pareigūnu tyrimo centre duomeni.sauga@santa.lt.

Skundą dėl duomenų valdytojo veiksmų (neveikimo), kuriais pažeidžiamos teisės aktų, reglamentuojančių asmens duomenų apsaugą, nuostatos galite pateikti Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai L. Sapiegos g. 17, 10312, Vilnius tel. + 370 5 279 14 45, faks. +370 5 261 94 94, el. Paštas: ada@ada.lt, interneto svetainė <http://www.ada.lt/>

Tyrimo centras: Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos, Santariškių g. 2, Vilnius, tel.: (8-5) 236 5000, el. paštas: info@santa.lt.

Pagrindinis tyrėjas:

Doc. Dr. Žydrūnė Visockienė, tel.:+37052365309, el. paštas: zydrune,visockiene@santa.lt

Tyrėjai:

Laura Šiaulienė, gydytoja endokrinologė

Dr. Ieva Sereikė, gydytoja neurologė

SUTIKIMAS DALYVAUTI BIOMEDICININIAME TYRIME „GENETINIŲ, EPIGENETINIŲ VEIKSNIŲ IR GYVENIMO BŪDO ĮTAKA KOMPLIKACIJŲ IŠSIVYSTYMIUI CUKRINIŲ DIABETU SERGANTIEMS PACIENTAMS“

- Aš perskaičiau šią Informuoto asmens sutikimo formą ir supratau man pateiktą informaciją.
- Man buvo suteikta galimybė užduoti klausimus ir gavau mane tenkinančius atsakymus.
- Supratau, kad galiu bet kada pasitraukti iš tyrimo, nenurodydama(s) priežasčių.
- Supratau, kad norėdama(s) atšaukti sutikimą dalyvauti biomedicininiam tyrimui, raštu turiu apie tai informuoti tyrėją / kitą jo įgaliotą biomedicininį tyrimą atliekantį asmenį.
- Patvirtinu, kad turėjau užtektinai laiko apsvastyti man suteiktą informaciją apie biomedicininį tyrimą.
- Supratau, kad dalyvavimas šiame tyrimui yra savanoriškas.
- Patvirtinu, kad sutikimą dalyvauti šiame biomedicininiam tyrimui duodu laisva valia.
- Leidžiu naudoti asmens duomenis ta apimtimi ir būdu, kaip nurodyta Informuoto asmens sutikimo formoje.
- Patvirtinu, kad gavau Informuoto asmens sutikimo formos egzempliorių, pasirašytą tyrėjo / kito jo įgalioto biomedicininį tyrimą atliekančio asmens.

☐ Sutinku dalyvauti biomedicininiam tyrimui ir kad duomenys apie sveikatą būtų tvarkomi kaip aprašyta šioje sutikimo formoje šio biomedicininio tyrimo tikslu

Asmuo (ar kitas sutikimą turintis teisę duoti asmuo)

_____	_____	_____
vardas	pavardė	atstovavimo pagrindas
_____	_____	_____
parašas	pasirašymo data	pasirašymo laikas

- Patvirtinu, kad suteikiau informaciją apie biomedicininį tyrimą aukščiau nurodytam asmeniui.
- Patvirtinu, kad asmeniui (ar kitam sutikimą duoti turinčiam teisę asmeniui) buvo skirta pakankamai laiko apsispręsti dalyvauti biomedicininiam tyrimui,

atsižvelgiant į biomedicininio tyrimo pobūdį, taip pat įvertinus kitas aplinkybes, galinčias daryti įtaką priimamam sprendimui.

- Aš skatinau asmenį (ar kitą sutikimą turintį teisę duoti asmenį) užduoti klausimus ir į juos atsakiau.

Tyrėjas ar kitas jo įgaliotą biomedicininį tyrimą atliekantis asmuo

vardas

pavardė

parašas

pasirašymo data

pasirašymo laikas

Priedas 3. Informuoto asmens sutikimo forma diabetu nesergantiems tiriamiesiems

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA DIABETU NESERGANTIEMS

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: Genetinių, epigenetinių veiksnių ir gyvenimo būdo įtaka komplikacijų išsivystymui cukriniu diabetu sergantiems pacientams.

Protokolo Nr.: 1.5

Užsakovas: Viešoji įstaiga Vilniaus Universitetas

Adresas: Universiteto g. 3, Vilnius

Tel.: 868723382

El. paštas: mokslas@cr.vu.lt

Užsakovo atstovas: mokslo prorektorius prof. Rimantas Jankauskas

Atsakingas tyrėjas: doc. Dr. Žydrūnė Visockienė

Tyrimo centro pavadinimas: Jungtinis kompetencijų ir biomedicininio tyrimų centras, Vilniaus universiteto ligoninė Santaros Klinikos.

Adresas: Santariškių g. 2, 08661 Vilnius

Tel.: (+370) 5 236 5000

El. paštas: info@santa.lt

Gerbiamas paciente,

Jūs esate kviečiamas dalyvauti biomediciniame tyrime. Šio tyrimo tikslas – surinkti klinikinius duomenis apie cukriniu diabetu sergančius ir sveikus asmenis. Surinkti duomenys tarnautų moksliniais tikslais ir galbūt ateityje pagerintų cukriniu diabetu sergančių asmenų priežiūrą ir gydymą.

1. Kokia šio dokumento paskirtis?

Šioje formoje pateikiama Jums skirta informacija apie biomedicininį tyrimą, aptariamą tyrimo atlikimo priežastys, mokslinio tyrimo procedūros, nauda, rizika, galimi nepatogumai ir kita svarbi informacija. Tam, kad galėtumėme įtraukti Jus į mokslinį tyrimą, turite žinoti, jog Jums reikės pateikti tyrimui reikalingus asmens duomenis. Jei nuspręsite dalyvauti, prašysime Jūsų pasirašyti šią sutikimo formą, kuria sutinkate tyrimo metu vykdyti gydytojo tyrėjo ir tyrimo komandos nurodymus. Pasirašydami šį dokumentą, sutinkate dalyvauti moksliniame tyrime. Neskubėkite ir atidžiai perskaitykite šį dokumentą, jei nesupratote kokio nors žodžio ar teiginio, visus iškilusius klausimus būtinai užduokite tyrimo gydytojui ar kitiems tyrimo komandos nariams. Prieš priimdami sprendimą, galite pasitarti su šeimos nariais, draugais ar savo gydytoju.

2. Kodėl atliekami biomedicininiai tyrimai?

Svarbu suprasti, kad nors biomedicininio tyrimo metu Jums bus atliekami sveikatos patikrinimai ar medicininės procedūros, biomedicininis tyrimas iš esmės skiriasi nuo įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos. Įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos tikslas yra Jus (t. y. konkretų asmenį, pacientą) išgydyti ir/ar pagerinti Jūsų sveikatos būklę. Pagrindinis biomedicininio (mokslinio) tyrimo tikslas – gauti naujų medicinos mokslo žinių, kurios ateityje padėtų cukriniu diabetu sergančių pacientų sveikatai. Kitaip tariant, pagrindinis šio tyrimo tikslas nėra tiesioginė nauda Jūsų sveikatai.

3. Kodėl atliekamas šis tyrimas?

Cukrinis diabetas (CD) grėsmingas sukeliamomis komplikacijomis, kurios pasireiškia tiek pirmo (CD1), tiek antro (CD2) cukrinio diabeto tipo atveju. Diabetinės komplikacijos yra vienos dažniausių pacientų aklumo, inkstų funkcijos nepakankamumo ir dializės, kojų opų ir netrauminių kojų amputacijų, infarkto, insulto priežasčių. Šios komplikacijos ženkliai pablogina pacientų gyvenimo kokybę, padidina sergamumą, mirštamumą ir sveikatos priežiūros kaštus.

Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami diabeto biožymenys (glikozilintas hemoglobinas, glikemija) ne visada atspindi diabeto komplikacijų išsivystymo riziką. Tyrimų duomenys rodo, kad diabeto komplikacijos daliai pacientų gali išsivystyti esant santykinai žemai glikemijai (sergant prediabetu) arba, priešingai, tam tikrai daliai ilgai diabetu sergančių pacientų komplikacijos neišsivysto, nepriklausomai nuo glikemijos kontrolės. Manoma, kad diabeto komplikacijų išsivystymas iš dalies priklauso nuo genetinių veiksnių. Šio tyrimų tikslas yra įvertinti tam tikrus diabeto komplikacijų vystymosi mechanizmus ir nustatyti genetinius, epigenetinius ir gyvenimo būdo veiksnius, įtakojančius diabeto komplikacijų išsivystymą, klinikinį pasireiškimą ir progresavimą. Nustatyti rizikos veiksniai ir gyvenimo būdo korekcija galėtų pristabdyti diabeto komplikacijų išsivystymą. Taikant genetinius tyrimus klinikinėje praktikoje būtų galima anksti nustatyti didelės rizikos pacientus, kuriems ypač naudingas intensyvus gydymas ir griežta ligos kontrolė. Šios žinios leistų prognozuoti diabeto komplikacijų vystymosi tikimybę ir atsaką į gydymą ir taip įgalintų personalizuotą diabetu sergančių pacientų priežiūrą.

4. Kokie asmenys pasirenkami dalyvauti šiame tyrime?

Tyrime dalyvauti bus kviečiami pacientai, sergantys pirmo ir antro tipo cukriniu diabetu ir sveiki asmenys (kontrolinė grupė) nuo 18 iki 89 metų amžiaus, gydomi VUL SK ar kitose gydymo įstaigose. Jūs būtumėte įtrauktas į kontrolinę grupę. Visiems pacientams tyrimai bus atliekami pagal protokole aprašytą tvarką.

5. Kas atlieka / užsako šį biomedicininį?

Šio biomedicininio tyrimo užsakovas yra Vilniaus universitetas.

Tyrimų centras – Vilniaus universiteto Santaros klinikų Jungtinis kompetencijų ir biomedicininių tyrimų centras.

6. Tikimybė patekti į skirtingas tiriamųjų grupes ir dalyvavimo šiose grupėse ypatybės.

Asmenys, kuriems nustatytas cukrinis diabetas pateks į tiriamųjų grupę, o nesergantys bus priskiriami kontrolinei grupei. Visiems tiriamiesiems bus atliekami biocheminiai ir genetiniai kraujo tyrimai, epigenetiniai šlapimo ir kraujo tyrimai, pėdų odos pasėlis.

7. Kiek truks Jūsų dalyvavimas šiame tyrime?

Kontrolinės grupės tiriamųjų ištyrimas bus vienkartinis – turėsite apsilankyti pas gydytoją tyrėją 1 kartą. **8. Kokiose šalyse bus vykdomas šis tyrimas?**
Lietuvoje

9. Kiek tiriamųjų dalyvaus numatyta šiame tyrime?

Tikimasi, kad šiame biomedicininiam tyrime dalyvaus apie 600 žmonių, iš jų – 300 sveiki asmenys ir 300 sergantieji diabetu.

10. Ką Jums reikės daryti?

Sutikus dalyvauti biomedicininiam tyrime ir pasirašius sutikimo formą, šio tyrimo tikslu apsilankymo metu prašysime leisti:

- naudotis medicinos dokumentais, esančiais įtaigoje. Iš medicinos dokumentų rinksime duomenis apie Jūsų sveikatą, gretutinius susirgimus, atliktų tyrimų duomenis;
- atlikti objektyvią apžiūrą (ūgis, svoris, AKS, pulsas, liemens apimtis, pėdų būklė)
- paimti kraujo iš venos papildomiems tyrimams iki 9 ml (2 arbatiniai šaukšteliai);
- paimti pėdų odos pasėlį.

11. Ar dalyvavimas biomedicininiam tyrime Jums bus naudingas? / Kokios naudos galite tikėtis dalyvaudami šiame tyrime?

Jūsų genomo ir epigenomo tyrimai leis nustatyti genetinius žymenis ir asociacijas, susijusias diabeto komplikacijų išsivystymu ir pasitarnaus mokslo vystymui.

12. Kokia su dalyvavimu šiame tyrime susijusi rizika ir nepatogumai?

Dalyvaudami šiame tyrime galite patirti tokių nepatogumų kaip sugaištas laikas pildant sutikimo formą, pridudant kraujo papildomiems kraujo mėginiams. Dėl nenumatytų aplinkybių konfidenciali informacija gali tapti prieinama tretiesiems asmenims, kuriems ją suteikti nebuvote davęs sutikimo, tačiau tyrėjai dės visas pastangas, kad taip nenutiktų.

13. Jei atsitiktų kas nors negero?

Jūs turite teisę į žalos sveikatai ir su tuo susijusios neturtinės žalos, patirtos dalyvaujant šiame tyrime, atlyginimą.

Sveikatos priežiūros įstaiga yra sudariusi draudimo sutartį, kurioje numatytas žalos, galinčios atsirasti šio biomedicininio tyrimo metu, atlyginimas.

Tyrimo pagrindinis tyrėjas apdraustas biomedicininio tyrimo civilinės atsakomybės privalomuoju draudimu. Vadinasi, Jūs turite teisę į žalos sveikatai ir su tuo susijusios neturtinės žalos, patirtos dalyvaujant šiame tyrime, atlyginimą. Su draudimo taisyklėmis galite susipažinti tyrimo vietoje, kreipdamiesi į gydytoją tyrėją.

14. Ar galėsite nutraukti dalyvavimą tyrime?

Dalyvavimas tyrime yra savanoriškas. Jūs turite teisę atsisakyti dalyvauti tyrime ir Jūsų sprendimas nedarys jokios įtakos Jūsų sveikatos priežiūrai.

15. Jūsų dalyvavimo tyrime nutraukimo aplinkybės ir kriterijai

Jei nesilaikysite gydytojo tyrėjo nurodymų, Jūs negalėsite dalyvauti tyrime.

16. Kokias pasirinkimo galimybes turėsite, jeigu nesutiksite dalyvauti šiame tyrime arba atšauksite sutikimą jame dalyvauti?

Tyrime dalyvaujate savanoriškai, todėl turite teisę atsisakyti.

Jūsų sprendimas atsisakyti dalyvauti tyrime nedarys jokios įtakos teikiamai įprastinei sveikatos priežiūrai.

17. Ar dalyvaudami šiame tyrime patirsite kokių nors išlaidų?

Dėl dalyvavimo tyrime nepatirsite išlaidų.

18. Ar Jūsų asmens duomenys bus konfidencialūs?

Biomedicininį tyrimą atliekant gauta sveikatos informacija, leidžianti nustatyti asmens tapatybę, yra konfidenciali ir gali būti teikiama tik pacientų teisės ir asmens duomenų apsaugą reglamentuojančių įstatymų nustatyta tvarka.

Duomenų valdytojas yra Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos.

Siekiant apsaugoti duomenų konfidencialumą, Jums bus suteiktas specialus kodas, kuris bus nurodomas visuose dokumentuose, išskyrus sutikimo formą ir tiriamųjų kodavimo formą (šiuose dokumentuose bus nurodyti Jūsų asmeniniai duomenys).

Kompiuteriai, kuriuose saugomi elektroniniai tyrimo dokumentai ir duomenys, apsaugoti

slaptažodžiu. Prisijungimo kodus žino tik tyrėjai.

Dokumentai saugomi rakinamoje spintoje, kurios raktą turi tik tyrėjai.

19. Kas ir kokių tikslu galės susipažinti su Jūsų asmens duomenimis?

Pasirašydami šią formą sutinkate, kad tyrimo centro tyrėjai, tyrimus kontroliuojančios institucijos (etikos komitetai) ir įgalioti tyrimo užsakovo tyrimą prižiūrintys asmenys galės susipažinti su visa šio tyrimo tikslais apie Jus surinkta informacija. Kitiems asmenims ar įmonėms bus teikiami tik užkoduoti sveikatos duomenys, neleidžiantys tiesiogiai nustatyti Jūsų tapatybės.

Surinktus duomenis tyrimo gydytojai naudos tik šio klinikinio tyrimo tikslais viešojo intereso labui.

Turite teisę prašyti, kad duomenų valdytojas leistų susipažinti su savo asmens duomenimis, juos ištaisyti, ištrinti arba apriboti ar sustabdyti duomenų tvarkymą, turite teisę nesutikti, kad duomenys būtų tvarkomi bei teisę į duomenų perkeliamumą.

20. Kiek laiko bus saugomi tyrimo metu surinkti duomenys ir kas už tai bus atsakingas?

Visa informacija bus renkama specialiai klinikiniam tyrimui sudaromuose elektroniniuose ir

popieriniuose dokumentuose tiek, kiek užtruks biomedicininis tyrimas. Už dokumentų saugojimą tyrimo centre bus atsakingas sveikatos priežiūros įstaiga kartu su pagrindiniu tyrėju. Baigus tyrimą asmeniniai duomenys bus sunaikinti per metus nuo tyrimo pabaigos. Kita dokumentacija susijusi su tyrimu bus saugoma 5 metus Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos centralizuotame archyve pagal Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos Generalinio direktoriaus patvirtintą įsakymą, po to dokumentacija yra sunaikinama pagal teisės aktais reglamentuotą tvarką archyve.

21. Kas įvertino šį biomedicininį tyrimą? / Į ką kreiptis, jeigu iškiltų klausimų?

Dėl savo kaip tyrimo dalyvio teisių galite kreiptis į leidimą atlikti šį biomedicininį tyrimą išdavusį Vilniaus regioninį biomedicininį tyrimų etikos komitetą, M. K.

Čiurlionio g. 21/27 (231 kab.), LT-03101, Vilnius, tel. (8-5) 2686998, el. paštas: rbtek@mf.vu.lt.

Jei Jums kils bet kokių klausimų ar neaiškumų dėl Jūsų asmens duomenų naudojimo ir saugojimo, galėsite susisiekti su tyrimą atliekančiu gydytoju, kuris savo ruožtu susisieks su tyrimo užsakovu. Jūs taip pat galėsite susisiekti su atsakinguoju duomenų apsaugos pareigūnu tyrimo centre duomenusauga@santa.lt.

Skundą dėl duomenų valdytojo veiksmų (neveikimo), kuriais pažeidžiamos teisės aktų, reglamentuojančių asmens duomenų apsaugą, nuostatos galite pateikti Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai L. Sapiegos g. 17, 10312, Vilnius tel. +370 5 279 14 45, faks. +370 5 261 94 94, el. paštas ada@ada.lt, interneto svetainė <http://www.ada.lt/>

Tyrimo centras: Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos, Santariškių g. 2, Vilnius, tel.: (8-5) 236 5000, el. paštas: info@santa.lt.

Pagrindinis tyrėjas:

Doc. Dr. Žydrūnė Visockienė, tel.: +37052365309, el. paštas: zydrune.visockiene@santa.lt

Tyrėjai:

Laura Šiaulienė, gydytoja endokrinologė

Dr. Ieva Sereikė, gydytoja neurologė

SUTIKIMAS DALYVAUTI BIOMEDICININIAME TYRIME „GENETINIŲ, EPIGENETINIŲ VEIKSNIŲ IR GYVENIMO BŪDO ĮTAKA KOMPLIKACIJŲ IŠSIVYSTYIMUI CUKRINIŲ DIABETU SERGANTIEMS PACIENTAMS“

- Aš perskaičiau šią Informuoto asmens sutikimo formą ir supratau man pateiktą informaciją.
- Man buvo suteikta galimybė užduoti klausimus ir gavau mane tenkinančius atsakymus.
- Supratau, kad galiu bet kada pasitraukti iš tyrimo, nenurodydama(s) priežasčių.
- Supratau, kad norėdama(s) atšaukti sutikimą dalyvauti biomedicininiam tyrimui, raštu turiu apie tai informuoti tyrėją / kitą jo įgaliotą biomedicininį tyrimą atliekantį asmenį.
- Patvirtinu, kad turėjau užtekstinai laiko apsvarstyti man suteiktą informaciją apie biomedicininį tyrimą.
- Supratau, kad dalyvavimas šiame tyrimui yra savanoriškas.
- Patvirtinu, kad sutikimą dalyvauti šiame biomedicininiam tyrimui duodu laisva valia.
- Leidžiu naudoti asmens duomenis ta apimtimi ir būdu, kaip nurodyta Informuoto asmens sutikimo formoje.
- Patvirtinu, kad gavau Informuoto asmens sutikimo formos egzempliorių, pasirašytą tyrėjo / kito jo įgalioto biomedicininį tyrimą atliekančio asmens.

☐ Sutinku dalyvauti biomedicininiam tyrimui ir kad duomenys apie sveikatą būtų tvarkomi kaip aprašyta šioje sutikimo formoje šio biomedicininio tyrimo tikslu

Asmuo (ar kitas sutikimą turintis teisę duoti asmuo)

Vardas	Pavardė	atstovavimo pagrindas
Parašas	pasirašymo data	pasirašymo laikas

- Patvirtinu, kad suteikiau informaciją apie biomedicininį tyrimą aukščiau nurodytam asmeniui.

- Patvirtinu, kad asmeniui (ar kitam sutikimą duoti turinčiam teisę asmeniui) buvo skirta pakankamai laiko apsispręsti dalyvauti biomedicininiam tyrimo, atsižvelgiant į biomedicininio tyrimo pobūdį, taip pat įvertinus kitas aplinkybes, galinčias daryti įtaką priimamam sprendimui.
- Aš skatinau asmenį (ar kitą sutikimą turintį teisę duoti asmenį) užduoti klausimus ir į juos atsakiau.

Tyrėjas ar kitas jo įgaliotą biomedicininį tyrimą atliekantis asmuo

_____	_____	
Vardas	Pavardė	
_____	_____	_____
Parašas	pasirašymo data	pasirašymo laikas

Priedas 4. Tiriamųjų ištyrimo planas.

	Tiriamųjų grupė	Kontrolinė grupė
Informuoto asmens sutikimo forma	X	X
Anamneziniai duomenys	X	X
Klausimynas (NSS)	X	
Objektyvi apžiūra	X	X
Diabetinės pėdos ištyrimas (NDS)	X	
Neurometrija	X	
Elektroneurografija	X	
Autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimas (AKRT)	X	
Biocheminiai kraujo tyrimai	X	X
Epigenetiniai tyrimai	X	X
Genetiniai tyrimai	X ir po 5–7 d.	X

Keturiasdešimčiai hospitalizuotų CD pacientų genetiniai tyrimai bus pakartoti 5-tą – 7-tą hospitalizacijos dieną.

Priedas 5. Paciento apklausos anketa

Vizitas 1

Vizito data

Gimimo metai	_____ m.
Lytis	Mot. ☐ Vyr. ☐
Diabeto nustatymo data	_____ m.
Diabeto tipas	CD 1 ☐ CD 2 ☐
Naujai diagnozuotas	TAIP ☐ NE ☐
Diabetinė ketoacidozė	TAIP ☐ NE ☐
AK	NETIRTA ☐ NE ☐ TAIP ☐ (GADA, prieš insuliną, prieš kasos β-ląst.)
Paskutinis HbA1c	_____ Bloga ilgalaikė kontrolė NE ☐ TAIP ☐ _____ metai: HbA1c ☐ 7-8% ☐ 8-9% ☐ 9-10% ☐ >10%
Retinopatija	TAIP ☐ _____ metais NE ☐ NETIRTA ☐ Preproliferacinė ☐ _____ m. Proliferacinė ☐ _____ m. Makulopatija ☐ _____ m. Lazerioterapija TAIP ☐ NE ☐ 1 akis ☐ _____ metais abi akys ☐ _____ metais Aklumas TAIP ☐ NE ☐
Lėtinė inkstų liga	TAIP ☐ _____ metais NE ☐ NETIRTA ☐ Kreatininas _____ mcmol/l GFG _____ Stadija _____ Dializė TAIP ☐ NE ☐ Inkstų transplantacija TAIP ☐ NE ☐
Nefropatija	TAIP ☐ _____ metais NE ☐ NETIRTA ☐ Albumino kreatinino santykis _____ Mikroalbuminurija _____
Neuropatija	Polineuropatija TAIP ☐ _____ metais NE ☐ Greitai progresuojanti TAIP ☐ _____ metais NE ☐ hiperglikeminė neuropatija KAN TAIP ☐ _____ metais NE ☐ GI autonominė neuropatija TAIP ☐ _____ metais NE ☐ Urogenitalinė neuropatija TAIP ☐ _____ metais NE ☐
Angiopatija	TAIP ☐ _____ metais, nustatyta po _____ NE ☐
Periferinių kraujag. šuntavimas ar angioplastika	TAIP ☐ _____ metais NE ☐

Amputacijos: piršto/ pėdos/ kojos	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
IŠL	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
MI	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
Širdies vainikinių kraujagyslių šuntavimas, angioplastika ar stentavimas	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
Insultas (išeminis ar hemoraginis)	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
PAH	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
ŠN	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
Dislipidemija	TAIP ☐ _____metai	NE ☐																																																							
Kitos ligos	TAIP ☐ NE ☐ ☐ skydliaukės _____ ☐ autoimuninės: ☐ alergija _____ ☐ vitiligo _____ ☐ bronchinė astma _____ ☐ reumatoidinis artritas _____ ☐ kita _____ ☐ podagra/hiperurikemija _____ ☐ onkologinės _____																																																								
Šeiminė anamnezė	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>TAIP</th> <th>NE</th> <th>NEŽINAU</th> <th>AMŽIUS (kai susirgo)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Tėvas</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Mama</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Vaikai</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Seneliai iš mamos pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Seneliai iš tėvo pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Dėdės/tetos iš mamos pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Dėdės/tetos iš tėvo pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Pusbroliai iš mamos pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Pusbroliai iš tėvo pusės</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Brolis/sesuo</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		TAIP	NE	NEŽINAU	AMŽIUS (kai susirgo)	Tėvas					Mama					Vaikai					Seneliai iš mamos pusės					Seneliai iš tėvo pusės					Dėdės/tetos iš mamos pusės					Dėdės/tetos iš tėvo pusės					Pusbroliai iš mamos pusės					Pusbroliai iš tėvo pusės					Brolis/sesuo					
	TAIP	NE	NEŽINAU	AMŽIUS (kai susirgo)																																																					
Tėvas																																																									
Mama																																																									
Vaikai																																																									
Seneliai iš mamos pusės																																																									
Seneliai iš tėvo pusės																																																									
Dėdės/tetos iš mamos pusės																																																									
Dėdės/tetos iš tėvo pusės																																																									
Pusbroliai iš mamos pusės																																																									
Pusbroliai iš tėvo pusės																																																									
Brolis/sesuo																																																									
Neštumai	NE ☐ TAIP ☐ Naujagimių svoris _____																																																								
Rūkymas	Rūko NE ☐ TAIP ☐ _____cig./d _____metai Rūkė NE ☐ TAIP ☐ _____cig./d _____metai																																																								
Alkoholio vartojimas	NE ☐ TAIP ☐ _____metai																																																								
Pėdų priežiūra:																																																									
Laikas po paskutinio plovimo	_____val.																																																								
Emolientų vartojimas	NE ☐ TAIP ☐ _____k./sav.																																																								
Gydomasis pedikiūras	NE ☐ TAIP ☐ _____k./m.																																																								

Priedas 6. Neuropatijos simptomų skalės klausimynas

NEUROPATIJOS SIMPTOMŲ SKALĖS KLAUSIMYNAS

PILDYMO DATA: _____ PACIENTO KODAS: _____

1. Ar jaučiate (pasirenkamas 1 iš 2):

- kojų deginimą, tirpimą, dilgčiojimą (2).
- nuovargį, mėšlungį, skausmą (1)

2. Skausmus jaučiate:

- pėdose (2 balas)
- blauzdose (1 balas)
- kitur (0)

3. Skausmas paūmėja:

- nakties metu (2)
- skauda vienodai nakties ir dienos metu (1)
- skauda tik dienos metu (0)
- ar buvote pabudęs dėl skausmo (1)

4. Skausmas sumažėja:

- einant (2)
- stovint (1)
- sėdint arba gulint (0)

Priedas 7. Objektivaus ištýrimo forma

Vizito numeris					
Data					
Ūgis (cm)					
Svoris (kg)					
KMI (kg/m ²)					
Liemens apimtis (cm)					
Klubų apimtis (cm)					
Kaklo apimtis (cm)					
AKS (mm/Hg)					
Pulsas (k/min)					

Priedas 8. Neurometrijos protokolas

Pacientas: _____ Tyrimo data: _____

Vardas, pavardė _____ LIN _____ gimimo metai _____

Tyrimo sritis:

1: kojos pirštas 2: _____ 3: _____

	N rod m u o	Sritis1 - K			Sritis2 - K			Sritis3 - K			Sritis1 - D			Sritis2 - D			Sritis3 - D		
		H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
HIPOESTEZIJA	25																		
	24																		
	23																		
	22																		
	21																		
	20																		
	19																		
	18																		
	17																		
	16																		
	15																		
	14																		
NORMA	13																		
	12																		
	11																		
	10																		
	9																		
	8																		
	7																		
	6																		
HIPERESTEZIJA	5																		
	4																		
	3																		
	2																		
	1																		
		Sritis1 - K			Sritis2 - K			Sritis3 - K			Sritis1 - D			Sritis2 - D			Sritis3 - D		
H: 2000Hz stambios mielinizuotos (Aβ)*				M: 250Hz smulkios mielinizuotos (Aδ)**								L: 5Hz smulkios nemielinizuotos (C)**							

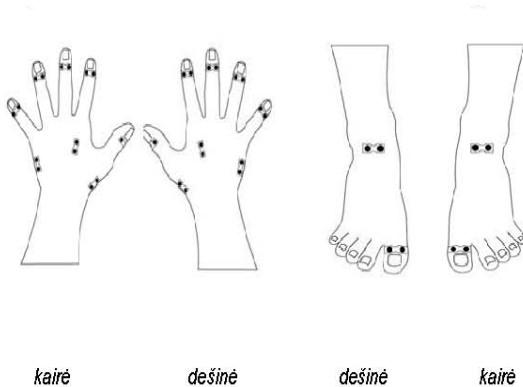
A-beta(β) sensorinēs nervinēs skaidulos(H)* – stambios mieliniztuos skaidulos, perduodančios lieto, spaudimo, vibrācijas, kũno padēties suvokimo pojučius. Laidumo greitis (LG) = 50 m/s.

A-delta(δ) sensorinēs nervinēs skaidulos(M)** – smulkios mieliniztuos skaidulos, perduodančios greito skausmo, vibrācijas, temperatũros (šalčio) pojučius. LG = 20 m/s.

C sensorinēs nervinēs skaidulos(L)*** – smulkios nemieliniztuos skaidulos, perduodančios temperatũros (šilumos), lēto skausmo pojučius. LG = 1 m/s

Tyrimo sritis:

(apibraukti)



IŠVADOS:

Priedas 9. Neurografijos protokolas



VILNIAUS UNIVERSITETO LIGONINĖS SANTAROS KLINIKOS

NEUROLOGIJOS CENTRAS
NEUROLOGINIŲ FUNKCINIŲ TYRIMŲ
KABINETAS

Santariškių 2, LT-2021 Vilnius tel:85-2365000 faks: 85-2365111 <http://santa.lt> el.p.:info@santa.lt

PACIENTAS

Gimimo data:

LIN:

Siuntimo nr.:

Siuntimo data:

Siuntė: Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos VŠĮ (Vilniaus m., Santariškių g. 2),

Siuntimo tekstas:

Nusiuštas į: Neurologijos centro diagnostiniai tyrimai

INSTRUMENTINIS TYRIMAS Nr.

Elektroneurografija (ENG)

Paslaugos kodas: 43045, Elektroneurografija > 6 nervų tyrimas arba nervų tyrimas su spec. metodais

Aprašymo data:

Paciento ūgis: cm

1. Impulso laidumas motorinėmis nervų skaidulomis (NCVm)

	Dešinė				Kairė			
Nervas	Amp. (mV)	L(ms)	NCV dist	NCV proks.	Amp. (mV)	L(ms)	NCV dist	NCV proks.
N. medianus								
N. peroneus								
N. tibialis								

2. Impulso sensorinėmis nervų skaidulomis (NCVs)

	Dešinė				Kairė			
Nervas	Amp. (mV)	L(ms)	NCV dist	NCV proks.	Amp. (mV)	L(ms)	NCV dist	NCV proks.
N. medianus								
N. suralis								

Išvados:

Tyrimą atliko: IEVA SEREIKĖ

Tyrimą aprašė: IEVA SEREIKĖ

Priedas 10. Autonominių kardiovaskulinių refleksų tyrimo (AKRT) atlikimo technika ir vertinimas [57].

MĖGINYS	ATLIKIMO TECHNIKA	REZULTATAS
ŠSD atsakas į gilų kvėpavimą (vertinama parasimpatinė inervacija)	Pacientas gulėdamas ar sėdėdamas giliai kvėpuoja 6 k./min. dažniu. Registruojama EKG.	Norma: ŠSD padidėja įkvėpimo ir sumažėja iškvėpimo metu. ŠSD įkvėpimo/iškvėpimo skirtumas >15 k./min. Patologija: ŠSD įkvėpimo/iškvėpimo skirtumas <10 k./min. Įkvėpimo/iškvėpimo R-R santykis su amžiumi mažėja: 20-24 metai: ≥ 1.17 ; 25-29: ≥ 1.15 ; 30-34: ≥ 1.13 ; 35-39: ≥ 1.12 ; 40-44: ≥ 1.10 ; 45-49: ≥ 1.08 ; 50-54: ≥ 1.07 ; 55-59: ≥ 1.06 ; 60-64: ≥ 1.04 ; 65-69: ≥ 1.03 ; 70-75: ≥ 1.02
ŠSD atsakas į stovėjimą (vertinama parasimpatinė inervacija)	Nuolat monitoruojant EKG pacientas iš sėdimos pozicijos atsistoja. Matuojamas 15-to ir 30-to R-R intervalų (po atsistojimo) santykis	Normali reakcija į atsistojimą – tachikardija lydima ŠSD retėjimo. Normalus R-R santykis $30:15 \geq 1.03$.
ŠSD atsakas į Valsalvos mėginį (vertinama parasimpatinė ir simpatinė inervacija)	Pacientas sėdėdamas 15 s pučia orą į manometrą 40 mmHg spaudimu. Matuojamas trumpiausias R-R intervalas pūtimo metu ir ilgiausias R-R intervalas atsipalaidavimo metu.	Fiziologinis atsakas į pūtimą – tachikardija ir vazokonstrikcija; atsipalaidavus – bradikardija. Normalus santykis: ilgiausias R-R/ trumpiausias R-R intervalas ≥ 1.12
Sistolinio AKS (sAKS) atsakas į stovėjimą (vertinama simpatinė inervacija)	Pacientas guli 5 min. Išmatuojamas AKS. Pacientas atsistoja. Po 3 min. pakartotinai išmatuojamas AKS.	Fiziologinis atsakas: sAKS sumažėjimas stovint ≤ 10 mmHg. Testas teigiamas, jei sAKS sumažėja ≥ 30 mmHg.

Priedas 11. Autonominės širdies neuropatijos protokolas

AUTONOMINĖS ŠIRDIES NEUROPATIJOS TYRIMAS

Name : SSN code:
 Date of birth : Mother's name :
 Weight : Height:
 Date :
 Doctor :

Autonom cardialis neuropathia
 (Based on the cardiovascular reflex test determined by Ewing)

	Normal	Limit	Abnormal	Score
			Result	

SIGNS OF PARASYMPATHETIC DAMAGES

Resting Heart Rate

QTcb averaged ECG cycle:

QTcb RRmin ECG cycle:

QTcb RRmax ECG cycle:

HR min:

HR max:

Deep breath test: ☐ 15 11 - 14 ☐ 10

Valsalva-maneuver: ☐ 1,21 ☐ 1,10
 1,11 - 1,20

Lying-to-standing (30:15): ☐ 1,04 ☐ 1,00
 1,01 - 1,03

SIGNS OF SYMPATHETIC DAMAGES

Orthostatic BP < 10 11 - 29 ☐

changes: 30

Handgrip: > 16 11 - 15 ☐
 10

Total SCORE value: < 3 3 - 5 > 6 0

HRVi triangular index:

Therapeutic proposals:

City, date

Signature

Priedas 12. Cukriniu diabetu sergančių pacientų, gydytų α -lipoine rūgštimi, klinikiniai ir citogenetiniai duomenys.

Paciento nr.	Diagnozė	Amžius, metai	Lytis	HbA1c, %	Kreatininas, $\mu\text{mol/L}$	eGFR, mL/min/1.73m^2	ALR gydymas (mg x dienos)	Skausmo intensyvumas		SCM/ląstelėje		MB, %		8-OHdG, ng/ml	
								Prieš	Po	Prieš	Po	Prieš	Po	Prieš	Po
123	CD1	23	M	>7*	62	134	600 x 6	0	0	8.44	8.06	1.79	2.14	12.30	n.d.
145	CD2	61	F	8.9	41	108	600 x 5	8	5	10.74	8.48	4.35	4.69	n.d.	n.d.
146	CD1	56	F	8.8	63	95	600 x 5	8	2	13.18	10.22	8.03	6.81	23.34	n.d.
150	CD1	37	F	7.2	61	112	600 x 5	8	3	9.42	8.16	n.d.	n.d.	11.78	n.d.
151	CD2	48	M	11.4	78	101	600 x 5	7	4	10.38	10.94	4.02	5.35	n.d.	n.d.
161	CD2	69	M	8	83	82	600 x 9	6	3	10.52	8.58	2.73	2.63	10.46	n.d.
162	CD2	53	M	7.3	77	99	600 x 4	10	5	9.88	9.58	2.55	2.56	11.90	n.d.
167	CD2	60	F	8	77	73	600 x 4	10	5	8.90	8.06	6.16	4.20	13.21	9.93
169	CD2	61	M	12.6	82	94	600 x 4	3	3	8.80	8.82	3.30	2.78	9.85	7.63
170	CD1	49	M	11.3	60	113	600 x 5	0	0	7.82	9.34	3.33	4.17	12.35	9.11
171	CD2	60	F	<7*	78	71	600 x 5	6	4	10.2	11.72	3.21	2.62	20.73	16.63
172	CD1	43	F	>7*	55	111	600 x 5	4	3	9.20	11.42	5.39	3.61	13.67	10.88
173	CD2	81	F	7.2	62	82	600 x 7	7	6	8.76	7.42	5.07	4.87	11.52	10.54
175	CD2	66	F	8.5	67	86	600 x 6	0	0	7.92	9.24	4.92	5.84	14.06	12.61
176	CD2	60	F	9.2	54	103	600 x 6	6	0	8.48	7.92	4.11	4.97	13.67	13.04
183	CD1	25	M	6.2	100	90	600 x 9	4	2	7.40	7.34	n.d.	n.d.	10.01	8.63
Vidurkis		53.2								9.38	9.08	4.21	4.09	13.49	11.00
SD		15.4								1.43	1.37	1.63	1.42	3.89	2.75

ALR – α -lipoinė rūgštis, eGFR – glomerulų filtracijos greitis, HbA1c – glikozilintas hemoglobinas, MB – mikrobranduoliai, SCM – seserinių chromatidžių mainai, 8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas.

Priedas 13. Kontrolinių asmenų, palygintų su α -lipoine rūgštimi gydytais, diabetu sergančiais pacientais, klinikiniai ir citogenetiniai duomenys

Paciento nr.	Amžius, metai	Lytis	Alkio glikemija, mmol/l	SCM/ląstelėje	MB, ‰	8-OHdG, ng/ml
137	32	F	5.2	7.28	2.95	8.05
178	32	M	4.5	9.20	1.27	n.d.
142	36	M	4.5	6.32	2.18	14.02
138	38	M	4.9	10.42	1.81	13.10
117	41	F	4.5	7.86	3.72	11.36
127	41	M	5.7	6.88	4.06	14.86
129	41	F	4.8	7.72	6.64	12.51
130	41	F	4.8	8.68	5.61	8.34
131	41	F	4.6	6.58	6.73	9.66
189	41	F	5.3	8.28	2.18	n.d.
143	43	M	5.4	8.62	2.51	14.65
120	45	F	5.5	4.92	2.19	10.01
118	53	F	5.8	5.62	5.06	13.27
139	56	M	6.0	8.50	4.59	7.29
132	62	F	5.3	10.10	4.82	11.01
128	70	F	5.1	8.10	4.23	17.13
Vidurkis	44.6			7.82	3.78	11.80
SD	10.5			1.51	1.71	2.91

MB – mikrobranduoliai, SCM – seserinių chromatidžių mainai, 8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinas

SANTRAUKA

INTRODUCTION

The incidence of diabetes mellitus (DM) is rising rapidly, with one in 10 adults worldwide currently suffering from DM [1]. DM is particularly dangerous in terms of complications. Diabetic microvascular complications rank among the most common causes of blindness, renal failure, dialysis, leg ulcers, and non-traumatic lower extremity amputations [2–4].

The World Health Organisation has recognized DM as a leading cause of morbidity and mortality and has listed it as a priority non-communicable disease with the aim of reducing the incidence of DM and its complications through evidence-based guidelines [9].

Despite many studies, there are still gaps in the understanding of the risk factors and pathogenesis of DM complications. For example, while the role of classical risk factors (hyperglycemia, diabetes duration) in the developing of diabetic complications is well established, the data on some other risk factors, such as obesity, dyslipidemia, and primary arterial hypertension, are either limited or contradictory [408].

The above-mentioned risk factors together with hyperglycemia increase the number of free radicals (FR) in the body, and oxidative stress (OS) damages mitochondria, the endoplasmic reticulum, and proteins, causing oxidative DNA damage and genome instability [32]. However, the data on the frequency of different types of DNA damage (sister chromatid exchange (SCE), chromosomal aberrations (CA), micronuclei (MN)) in DM patients compared to healthy controls, and the association of the frequency of DNA damage with clinical data, are contradictory: some studies have reported a higher frequency of sister chromatid exchange in DM patients compared to controls [33,33,34], but others have found no such difference [35]; a positive association between SCE and glycosylated hemoglobin (HbA1c) has been observed in some studies [36], but not in others [33]; some studies have found a higher frequency of CA in DM patients compared to controls [37–39], but no such difference has been observed in others [33,35,40]. Clinical studies evaluating the association of SCE and CA with clinical indicators of DM are limited, and there are no studies assessing the association of such damage with microvascular complications of diabetes [41]. The MN frequency has been studied most extensively in the DM patient population, with higher MN frequency in T2DM patients compared to healthy controls [32,42], and a positive association between MN frequency and DM progression [43], DM

duration [44,45] and poor glycaemic control [42,44,46,47], diabetic nephropathy [45] and DSPN [44]. However, the majority of studies on MN have focused on T2DM patients, while studies supporting the association of MN frequency and T1DM, as well as broader studies on microvascular complications of diabetes, are lacking [32,48].

Growing evidence suggests that epigenetic factors play a role in the development of DM and diabetic complications. Studies have linked specific miRNAs to residual pancreatic β -cell function, prediabetes, DM risk [49–53], diabetes management [54], and diabetic complications [55]. MiRNAs could be used as biomarkers for early diagnosis of diabetes, assessment of disease control, risk of diabetes complications, and treatment evaluation, but further research is needed.

Despite DSPN representing the most common microvascular complication of diabetes, data on the association of DSPN with DNA damage in DM patients are limited compared to other complications [44], as there is no standardized evaluation for diagnosing this complication to date [56]. Studies on the association of cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) with DNA damage in DM patients have not been conducted because of the time-consuming nature of patient testing, and the need for dedicated equipment and trained personnel [57].

The success rate of symptomatic treatment of DSPN is low, and the effectiveness of alpha-lipoic acid (ALA) for pathogenetic treatment varies between studies. There are also no explicit guidelines on the duration of treatment with ALA.

This study aims to provide a detailed assessment of clinical condition, DSPN, and CAN in DM patients and to correlate obtained clinical data with genetic and epigenetic findings, as well also to evaluate the effect of ALA IV therapy on pain sensation and DNA damage in DM patients.

Aim of the Study

To assess and compare the biomarkers of DNA damage in DM patients and non-diabetic control subjects (control group) and relate them to the subjects' clinical data.

Objectives of the Study

- To examine DM patients for diabetic distal symmetric polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy;
- To analyze DNA damage in DM patients and controls – the frequency of chromosomal aberrations (CA), micronuclei (MN), and sister chromatid exchange (SCE), as well as markers of oxidative damage;
- To analyze the expression of four miRNAs – miR-16, miR-17, miR-106a and miR-223 – in DM patients;
- To correlate patients' anamnestic data, clinical indicators, and diabetic neuropathy test results with cytogenetic and epigenetic test results;
- To evaluate changes in clinical status and cytogenetic and oxidative markers after treatment with IV antioxidant alpha-lipoic acid (ALA).

Novelty of the Study

This study examined DM patients for the least studied microvascular complications of diabetes, diabetic neuropathy (DN), using several different methods. It also compared these methods with each other and between the two types of DM. For the first time in Lithuania, cytogenetic testing of CA, SCE, and MN frequency was performed in DM patients, and a subset of patients were tested for the complete set of genetic parameters – oxidative markers, cytogenetic testing, and miRNAs. Genetic and epigenetic test results were linked to clinical data, generating new and previously unreported correlations. Our study was the first to test for mutagen sensitivity in DM patients and to assess correlations with clinical data.

Some subjects were also assessed for the effects of short-term ALA treatment on cytogenetic damage and oxidative stress markers.

METHODS

The study was conducted at the Endocrinology Centre of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos. The biomedical research was approved by the Vilnius Regional Bioethics Committee (No 2019/6-1146-635, Annex 1). The study included two participant groups: patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus and a control group.

Clinical testing

Demographic, epidemiological, and clinical patient data were collected using the subject's medical records and a questionnaire.

The subjective symptoms of neuropathy were assessed using the Neuropathy Symptom Score (NSS) questionnaire [312]. The Universal Pain Assessment Tool (UPAT) was used to determine the severity of pain in painful polyneuropathy: 0 – no pain, 1–3 – mild, 4–6 – moderate, 7–8 – severe, 9–10 – worst pain possible [291,292].

An objective examination of the subjects was performed to determine height, weight, BMI and blood pressure; an objective foot evaluation was performed using the Neuropathy Disability Scale (NDS) [312], neurometry (NM) was performed with a neurometer (NervScan3000), and electroneurography (ENG) with the Neuropack X1 MEB-2300 device by Nihon Kohden, according to the recommended methodologies of the International Federation of Clinical Neurophysiology (ICFN).

Cardiovascular autonomic reflex tests (CARTs) were performed using the Cardiosys Extra machine.

Blood plasma concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OhdG) was tested using an ELISA DNA damage kit according to the manufacturer's test protocol (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD, USA). Using the manufacturer's 8-OhdG solution, a standard curve was generated with 2x dilutions in the range of 0-8000 pg/mL. The oxG level was measured for each patient in two 50 µL plasma samples diluted 8-fold. Absorbance readings were taken within 10 minutes of sample preparation at 450 nm using a microplate reader Infinite M200 (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

Cytogenetic testing

Cytogenetic assays were performed using sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA), and micronucleus in binucleated lymphocytes (CBMN) methods.

Blood samples were drawn from the donor's ulnar vein into disposable vacuum blood collection tubes with lithium heparin (Vacutainer®). For peripheral blood lymphocyte culture, a mixture of RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, USA), 12% heat-inactivated fetal calf serum (Sigma Aldrich, USA), and heparinized blood (12:3:1) was prepared. Phytohaemagglutinin (PHA-M) 7.8 mcg/mL (Biological Industries, Israel) was added to stimulate

lymphocytes, while 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 10 µg/mL (Sigma Aldrich, USA) and gentamicin 50 µg/mL were added for differential expression of sister chromatids. The mixture was decanted into vials of 10 mL each and capped with sterile stoppers. For CBMN and SCE methods, four vials were prepared for each variant per patient. The blood was cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in a thermostat for 48 hours (CA assay) or 72 hours (SCE and MN methods).

For the CBMN assay, cytochalasin B (Sigma Aldrich, USA) was added at hour 44; For the SCE and CA assays, colchicine (Sigma Aldrich, USA) was added 3 hours before fixation, with a final concentration of 0.6 µg/mL.

Cultures were harvested with centrifugation for 10 minutes at 600 × g (Eppendorf 5702 centrifuge) for the SCE and CA methods and for 8 minutes at 400 × g for the CBMN method. The supernatant layer was aspirated and approximately 0.5-1.0 ml of suspension was left. The subsequent fixation process differs between the CA, SCE, and CBMN methods.

For CA and SCE methods, the precipitate was resuspended and treated with 10-12 ml of hypotonic solution (0.55% KCl 40°C). The culture was held for 30 minutes in a thermostat at 37°C. A fixative was prepared from a mixture of methanol and glacial acetic acid (Sigma Chemical Co., USA) in a ratio of 3:1 and then cooled in a freezer. The culture was centrifuged (600 × g for 10 min) and the supernatant was aspirated. The cells were resuspended in the residual hypotonic solution (~0.5 mL), a small amount of fixative was added, shaken well and the entire centrifuge tube was filled to 8-10 mL with fixative. After the first fixation, the cell culture was stored in a cold chamber (-20°C) for 25 minutes and then centrifuged (600 × g for 10 min).

For the CBMN method, cells were treated with the cold hypotonic solution at 4°C (0.55% KCl), then centrifugated immediately at 400 × g for 8 minutes, and the supernatant was obtained. The fixative ratio is 5:1. The fixative is diluted 1:1 with 0.9% NaCl solution for the first fixation. As with the SCE and CA methods, the cells were resuspended in the residual hypotonic solution (~0.5 mL), a small amount of fixative was added, the cell culture was again shaken and the centrifuge tube was filled with fixative. The culture was kept at room temperature for 20 minutes, centrifuged for 8 minutes at 400 × g and the cells were harvested.

The fixation process was repeated twice for all methods, with a full dose of undiluted fixative added at once. Following the last fixation, the cell culture was stored in a cold chamber (-20°C) until the slides were prepared.

The slides were prepared by thoroughly rinsing them under running water, then immersing them in a container of distilled water and keeping them

in a freezing chamber until a layer of ice crystals formed on the water's surface. The culture was centrifuged ($600 \times g$ for 10 minutes), and the supernatant layer was then aspirated. 4-5 preparations were made for each variant. The precipitate was gently shaken in the residual fixative using a glass Pasteur pipette. For the SCE and CA methods, the cell suspension (4-5 drops) was applied with a Pasteur pipette to a chilled slide inclined at an angle of 20-30° (45%) from a height of 50 cm and carefully dried over an alcohol burner flame. For the CBMN method, the suspension was likewise applied to a glass slide inclined at an angle of 20-30° from a 3-5 cm height, and the slides were allowed to air dry.

The quality of the unstained slides was checked under a microscope. The slides were aged for one day before the staining procedure. The day after aging, the slides were stained with a Giemsa stain diluted in distilled water (1:9 for the CBMN and SCE methods, 1:20 for the CA method).

For the SCE method, prior to the Giemsa stain, the slides were additionally stained with fluorescent H $\ddot{o}$ chst 33258 (Sigma Aldrich, USA) in phosphate Sorensen buffer (Sigma Aldrich, USA), pH 6.8. The H $\ddot{o}$ chst 33258 solution (10 μ g/mL) was poured over the entire surface of the slide and kept in the dark for 10-15 minutes. The slide was then rinsed in distilled water and dried. The citrate (McIlven's) buffer (pH 8.5) was prepared from 0.1 M citric acid (Merck KgaA, Germany) and 0.2 M Na₂HPO₄ (Merck KgaA, Germany) (0.55 mL and 19.45 mL respectively). The citrate buffer was applied to the slides and covered with a coverslip, covering the entire surface area of the slide. The slides were irradiated with a 400 W UV lamp at a distance of 20 cm for approximately 6-7 minutes. 4 min into the irradiation, the citrate buffer was dripped at the coverslips' joints and repeated every 4 min. At the end of the irradiation interval, the slides were rinsed in distilled water and dried at room temperature.

The stained slides were analyzed on a Nikon ECLIPSE E 200 microscope using LUCIA's automated image analysis system. The analysis was performed on cells containing 44-47 well-stained, moderately spiralized chromosomes, evenly distributed in the metaphase plate. For the SCE assessment, the average number of SCEs was calculated, and the minimum and maximum number of SCEs of the variant tested was assessed. For SCE, 50 metaphase plates from the second division cycle were analyzed for each variant in the patient sample. High frequency cells (HFCs), which influence the distribution of SCE between cells, were also investigated. HFCs were identified according to the method of Carrano and Moore (1982) [293], whereby the SCE frequencies of all cells in the control group are added together in a single sample, and an HFC

is defined as a cell with an SCE frequency above the 95th percentile of the pooled sample of the control group. Based on the calculations, HFCs in our study were defined as cells with an SCE frequency above 14.

The CA method, 200 metaphase plates were analyzed and classified into chromatid and chromosomal types according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1985).

A mutagen sensitivity assay was also performed for MN and SCE. The mutagen sensitivity assay assessed *in vitro* DNA repair efficiency [295]. It was calculated by the difference between SCEs or MNs found in the mutagen-exposed cultures and SCEs or MNs found in the unaffected cultures. Differences were denoted as SCE-IND or MN-IND, respectively. Higher levels of induced damage indicated greater sensitivity to the mutagen and a possible decline in repair efficiency [295]. 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) was used as a mutagen in the assay.

4NQO (Sigma Aldrich, USA) was added to the cell culture at hour 24 for the CBMN assay and hour 48 for the SCE assay, with a final concentration of 0.1 µg/mL.

MicroRNA

The miRNAs were analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The following microRNAs were identified in the literature as associated with the risk of developing DM and diabetic complications: miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, and miR-223-3p. The PCR test involves RNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis and amplification, and real-time PCR.

RNA was extracted from frozen leucocyte samples using TRIzolTM LS reagent following the manufacturer's protocol (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific). 4.88 pmol/L of exogenous miRNA ath-miR159a (Metabion) was added to 250 µL of thawed leucocyte sample and gently mixed. Then 750 µL of TRIzolTM LS reagent was added, and the sample was mixed gently by rolling and incubated for 6 minutes at room temperature. After incubation, 200 µL of 96% chloroform (Carl ROTH) was added to the sample, gently mixed by rolling, and incubated at room temperature for 3 minutes. After incubation, the sample was centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C. The top aqueous layer containing the RNA fraction was transferred to a new 1.5 mL microcentrifuge tube. 500 µL of 100% isopropanol (Fisher Bioreagents) was added to the RNA fraction and mixed. The sample was incubated for 10

minutes at room temperature and centrifuged at $12\,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C, the supernatant was removed, leaving the RNA pellet. The RNA pellet was washed with 1 ml of 75% ethanol (Honeywell) and centrifuged at $7500 \times g$ for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and the remaining ethanol was dried (10 minutes at room temperature). The purified RNA was dissolved in 40 μ L of nuclease-free water (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific) and incubated for 10 minutes at 58°C. The concentration and purity of the isolated RNA were assessed using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific). The isolated RNA was used immediately for complementary DNA (cDNA) synthesis or stored for a short time at -20°C.

Complementary DNA (cDNA) synthesis was achieved using the TaqMan Advanced miRNA Synthesis Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) by the manufacturer's instructions. For the miRNA expression assay, cDNA was synthesized for all miRNAs in the sample through four reactions: polyadenylation, adapter ligation, reverse transcription (RT), and primary amplification – preamplification.

The pre-amplified cDNA samples were either used immediately for miRNA expression assays by quantitative PCR (qPCR) or stored for a short time at -20°C until assayed.

The levels of 4 miRNAs – miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, and miR-223-3p – were estimated by qPCR. The qPCR was performed in MicroAmp™ Optical 8-Tube Strips with MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips or in MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plates, 0.1 mL (all by Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) with adhesive optical sealing films for qPCR, 50 μ m (Nerbeplus). The composition of the reaction mixture per sample was autoclaved distilled water (final concentration/volume up to 20 μ L), TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (1 $\times$), TaqMan Advanced MicroRNA Assay Primer and Hydrolysis Probe Set (FAM) (0.4 $\times$), ROX (0.1 μ M), cDNA (5 μ L), as shown in Table 2.6 (final volume 20 μ L). For amplification, a cDNA sample diluted 10-fold with nuclease-free water was used. Samples were centrifuged at 4000 rpm for 2 minutes (Universal 320 centrifuge). QuantStudio™ 7 Pro Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) was used for amplification. Two technical PCR replicates were performed for each sample. A no-template control (NTC) water reaction was prepared for each miRNA tested. The temperature regime of the qPCR reaction was 95°C for 2 min, 50 cycles at 95°C for 3 seconds, and 60°C for 30 seconds. A fluorescence reading was taken at the end of each cycle.

The data were processed with QuantStudio Software v1.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). The fluorescence signal was normalized against the ROX fluorescent passive reference dye, and the quantification cycle (Cq) was set to a threshold of 0.2 relative fluorescence units (RFU). The expression of the tested miRNAs was normalized against the exogenous control ath-miR159a and converted to relative values on a linear scale using the GenEx v7.0 software (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden).

Statistical analysis

The categorical data are presented as numerical and percentage frequencies. The difference between the nominal variable groups was assessed using the Chi-square (χ^2) test. For continuous (quantitative) variables, the mean with standard deviation was used. The Mann-Whitney U test was applied to compare the means of two independent groups and the Kruskal-Wallis test was applied to compare the means of three independent groups.

For the multivariate regression analysis, chromosome aberration data were transformed through average square root transformation: $Y=0.5[(X)0.5+(X+1)0.5]$, where X is the number of chromosome aberrations per 100 cells, and Y is the transformed variable. This transformation was shown to be effective in stabilizing dispersion [298]. SCE and MN were analyzed without transformation. The initial multivariate regression model included all independent variables used for the demographic and clinical characterization of the subjects. The most suitable independent variables were selected using stepwise multivariate regression by estimating the p-value and the variance inflation factor. The final models were selected based on the best values of R-square, multiple correlation coefficient, and goodness of fit, then validated by assessing the normality of residuals, exclusion of multicollinearity, and a priori power >0.8. The dependence of binary variables on the different covariates was evaluated using logistic regression and the independent variables were selected using stepwise regression.

Statistical calculations were performed using IBM SPSS Statistics v. 26.0 software and the online statistical spreadsheets Statistics Kingdom [299] and Stats.Blue [300].

RESULTS

Clinical evaluation

The study included 176 subjects: 66 T1DM patients, 80 T2DM patients and 30 controls. Demographic and clinical data for the DM patients and controls are presented in Table 3.1.

More women were recruited in the control and T2DM groups, and more men were recruited in the T1DM group, but no significant difference was found between the study groups. The largest proportion of smokers was in the T1DM group, and the smallest was in the control group. T2DM patients were significantly older and had higher BMI than T1DM patients and controls and T1DM patients had lower BMI than controls and T2DM patients. Family history of diabetes was more frequent in T1DM and T2DM patients compared to controls, but a significant difference was found between T2DM and controls. The history of diabetes and the frequency of microvascular complications such as diabetic retinopathy, nephropathy, and polyneuropathy did not differ between the T1DM and T2DM. CAN was the only microvascular complication more often diagnosed in T2DM than in T1DM patients. In T2DM patients, a significantly higher frequency of comorbidities such as dyslipidemia, PAH, and IHD were observed compared to T1DM patients and the control group. These comorbidities were also more frequent in T1DM patients compared to the control group, but statistical significance was observed only when comparing PAH and dyslipidemia, but not IHD. More than 2/3 of T2DM patients were taking insulin and metformin. At the time of study enrollment, a small proportion of T1DM patients were taking oral antidiabetic drugs due to misdiagnosis prior to hospitalization.

Neuropathy, cytogenetic, and epigenetic testing was not available for all patients due to: limited staff resources (a single neurologist performed), patient comorbidities (for instance, CARTs testing was not administered for patients with a pacemaker or significant thoracic deformities), accidental loss of blood samples, challenges of coordination of sampling and testing time, cell culture failure and failed testing.

All DM patients – 66 T1DM and 80 T2DM cases – were screened for DN.

The incidence of DSPN did not show differences between T1DM and T2DM patients. Still, the incidence of DSPN did vary according to the diagnostic method used, being highest with NM (T1DM – 53.0%, T2DM –

46.8%) and lowest in clinical neuropathy testing (T1DM – 25.8%, T2DM – 32.5%) (Figure 3.1).

Clinical testing with a tuning fork, Tip-Therm device, hypodermic needle and Achilles tendon reflexes demonstrated that the only test showing a difference between T1DM and T2DM patients was the vibration perception measured with a tuning fork, with a significantly higher incidence of vibration perception impairment in the T2DM group (71.3% vs 48.5%, $p=0.05$). ENG test revealed that T1DM patients, compared to T2DM patients, were more prone to have lower peroneal nerve amplitude (41.2% vs 19.2%, $p=0.027$), latency prolongation (23.5% vs 5.8%, $p=0.016$) and lower nerve conduction velocity (32.4% vs 11.5%, $p=0.018$). NM parameters showed no difference between T1DM and T1DM patients ($p>0.05$) (Table 3.2).

Painful DSPN (SAS 1-10) was more frequent in T2DM patients compared to T1DM patients, 42 (52.5%) vs 18 (27.3%), respectively, $p=0.002$, but the pain severity in patients with painful DSPN did not differ, with an average score of 4.5 in both groups ($p=0.852$).

The overlap between the positive results of the methods was calculated in order to select the DSPN testing method for further analysis. Compared with the other two methods, positive results were most commonly repeated with ENG and less frequently with clinical testing and NM. The same tendency was observed when comparing the methods for T1DM and T2DM groups separately (Table 3.3). However, ENG was performed for the smallest number of patients (86 patients (58.9%)). Therefore, the clinical testing method was chosen for further statistical analysis (conducted in all 146 patients (100%)).

CAN was more common in T2DM patients compared to T1DM patients, 45 (60.0%) vs 20 (32.3%), respectively (Figure 3.1). All CARTs were more often impaired in T2DM patients than T1DM, and the heart rate response to deep the breathing test reached statistical significance (19.4% vs 46.7%, $p=0.001$) (Table 3.2).

Cytogenetic tests results

8-OHdG concentration was measured in 97 subjects, the clinical and demographic data of the subjects are presented in Table 3.6.

Gender distribution did not differ significantly between the groups. T2DM compared to T1DM patients and controls were significantly older, more often had DM family history and comorbidities such as obesity, PAH,

CHD, and dyslipidemia, and more often were on statins. T1DM patients, compared to the control group, were more often underweight, diagnosed with PAH and dyslipidemia, and more often on statins. T1DM and T2DM patients did not differ regarding diabetes duration, incidence of microvascular complications, and thyroid disease. Most of T1DM patients were treated with insulin, and over 2/3 of T2DM patients were treated with insulin and/or metformin. Smoking habits did not differ between the studied groups.

The distribution of 8-OHdG concentration according to demographic and clinical data is presented in Table 3.7. There was no significant difference in 8-OHdG concentrations between T1DM patients, T2DM patients, and the control group. A higher concentration of 8-OHdG was found in the blood of the control group of men compared to women, while no difference was found in the DM groups. Significantly higher 8-OHdG concentration was found in T1DM patients with chronic kidney disease and PAH compared to T1DM patients without these diseases. A higher concentration of 8-OHdG was detected in T1DM and T2DM polymorbid patients compared to non-polymorbid patients, but only in T1DM patients was the difference statistically significant. No correlations between 8-OHdG concentration and other clinical and demographic indicators were observed.

SCEs were tested in 123 subjects; their demographic and clinical data are presented in Table 3.8.

Although SCE analyses were performed on a larger number of subjects than 8-OHdG, the characteristics of the subjects did not differ significantly, except for a substantially higher proportion of smoking T1DM patients compared to the control group.

Table 3.9 presents the distribution of SCEs and HFCs in the subject groups according to their demographic and clinical characteristics. SCEs and HFCs did not differ between T1DM and T2DM patients, but higher frequencies of SCEs and HFCs were found in both DM patients compared to controls. Also, no significant difference in SCE and HFC was observed between men and women in T1DM, T2DM, and control groups. Higher SCE and HFC frequencies were detected in DM men and women compared to the control, but only the difference in T1DM women reached statistical significance. Smoking, family history of DM, comorbidities such as CHD, dyslipidemia, and thyroid diseases did not significantly affect SCE and HFC, but T1DM and T2DM patients with PAH had a higher frequency of HFC than patients without PAH. T1DM patients with DSPN had significantly higher SCE and HFC than patients without this complication. Still, no significant difference in SCE was found when comparing patients with and without

nephropathy and retinopathy. A significantly lower frequency of HFCs was seen in patients treated with metformin and other oral antidiabetic agents compared with drug-naïve patients. Still SCE frequency did not differ significantly between treatment groups. SCE and HFC did not differ between insulin-treated and non-insulin-treated DM patients.

MNs were tested in 111 subjects, their demographic and clinical data are presented in Table 3.10. T2DM patients compared to T1DM patients and the control group were significantly older, more often had a family history of DM and comorbidities such as obesity, PAH, IHD, and dyslipidemia, and more often were on statins. T1DM patients, compared to the control group, were more likely to smoke, were more often underweight, suffered from PAH dyslipidemia, and were treated with statins. T1DM and T2DM patients did not differ in terms of smoking habits, DM duration, frequency of microvascular complications, and thyroid disease. Most T1DM patients (77.5%) and T2DM (63.4%) were on insulin, and 80% of T2DM patients were using metformin.

Table 3.11 shows the distribution of MNs in the subject groups according to their demographic and clinical characteristics. T1DM and T2DM patients had higher levels of MN than controls, but a statistically significant difference was reached only between T2DM patients and the control group. A significantly higher MN frequency was found in women than men in the T1DM and T2DM groups. Smoking a family history of DM, PAH, and IHD had no significant effect on the frequency of MN. T2DM patients with DSPN, dyslipidemia, and thyroid disease had higher MN levels compared to those without these complications or comorbidities. The diagnosis of nephropathy or CAN had no significant effect on MN frequency. T1DM patients taking statins had higher MN levels than untreated patients. No other significant associations were found between CD treatment and MN rates.

Table 3.12 shows the distribution of SCE-IND by clinical and demographic characteristics. A significantly higher frequency of SCE-IND was observed in both types of DM patients compared to the control group, and the same tendency was observed between DM females and females of the control groups. DM men also had higher SCE-IND than control men, but the difference did not reach statistical significance. Higher SCE-IND was also found in T1DM patients not taking statins compared to those receiving the treatment and in patients without DSPN compared to those diagnosed with this complication. Higher SCE-IND was detected in T2DM patients with CAN than those without CAN, and in non-smokers compared to smokers of the control group.

According to clinical and demographic data, T1DM patients with retinopathy had higher MN-IND frequency compared to those without retinopathy. No other significant differences were found in MN-IND (Table 3.13).

Chromosomal aberrations were analyzed in the peripheral blood lymphocytes of 33 T1DM patients, 22 T2DM patients, and 21 controls; their demographic and clinical data are given in Table 3.14. More men were recruited in the T1DM group compared to the control group. T2DM patients were significantly older, more often had family history of DM and comorbidities such as obesity, dyslipidemia, and PAH, and more frequently used antihypertensive drugs compared to T1DM and controls. However, T1DM and T2DM patients did not differ in the disease duration and the incidence of microvascular complications. Seventy-nine percent of T1DM patients and 68% of TDM2 patients were on insulin and 82% of T2DM patients were on metformin.

Due to the imbalance in demographic and clinical characteristics of the subject sample, a multivariate statistical analysis was performed using variables selected by univariate tests.

For further analysis, we used the CTA (chromatid-type aberration) variable combining CTB and CTE and the CSA (chromosomal-type aberration) variable combining CSB and CSE (table 3.15).

Figure 3.7 shows the frequencies of CTA and CSA in the subject groups. T1DM and T2DM patients showed higher CTA frequencies compared to controls ($p=0.0053$ and $p=0.0133$, respectively, Mann-Whitney U test), but there was no significant difference between T1DM and T2DM ($p=0.9347$). The CSA frequencies were higher in T1DM and T1DM patients than controls ($p=0.0203$ and $p=0.00002$, respectively) and in T2DM patients compared with T1DM patients ($p=0.0173$).

Table 3.16 shows the distribution of CTA, CSA, and total aberrations in the subject groups according to demographic and clinical characteristics. No statistically significant associations were found, and the standardized effect sizes were small. On the contrary, such variables as body mass index (BMI), disease duration, and age evidently influenced some categories of chromosome aberrations. For CTA, there was a statistically significant positive correlation with duration of disease ($r_s=0.29$, $p=0.001$), but no significant correlation was found with age ($r_s=0.18$, $p=0.129$) and BMI ($r_s=0.04$, $p=0.737$). For CSA, there was a statistically significant positive correlation with all three variables – duration of disease ($r_s=0.43$, $p=0.000$), age ($r_s=0.39$, $p=0.000$), and BMI ($r_s=0.35$, $p=0.002$). However, it is evident

that the subject's age and disease duration are highly correlated variables ($r_s=0.43$, $p=0.000$), so we should consider this during further calculations.

The calculations indicated that many of the demographic and clinical characteristics of the study sample were correlated (Table 3.17). Some correlations were clinically and biologically relevant (e.g., BMI and comorbidities such as PAH, dyslipidemia, and multimorbidity), but others were spurious (e.g., gender and age). The spurious correlations may be due to an insufficient sample balance, as it is impossible to balance some of the variables (e.g., T1DM patients are expected to be younger, have a lower BMI, and be less likely to have comorbidities than T2DM patients). Multivariate statistical calculations using stepwise multivariate and logistic regression analyses were conducted to assess the associations between the different variables and select the truly significant ones.

Stepwise multivariate regression analysis was applied to assess the association of genetic markers with clinical and demographic variables, which included selection of independent variables in the whole sample and certain variables (SCE, HFC, MN, SCE-IND, MN-IND) within the group of DM patients separately.

When evaluating the effect on 8-OHdG concentrations, the best model for the entire study sample, with the highest R-squared, goodness of fit, and coefficient of multiple correlation values, was calculated by including variables such as chronic kidney disease (CKD) and PAH (Table 3.18).

For the effect on SCE frequency, the best model for the whole study sample was calculated by including variables such as age, DSPN, and CAN, while for the DM-only sample, it included age and the use of metformin (Table 3.19).

For the effect on HFCs, the best model for the whole patient sample was calculated by including variables such as age, the use of metformin, DSPN, and PAH, and for the DM-only patient sample by including variables such as age, the use of metformin and DSPN (Table 3.20).

For the effect on MN frequency, the best model was calculated by including variables such as age, sex, and nephropathy for the whole patient sample and age, sex, and DSPN for the DM-only patient sample (Table 3.21).

The best model for assessing the effect on the frequency of SCE-IND was calculated by including variables such as the use of statins and DSPN in the whole sample of subjects, and age and the use of statins in the DM-only sample (Table 3.22).

The best model for assessing the effect on the frequency of MN-IND was calculated by including variables such as gender, insulin use, retinopathy, and

DSPN in the whole sample of subjects, and age and retinopathy in the DM-only patient sample (Table 3.23).

Due to the small number of subjects, the chromosomal aberration analysis was performed in the total subject sample (DM patients and controls). Given that the mean chromosome aberrations were not distributed normally (Figure 3.2 and Figure 3.3), the frequency of aberrations (CTA, CSA, and total CA) per 100 cells was transformed using the formula $Y=0.5[(X)^{0.5}+(X+1)^{0.5}]$, where X is the frequency of chromosomal aberrations per 100 cells, Y is the transformed variable, prior to the multivariate regression analyses. The results of the D'Agostino-Pearson test demonstrated that the distribution of the three transformed variables, CTA_t, CSA_t, and CA_t, was not significantly different from the normal distribution ($p=0.6010$, $p=0.3571$, and $p=0.4813$ respectively). Stepwise multivariate regression analysis was applied to select the independent variables. The best/most fitting model for the transformed CSA frequency, with the highest R-squared, goodness of fit, and coefficient of multiple correlation values, was calculated by including variables such as BMI, length of disease, and the use of statins (Table 3.24).

In the DM subject group, logistic regression analysis was applied to assess the association of diabetic complications with clinical characteristics and genetic markers, and independent variables were selected.

When evaluating the impact on distal symmetric polyneuropathy, the best model was calculated by including variables such as the duration of diabetes, HbA1c, dyslipidemia, and MN-IND; for autonomic cardiac neuropathy poor diabetes control, PAH, and SCE-IND were included; for retinopathy - the duration of diabetes, poor diabetes control, and MN-IND; and for nephropathy - chronic kidney disease (Table 3.25).

MiRNA test results

Because of the high discrepancy between patients who had cytogenetic indicators, 8-OHdG and miRNA, miRNA analysis was performed separately. MiRNAs were tested in 99 subjects - 40 T1DM patients, 38 T2DM patients, and 21 controls. Clinical and biochemical data of the patients are presented in Table 3.26.

The expression of four miRNAs - miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p and miR-223-3p - was analyzed in leukocytes all subjects. Statistical analysis of the data, was performed using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons tests, and did not show statistically significant differences

between the analyzed groups, except for miR-106a expression, which was statistically significantly ($p = 0.0188$) decreased in the leukocytes of T2DM patients compared to the control group (Figure 3.9).

Associations between changes in miRNA expression and demographic, clinical, biochemical and anthropometric parameters of CD1 patients were investigated using correlation analysis. As the duration of poor glycemic control increased, the expression of miR-16 decreased ($r = -0.42$, $p = 0.0116$). The expression of MiR-17 ($r = -0.32$, $p = 0.0451$), miR-106a ($r = -0.38$, $p = 0.0179$) and miR-223 ($r = -0.44$, $p = 0.0048$) decreased with increasing waist circumference, and expression of miR-17 decreased as the hip circumference increased ($r = -0.35$, $p = 0.0325$). Also, miR-106a expression was negatively correlated with the age of the patients ($r = -0.32$, $p = 0.0384$).

However, in this type of analysis, the potential for false positive results due to multiple comparisons must always be considered. In our case, even the strongest correlation between miR-223 expression and patients' waist circumference ($r = -0.44$, $p = 0.0048$) has a false discovery rate (FDR) of 25%, while for other established correlations it is even bigger. Therefore, it is likely that all these associations listed above are coincidental and do not reflect the real situation. Also, no correlation was found between changes in miRNA expression and microvascular complications and other accompanying diseases in T1DM patients.

Same analysis in T2DM group also did not show an association between miRNA expression and patient demographic, clinical, biochemical and anthropometric parameters, or such an analysis was not possible due to the very small number of patients (≤ 5) in some compared categories.

The above mentioned inter-group miRNA expression analyses showed that the expression of at least one miRNA, miR-106a, is decreased in the T2DM patient group compared to controls. However, it has been previously described that demographic and anthropometric indicators differ between controls and T2DM patients - T2D being older and having a higher body mass. Therefore, logistic (logit) regression analysis was further used to investigate whether miRNA expression could be a marker to distinguish between control and diabetic subjects. Indicators such as the subjects' age and body mass index were also included in the logistic regression models. The results of the analysis are shown in table 3.27.

A more reliable model was obtained for T2DM, however, miR-106a did not appear to be a predictor of type 2 diabetes ($p = 0.3187$), despite the previously observed reduced expression of this miRNA in

T2DM patients' leukocytes. In this model, older age and increased body mass were the most important risk factors.

Although no statistically significant differences were found when comparing miRNA expression between control group and T1DM patients, even two miRNAs, miR-16 and miR-223, were assigned in to the best logistic regression model, but their predictive value, like the model itself, is quite small.

Effect of alpha-lipoic acid IV therapy on clinical parameters, genetic and epigenetic markers

Sixteen patients (6 T1DM and 10 T2DM patients) were treated with ALA infusions of 600 mg once a day for 4 to 9 days. Blood samples were taken in the morning before treatment and a few hours after the last infusion. 8-OHdG concentrations were tested in 14 DM patients before ALA therapy, 9 DM patients after ALA therapy, and 14 control subjects. MN was tested in 14 DM patients and SCE in all 16 DM patients before and after ALA treatment. The subjects' tests and demographic and clinical characteristics are presented in Annex 12 (DM patients) and Annex 13 (control subjects).

Figure 3.14 shows the results of pain severity before and after ALA IV therapy. Three patients had no pain before receiving ALA (pain severity score 0), so their pain severity did not change after treatment. One patient had a pain severity score of 3 before ALA and experienced no change after treatment. The remaining 12 patients reduced pain severity after ALA treatment, some quite significantly, i.e., from 10 to 5, from 8 to 2, and from 6 to 0, and others moderately, i.e., from 7 to 6 or 4 to 2. The overall pain severity in the whole sample was significantly lower after ALA IV therapy than before treatment ($p=0.0024$, Wilcoxon Signed Rank test).

DM patients had slightly higher plasma 8-OHdG concentrations before ALA IV therapy than controls, mainly due to two exclusions (Figure 3.15a). After ALA therapy, the 8-OHdG concentration decreased significantly (Figure 3.15b; $p=0.0039$, Wilcoxon Signed Rank test). Notably, 8-OHdG concentrations decreased in all 9 patients tested for 8-OHdG levels after ALA therapy.

The results of the SCE and MN analysis are presented in Figure 3.16. DM patients had a higher SCE frequency than controls ($p=0.0075$, Mann-Whitney U test), but MN frequency did not differ significantly between groups ($p=0.5$). There was a significant positive correlation of SCE with pain severity (Spearman's rank correlation coefficient $r_s = 0.6543$, $p=0.006$). There were no statistically significant cytogenetic changes (SCE and MN) occurred after ALA therapy.

DISCUSSION

This study aimed to assess and compare the frequency of DNA damage, blood oxidative stress markers, and miRNA expression in patients with diabetes mellitus and a control group and to correlate these data with the subjects' clinical data. The study examined cytogenetic markers such as chromosomal aberrations (CA), frequency of micronuclei (MN), and sister chromatid exchange (SCE), as well as blood 8-OHdG concentration and the miRNAs associated with diabetes and diabetic complications, namely miR-16-5p, miR-17-5p, miR-106a-5p, and miR-223-3p. Clinical testing of the patients included collecting their medical history and examining the DM patients thoroughly for diabetic neuropathy. The study also broadly explored and compared the differences in diabetic neuropathy, i.e., distal symmetric polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy, in T1DM and T2DM patients.

In epidemiological studies, DSPN is more often identified in T2DM patients than T1DM patients, and T2DM patients develop DSPN at earlier stages of the disease, even in prediabetes [200]. This study did not find a difference in DSPN incidence between T1DM and T2DM, possibly due to the specific population of hospitalized subjects presenting with severe and advanced DM. However, the incidence of DSPN in the T1DM and T2DM groups did vary according to the diagnostic method used, possibly due to the differences in the sensitivity and specificity of the methods. The most common method used in clinical practice to assess damage to small and large fiber nerves is the clinical testing of patients using the Neuropathy Symptom Score (NSS) questionnaire and the Neuropathy Disability Score (NDS). However, due to its relatively low sensitivity (NNS ranges up to 68%), only advanced nerve damage can be detected by this method [301], which would explain why the incidence of DSPN in our study was the lowest using this method. Electroneurography (ENG) is an objective and sensitive testing method commonly used in clinical trials. However, this method only detects damage to large fiber nerves, and in most cases, the earlier damage to small fiber nerves remains undetected [301], therefore, this method showed a moderate incidence of DSPN in our study when compared with neurometry (NM). The NM method detects early damage to small and large fiber nerves. Still like other tests that require patient cooperation, NM results are subject to variation depending on patient ability, researcher experience, and other contributing factors. In our study, the NM method demonstrated the highest incidence of DSPN, and these results are consistent with those of other researchers

[302,303]. Accordingly, this test method could be applied for early diagnosis of DSPN or for monitoring DSPN progression.

Looking at the separate DSPN test components, T2DM patients were more likely to have impaired vibration perception using a tuning fork than T1DM patients, indicating damage to large fiber nerves. These findings correlate with those of other researchers who have assessed large fiber nerve damage using a biothesiometer [304] or a vibration perception analyzer [305]. Although vibration perception may decline with age, previous studies have observed a more pronounced impairment of vibration perception in T2DM patients compared to T1DM patients across different age groups. However, not all studies have specified whether age-dependent testing rates were used [304–306]. Other methods in our study did not show a difference in small (temperature and pain perception) or large (Achilles reflex) fiber damage between T1DM and T2DM patients, and other authors have reported conflicting findings [305,307]. The frequency of damage to sensory nerves, such as the sural and tibial nerves, was not different when comparing T1DM and T2DM patients using ENG, but motor nerve dysfunction, such as the peroneal nerve, was observed more frequently in T1DM patients. Motor nerve damage indicates of more advanced and severe nerve fiber damage, suggesting that T1DM patients in our study have more advanced DSPN than T2DM patients. However, other authors have found no difference in motor nerve damage between the DM types [304], and the results were the opposite, with more significant motor nerve damage in T2DM patients [307]; further studies are needed to evaluate these results.

The NM testing showed no significant difference in the frequency of large and small fiber sensory nerve damage between T1DM and T2DM patients, contrary to clinical testing with a tuning fork that found a higher prevalence of large fiber damage in T2DM patients. Literature suggests that the sensitivity of the tuning fork is 62.5%-84.6% [308–310], which is significantly lower than the sensitivity of the NM at 94% [311], indicating that advanced damage to large-fibre sensory nerves may be more common in T2DM patients.

Our study found that painful DSPN was significantly more common in T2DM patients compared to T1DM patients. Similar results have been reported in other studies [312,313]. The exact reason why T2DM patients are more likely to develop painful DSPN is unknown; it is possible that the presence of comorbidities, which are more common in T2DM patients, causes additional damage to the small fiber nerves responsible for pain sensation

[154]. Our study also found that pain severity did not differ between the DM types, although painful DSPN was more common in T2DM patients.

Studies comparing the prevalence of CAN in T1DM and T2DM patients have produced conflicting results: one study found a higher prevalence of CAN in T2DM patients [127], and another in T1DM patients [314]. In contrast, others did not find a significant difference in the prevalence of CAN between the DM types [137,315]. In our study, the prevalence of CAN was twice as high in T2DM patients compared to T1DM patients due to the greater prevalence of parasympathetic dysfunction, as shown by tests of the heart rate response to deep breathing and to standing and by the Valsalva maneuver. The test of heart rate response to deep breathing was the most common pathological test in T2DM patients, and these results are consistent with the findings of Pan et al. [316], suggesting that this test is the most sensitive for diagnosing CAN in T2DM patients. Obesity can impair deep breathing test performance due to impaired thoracic reflexes. Still, although most of T2DM patients in our study were obese, no significant association between obesity and poor deep breathing test performance was found.

T1DM patients had a higher incidence of impaired arterial blood pressure response to standing, indicating sympathetic dysfunction and advanced CAN, but the difference did not reach statistical significance compared to T2DM patients. This trend could indicate that T1DM patients have more severe CAN, but further studies with a larger sample size should confirm this hypothesis.

Our study found links between poor long-term glycaemic control and the risk of developing DSPN and CAN in T1DM patients, but not in T2DM patients. These results are in line with the existing knowledge that hyperglycemia is a significant risk factor for neuropathy in T1DM patients, but that hyperglycemia has a lesser if any, effect on nerve damage in T2DM patients [101]. In our study, the length of diabetes, which together with hyperglycemia causes cumulative glycaemic toxicity, also had a stronger association with the risk of DN in T1DM patients than in T2DM patients. The HbA1c test, which shows glycaemic control in the last 3 months, showed no association with DN in T1DM and T2DM patients, and may be of limited relevance in cross-sectional studies.

Other established risk factors, such as advanced age, other microvascular complications, and comorbidities, were more prevalent in T1DM and T2DM patients with DSPN and CAN compared to patients without these complications. Still, significant associations were observed more often in T1DM than in T2DM patients. The above-mentioned risk factors were positively associated with DSPN and CAN in T1DM patients in the

EURODIAB IDDM (European Insulin Dependent Diabetes Mellitus Prospective Complications Study) [122], and only with DSPN in T1DM patients in the T1D Exchange and the Scottish Register studies [317]. The association of DN with other microvascular complications observed in our study was due to common pathogenetic pathways caused by hyperglycemia. Still, different authors have observed a stronger association of CAN with other microvascular complications in T2DM than in T1DM patients [314].

In our study, lower glomerular filtration rate (GFR) was significantly associated with CAN and DSPN in T1DM but not in T2DM patients. CAN is associated with increased glomerular filtration pressure, glomerular endothelial cell damage, and erythropoietin secretion [316], and a positive association between CAN and worsening renal function has been demonstrated in previous studies both with T1DM [318] and T2DM patients [319]. Other authors have also described uremic DSPN occurring with deteriorating renal function due to large-fibre peripheral nerve damage [320].

Surprisingly, our study showed a stronger association of DSPN and CAN with comorbidities in T1DM patients compared with T2DM patients. Recommendations for DM management to prevent DM complications highlight the importance of glycaemic control in T1DM patients and more holistic care in T2DM patients, which should include PAH, dyslipidemia correction, and weight loss [98,101]. However, this attitude has emerged due to the higher incidence of comorbidities observed in T2DM patients than in T1DM patients, as reported in epidemiological studies [321,322]. Our study included hospitalized T1DM patients with advanced disease and common comorbidities (dyslipidemia, PAH), which may have influenced the stronger association between microvascular complications and comorbidities.

Therefore, for patients with T1DM, comprehensive care may be just as crucial, if not more so, than for those with T2DM.

The associations of clinical and demographic characteristics with genetic markers were first assessed using bivariate analyses. This was followed by multivariate statistical calculations using stepwise multivariate and logistic regression analyses.

In our study, bivariate comparisons with controls showed a higher SCE, HFCs, MN, and SCE-IND frequency in T1DM and T2DM patients. At the same time, 8-OHdG and MN-IND were not significantly different between the groups. Other studies have also found an increase in SCE frequency in treated T2DM [36] and T1DM patients [33,34], but no increase in SCE frequency in patients with a newly diagnosed T2DM who are not yet receiving

antidiabetic treatment [35] and in DM patients on dialysis [40] compared with controls. The findings of MN studies are also inconsistent: while some studies report a higher MN frequency in T1DM and T2DM patients [36,37,43–45,323–326], other studies did not confirm this association [33,34,46]. However, a recent meta-analysis of eight studies confirmed that DM patients exhibit a significantly higher frequency of MN than controls [42]. Higher MN frequency is also observed in obese patients [270,271] and in patients with metabolic syndrome [272] – these comorbidities are prevalent in T2DM patients (up to 90%).

The overall frequency of CA in lymphocytes in our control group (1.83/100 cells) is consistent with previous studies (1.68 to 2.11/100 cells) [327,328]. We found a higher frequency of all types of chromosomal aberrations in T1DM and T2DM patients compared with controls, which is in agreement with the results of other authors for T2DM patients [37,38,329]. However, other studies comparing T1DM patients [33] and recently diagnosed, mostly untreated T2DM patients [35] with control subjects did not find differences in the frequency of CA. Our study also found that the frequency of CTA and CSA varies according to the length of the disease. Another CA study also observed an association with disease duration in T2DM patients [37]. Several MN studies [44,45,323] found no association between MN frequency and disease duration was found in other studies on T2DM patients [36,330]. T1DM patient studies have also failed to show an association of MN with the length of disease [268,323]. However, diabetes duration in the latter studies was significantly shorter compared to our study, which on average was 13 years. Therefore, the shorter disease duration may have been insufficient to produce damage. In our study, T2DM patients had a higher frequency of CA and CSA compared with T1DM patients. Another study found a higher frequency of CA in T2DM patients compared with T1DM patients, without reporting statistical significance [39]. The higher frequency of CA and CSA in T2DM patients may be related to comorbidities such as obesity, arterial hypertension, and dyslipidemia, which are more common in T2DM patients than in T1DM patients. These comorbidities, especially obesity, have been linked to chronic inflammation and an increase in oxidative stress, leading to DNA damage and a higher oncological risk [331–333]. Multivariate analysis in our study also identified BMI as a significant risk factor for chromosomal aberrations. The same trend was observed in MN studies conducted with obese individuals [43,270,272]. Impaired DNA repair [334,335] and increased DNA damage [331] in obese patients have also been observed in other studies. Therefore, correlation

between CSA and BMI in DM patients detected in our study is consistent with previous research. One study found a paradoxical decline in the risk of MN and lung cancer in men with a BMI ≥ 25 kg/m² compared with men with normal weight [336]. However, most of the subjects in that study were exposed to occupation-related polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and the authors attributed the lower frequency of MN and the lower risk of lung cancer in these patients to their improved metabolism of PAHs, which is characteristic of obese individuals. Some previous studies have reported an increased frequency of CA or MN in DM patients with diabetic neuropathy [44,329] or nephropathy [45]. This association of CA with diabetic complications was not found in our study, possibly because of the small study sample. CA was also not associated with DM treatment (metformin or insulin therapy). Still in a multivariate analysis, we found that statin use could be associated with a lower frequency of CA, especially chromosomal-type CA. Although the association found is of marginal significance ($p=0.0763$), results of other authors [259, 350-353] support the protective effect of statins on DNA, and this association deserves further investigation.

In a study by Boehm et al., which used the FISH technique, unusually high frequencies of stable chromosomal aberrations (translocations and inversions) were identified in diabetic patients and were associated with an elevated mortality risk [38]. This association was not observed in our study, possibly due to using another technique, the Giemsa stain. However, our study showed a stronger association of CSA with diabetes duration and BMI when compared with CTA. CSA is known to occur *in vivo* in peripheral lymphocytes, whereas CTA only forms *in vitro* from pre-existing DNA damage [337]; therefore, the higher frequency of CSA in patients with DM, especially with longer DM duration, could be a better reflection of the cumulative DNA damage not only in patients' lymphocytes but also in other cells. The higher frequency of CSA in DM patients could also relate to the higher cancer risk found in epidemiological studies in these patients [338,339]. Other studies also support this association and report a higher cancer risk in patients with higher CSA frequencies [337,340]. This association is unlikely to be causal, but the two associations may share a common pathogenetic mechanism, with chronic inflammation as one of the most plausible links between these pathologies. On the other hand, the increase in CTA frequency may also represent an accumulation of primary DNA damage in lymphocytes, resulting from increased oxidative stress and impaired excision of DNA damage [331,335]. This damage may be associated with diabetes complications and comorbidities.

In conclusion, T1DM and T2DM patients in our study had a higher frequency of all types of chromosomal aberrations compared to controls, and this frequency increased with a longer diabetes duration. Higher body mass index was associated with a higher frequency of CSA, and statin use may have a role in reducing chromosomal aberrations, but further research is needed to confirm this link.

The literature describes an increase in the oxidative stress marker 8-OHdG in DM patients, which was not found in our study, possibly due to the small sample size, while HFCs, MN-IND, and SCE-IND in DM patients have not been studied by other authors. In our study a bivariate comparison was followed by a stepwise multivariate regression, which did not demonstrate a significant effect of diabetes on DNA damage. At the same time, other clinical and demographic characteristics showed significant differences.

The effect of clinical and demographic characteristics on the prevalence of DNA damage by multivariate regression is summarised in Table 4.1.

Age was the most recurrent variable when assessing the effect of clinical and demographic characteristics on the frequency of DNA damage. Multivariate regression calculations showed that age impacted the frequency of SCE, HFCs, and MN in the whole sample of patients and the DM group, and the frequency of SCE-IND and MN-IND in the DM-only group.

The effect of age on DNA damage is well-known. It has been described extensively by other authors: with age, the impact of external factors, metabolic processes, oxidative stress, and DNA replication errors accumulate, and the DNA repair system's capacity declines [341]. These factors contribute to increased DNA breaks and progressive DNA and chromosomal damage, leading to genomic instability, associated with the body's aging process and associated diseases such as cancer [341]. The correlation of MN, SCE, and CA frequency with age has been confirmed in general population studies [342], and the correlation of MN and age in studies on T2DM patients [46] and women with gestational diabetes [324].

Our study also found that disease duration, another clinical indicator, was significantly associated with the frequency of MN and CA in bivariate analyses. Other authors have also found a positive association between MN frequency and DM duration [44,45]. Still the multivariate analysis of MN in our study found that disease duration was strongly associated with age and was therefore excluded from the analysis. The effect of disease duration on chromosomal aberrations (CTA, CSA, and CA) was also significant in the stepwise multivariate regression analysis. BMI was also associated with higher frequency of MN and all types of CA in the total subject sample. Still

only the association between BMI and CA remained statistically significant in the multivariate regression analysis. The consistent effect of disease duration and BMI on the frequency of CA may be because CA reflects cumulative genomic damage [343]. In contrast, SCE and MN represent relatively transient damage [344]. The association of SCE with disease duration was not observed in our study, nor in other authors' studies of T1DM [33] and T2DM [35,36] patients.

Due to data limitations, HbA1c was not included in our study's multivariate analyses. Still other studies have found an association between MN [42,44,46,47], SCE [36] and poor glycaemic control in T2DM but not in T1DM [33] patients.

Distal symmetric polyneuropathy (DSPN) was the most extensively investigated microvascular complication of diabetes in our study (in 3 modalities), and had the highest number of associations with DNA damage compared to other complications – SCE and SCE-IND in the total sample of subjects, HFCs in the DM group and in the total sample of subjects, MN in the DM group, and MN-IND in the total subject sample. Studies on the association between DSPN and DNA damage are lacking. One small study published by Prasad et al. [44] found a higher frequency of MN in patients with DSPN compared to patients without DSPN. To the best of our knowledge, the association of DSPN with the other measures of DNA damage has not been investigated, making it impossible to compare the results. Still, the presence of this complication could indicate of an advanced disease characterized by a more severe metabolic impairment, oxidative stress, and therefore more extensive DNA damage and higher susceptibility to the mutagens identified in the induced DNA damage assay.

In patients with cardiovascular autonomic neuropathy (CAN), another diabetic neuropathy, we found a higher frequency of SCE in the whole sample of subjects. Although other authors have not previously describe this association, shared pathogenetic mechanisms with DSPN, such as oxidative stress and chronic inflammation, could explain the increased DNA damage and SCE frequency in patients with CAN. In our study, patients with diabetic nephropathy had a significantly higher frequency of MN when considering the whole sample. In contrast patients with diabetic retinopathy had a higher frequency of MN-IND when considering the entire sample and DM-only sample. The association of diabetic nephropathy and chronic kidney disease (CKD) with DNA damage has been described by other authors. For example, in mixed cohort studies (diabetic and non-diabetic patients), an increase in MN has been found in patients with CKD [345] and dialysis patients [40]. In

contrast, in the DM cohort, it was found in patients with diabetic nephropathy [45]. Another mixed cohort study found a significantly higher frequency of SCE in the lymphocytes of dialysis patients than in healthy control subjects [41]. The higher frequency of SCE in lymphocytes of dialysis patients was also associated with macrovascular damage, such as more extensive atherosclerotic lesions in the carotid artery [41]. There are no clinical studies investigating the association of diabetic retinopathy with DNA damage.

The association of DNA damage with macrovascular complications (coronary heart disease (CHD), myocardial infarction, stroke) was not found in our study due to the low prevalence of macrovascular complications. Still data from other authors suggest that a higher frequency of SCE in lymphocytes of dialysis patients is associated with more extensive atherosclerotic lesions in the carotid artery [41], and studies in non-DM patients have shown a positive association between the frequency of MN and the risk [346–348] and severity of CHD [346,349].

The effects of PAH and CKD on 8-OHdG found in our study are well-established and described in the literature. Oxidative stress, marked by an increase in 8-OHdG, is a key factor in the pathogenesis of PAH, exacerbating vascular endothelial inflammation, dysfunction, remodeling, and elevation of BP. As such, there is a close relationship exist between PAH and 8-OHdG, as described in a review by A. Di Minno [350]. Poulsen et al. also described a positive association between CKD and 8-OHdG.[351].

Our study found that statin treatment reduced SCE-IND in the whole sample and in the DM group as well as CSA in the entire sample; metformin treatment reduced SCE in the DM group and HFCs in the DM group and in the whole sample; insulin treatment reduced MN-IND in the entire sample.

In addition to their well-known anti-lipid action used in clinical practice, statins also offer antioxidant properties. Statins inhibit the oxidative stress-inducing enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and increase the levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), thus reducing the formation of LR [352]. The positive effect of statins on DNA damage has been demonstrated in *in vitro* studies. Long-term treatment with simvastatin, for example, reduced the frequency of DNA damage measured by the comet assay in lymphocytes of T2DM patients with dyslipidemia [353]. Another study found a negative correlation between statin use and the frequency of comet and MN in lymphocytes of heart failure patients in a bivariate statistical analysis. Still, this association did not survive further multivariate statistical

analysis [354]. A decrease in SCE was observed in the lymphocytes of hemodialysis patients treated with simvastatin *in vitro* [41]. Similarly, treatment with atorvastatin, rosuvastatin [355] and simvastatin [356] reduced the frequency of somatic mutations in *Drosophila* induced by doxorubicin, an antineoplastic drug that increases ROS levels.

Metformin also exhibits pleiotropic antioxidant properties by reducing LR formation in mitochondria, increasing the levels of the antioxidant enzymes SOD, catalase, and GPx, inhibiting advanced glycation end-product (AGE) formation, activating AMP-activated protein kinase (AMPK), etc. [357]. *In vitro* studies have shown that premedication with metformin reduced methotrexate-induced increases in SCE and CA in human lymphocyte cultures [358]. *In vivo*, treatment with metformin also reduced the increase in comets and MN induced by insulin excess in kidney cells of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats [359] and the cisplatin-induced increase in MN frequency in bone marrow cells of rats [360]. Interestingly, while *in vitro* metformin improves mitochondrial function and reduces oxidative stress, higher doses of metformin have been shown to have the opposite effect, i.e. increasing oxidative stress [357] and DNA damage [269].

Insulin treatment can also improve cellular metabolism, reduce glucose toxicity, chronic inflammation, oxidative stress, and lymphocyte DNA susceptibility to mutagens [361,362]. This effect may account for the lower frequency of MN-IND in our study's lymphocytes in insulin-treated patients in our study. Still more extensive and comprehensive research with a parallel assessment of glycemia, inflammation, oxidative stress, and other clinical parameters in insulin-treated and untreated patients is necessary to understand this effect.

Overall, the frequency of DNA damage was higher in DM patients than controls in our bivariate comparisons. Still there was no significant difference in the frequency of DNA damage between the DM types. In the multivariate analyses, the influence of DM on DNA damage was not evident, and age emerged as the factor contributing most to DNA damage. Disease duration and patient BMI are factors associated with an increase in the frequency of chromosomal aberrations that reflect cumulative damage. In contrast PAH and CKD are associated with the risk of an increase in 8-OHdG. The strongest association with DNA damage was observed with distal symmetric polyneuropathy, which is the most clinically studied complication of diabetes in our study. Treatment with metformin, statins, and insulin reduced the prevalence of DNA damage.

We performed a logistic regression analysis to assess the impact of clinical and demographic characteristics on the development of diabetic microvascular complications and the associations with cytogenetic markers. Well-known clinical risk factors for microvascular complications, such as DM duration, elevated HbA1c, and poor disease control, influenced at least one of the three complications, i.e., DSPN, CAN, or retinopathy. The association between CAN and PAH, dyslipidemia and DSPN, nephropathy, and CKD was also clinically significant and has been described by other authors [12,14,19–21,135,136,363]. Our study's novel associations between DSPN and MN-IND, CAN and SCE-IND, and retinopathy and MN-IND suggest that patients with diabetic microvascular complications may be more susceptible to mutagenic exposure. Further research is needed to assess the association of increased susceptibility of patients' lymphocyte DNA to mutagens with the risk of diabetic complications and its potential application in clinical practice.

Although our calculations found only weak and unreliable correlations and associations of miRNAs with DM and other clinical indicators, possibly due to too small study sample, data from other authors support our preliminary results. We found decreased expression of mir-16 in T1DM patients and a negative correlation of miR-16 with duration of poor glycemic control in T1DM group. MiR-16 is one of the most important molecules regulating the insulin signaling pathway [364]. MiR-16 target genes that encode proteins such as insulin receptor substrate (IRS), protein 1 and 2, and the insulin receptor, which are essential for the insulin signaling pathway, and decreased expression of mir-16 results in impaired insulin secretion, insulin resistance, and hyperglycemia [365,366]. Furthermore, mir-16 target genes that are responsible for pancreatic β -cell proliferation and apoptosis. Other authors also describe a decrease in mir-16 expression in T1DM [367] and T2DM [368] patients compared to controls. The toxic effect of hyperglycemia on pancreatic beta cells could explain the negative correlation of mir-16 with the duration of poor glycemic control, which is supported by other studies of DM patients with long-term, poorly controlled DM [367,368], however studies with a larger sample size are needed to confirm this association.

In T1DM group we also found a negative correlation of mir-17 with waist and hip circumference. Other authors describe a decrease in mir-17 expression in adipose tissue of T2DM patients [369] and in blood and adipose tissue of obese patients [370]. While obesity is more common in T2DM patients, the rising obesity rates are also leading to a larger obese population of T1DM patients [371]. This can lead to the development of a condition termed 'double' or 'type 3' diabetes, which in addition to absolute insulin deficiency is also

characterized by insulin resistance [372]. This type of diabetes presents with both T1DM and T2DM symptoms, greater management difficulty, and higher risk [373]. The care of such patients poses a serious challenge to the healthcare system. A detailed understanding of the pathophysiology and further analysis of epigenetic factors could, support the diagnosis and care. In our study comparing miRNA expression in the blood leukocytes of T1DM, T2DM patients, and controls, the expression of miR-106 was not significantly different between the T1DM and T2DM groups. Still, it was considerably lower in the T2DM group compared to the control group. Zapała et al. also reported lower expression of miR-106a in urinary extracellular vesicles of T2DM patients compared to controls [374]. In T1DM patients, higher waist circumference and older age were negatively correlated with mir-106a expression. T2DM, visceral obesity and older age are associated with an increase in oxidative stress, which leads to a decrease in mir-106a expression in *in vitro* studies by other authors [379,380]. In *in vitro* studies, mir-106a also promotes adipose tissue differentiation and proliferation [379,382].

We found a negative correlation between mir-223 and waist circumference in the T1DM group. According to literature data, mir-223 is related to obesity, regulation of glucose homeostasis, inflammatory and autoimmune process [382,383]. In adipose tissue, miR-223 inhibits insulin-dependent glucose uptake by adipose cells and increases macrophage infiltration and inflammation [378]. Increased expression of miR-223 in adipose tissue of obese or insulin-resistant subjects has been reported by Chuang et al. who found increased miR-223 expression in subcutaneous adipose tissue of insulin-resistant female subjects [379], and by Deiliulis et al. who observed an increase in miR-223 expression in visceral adipose tissue of morbidly obese patients [380]. In contrast, Macartney-Coxson et al. found a significant decrease in miR-223 expression in the subcutaneous and visceral tissue of obese patients following gastric bypass surgery and weight loss [381]. Data on miR-223 expression in the blood plasma of obese patients are mixed: studies with obese children have shown an increase in miR-223 expression in the blood [389, 390], while studies with adults have shown the opposite – a decrease in miR-223 expression [384].

Logistic regression analysis revealed that mir-22 could be a marker for T1DM. Although the p value in our calculations did not reach a statistically significant difference ($p = 0.079$), data from other authors support this association. Januszewski et al. found a negative plasma mir-223 correlation with C-peptide concentration in T1DM [385]. Swolin-Eide et al. in a review of 400 publications confirmed increased expression of mir-223 in T1DM

patients [386]. Some authors summarize that mir-223 could be used as a biomarker for T1DM diagnosis and monitoring [387].

In conclusion, our study identified miRNA associations with clinical indicators in T1DM group: mir-16 was significantly negatively correlated with the duration of poor glycemic control; mir-17 was negatively correlated with waist and hip circumference, and mir-106a and mir-223 with waist circumference; mir-106 was also negatively correlated with patient age. Lower expression of mir-106a was found in T2DM patients compared to controls, but mir-106 did not reach statistical significance as a T2DM prognostic indicator in the logistic regression model ($p = 0.319$). MiR-16 and mir-223 were included in the logistic regression model as prognostic indicators for T1DM, but both have borderline p value, $p = 0.043$ and $p = 0.079$, respectively.

One of the significant pathogenetic mechanisms underlying the development and progression of distal symmetric polyneuropathy (DSPN) is oxidative stress [388]. Increased levels of free radicals in the body cause damage to various neural structures, such as lipids, proteins, and DNA, thereby impairing neural function.

DNA damage can be identified by testing for DNA oxidation markers in blood and urine or by cytogenetic testing. It has been shown that DM patients have higher levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a marker of DNA oxidative damage, compared to healthy controls [389], and that higher levels of this marker are associated with an increased risk of microvascular complications and higher mortality rates in patients [261,390].

Several studies comparing patients with and without diabetes have also shown a higher incidence of cytogenetically detectable DNA damage in those with diabetes, i.e. higher rates of chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, and micronuclei [32,42,391,392]. More marked changes in DNA damage levels have also been associated with a higher risk of diabetes complications [44,45,329].

The contribution of oxidative stress to the development of diabetes and diabetic complications has generated interest in antioxidants as a therapeutic intervention for these conditions. Unfortunately, the promising results of experimental studies with antioxidants have not been replicated in clinical trials. The only antioxidant with proven clinical efficacy and indicated for the treatment of DSPN in clinical practice is α -lipoic acid (ALA) [56]. By reducing oxidative stress, ALA not only reduces the symptoms and signs of DSPN but also improves insulin sensitivity and has a positively affects comorbidities such as obesity, hypertension, and dyslipidemia [212,218,393].

ALA exhibits a two-fold antioxidant effect: it acts directly by binding to and removing oxygen and nitrogen radicals, and indirectly by regenerating other antioxidants [394]. ALA also reduces the frequency of SCE and MN in human lymphocytes *in vitro* [395] and rat bone marrow cells *in vivo* [396].

The effectiveness of ALA in treating all types of pain has been demonstrated in numerous animal studies [397], but clinical trial results still need to be revised. For example, one recent meta-analysis found that ALA therapy did not reduce diabetic neuropathic pain [398]. Still another meta-analysis reached the opposite conclusion, finding that ALA therapy may reduce neuropathic pain in DM patients [223].

These differences may result from differences in the route of administration of ALA, with intravenous ALA appearing to be more effective than the tablet form [399]. The beneficial effects of ALA are further supported by clinical trials for other (non-diabetic) pain, in which ALA was found to be effective in reducing nerve root pain [400], migraines, carpal tunnel pain [223] and pain of unknown origin [401].

Most clinical and observational studies have shown that ALA therapy reduces the symptoms and signs of neuropathy by 40-60% and offers an improved quality of life for DM patients [207,220,222].

As noted above, the short half-life of the medication makes its oral route less effective than intravenous therapy [402]. The best treatment outcome has been achieved with intravenous ALA for as least 3 weeks or longer [207]. Such treatment requires extended hospitalization or daily outpatient appointments, which are inconvenient for the patient and the attending physician. Therefore, in clinical practice, intravenous ALA is generally administered for a shorter period of time, one to two weeks, and then continued in tablet form [403]. Our study aimed to evaluate the effects of short-term ALA IV therapy (4-9 days) on neuropathic symptoms and objectively quantifiable parameters related to oxidative stress and DNA damage.

The Universal Pain Assessment Tool (UPAT) was used to evaluate neuropathy symptoms [292]. Oxidative stress and DNA damage were assessed before and after ALA therapy by analyzing the blood levels of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, as well as cytogenetic markers of DNA damage, and the MN and SCE frequencies.

Our study showed decreased blood plasma 8-OHdG levels in DM patients following ALA therapy. As a well-known marker of oxidative stress, 8-OHdG is often measured at elevated levels in the blood plasma [261,390] and urine [404] of DM patients, but the results on the effect of ALA on 8-

OHdG levels vary between authors. For example, some studies have shown a decrease in serum [227] and urine [405] 8-OHdG levels after ALA therapy, but others have not found a positive effect of ALA on 8-OHdG [226] or other oxidative stress markers [225]. Animal studies have verified the beneficial effects of ALA and demonstrated decreased levels of 8-OHdG in various tissues [406,407].

8-OHdG levels in blood plasma are also known to depend on renal function and therefore might not always accurately reflect the level of oxidative stress in the body [351]. However, all patients in our study presented with normal pre-treatment renal function, the duration of the ALA treatment was 4-9 days, and it is unlikely that renal function would change in such a short time. Therefore, the reduced levels of 8-OHdG in our patients likely reflect the reduction in oxidative stress.

ALA IV therapy did not reduce the frequency of SCE and MN in our study's lymphocytes in DM patients. The frequency of SCE and MN represents DNA damage accumulated over an extended period, so the short therapy may not have been adequate to produce changes in DNA damage. The small study sample size may also limit detecting of statistically significant changes in MN and SCE frequency.

In conclusion, our study found that even short-term ALA IV therapy reduces in the severity of neuropathic pain and in levels of the oxidative stress marker, 8-OHdG. Still, no significant changes in the frequencies of the cytogenetic markers, SCE and MN, could be observed.

In summary, our study aimed to assess and compare DNA damage and miRNA expression biomarkers in DM patients and controls and to correlate genetic and epigenetic data with clinical data. We found that diabetic patients had a higher frequency of DNA damage than controls, but the frequency did not differ between the types of DM. The frequency of DNA damage was associated with clinical parameters of diabetes, and patients with diabetic microvascular complications were more susceptible to the effect of mutagen. MiRNA expression in diabetic patients was associated with clinical parameters. Short-term ALA therapy showed clinical effects in reducing oxidative blood markers but did not influence the frequency of DNA damage.

CONCLUSIONS

1. When comparing the incidence of diabetic neuropathy between T1DM and T2DM patients, no difference was found in the incidence of distal symmetrical polyneuropathy (DSPN). Still it varied significantly depending on the diagnostic method used. Painful DSPN and cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) were more common in T2DM patients.
2. Compared with controls, T1DM and T2DM patients had higher levels of sister chromatid exchange (SCE), high SCE frequency cells (HFCs), micronuclei (MN), mutagen-induced sister chromatid exchange (SCE-IND), chromosome aberrations (CA), chromosome-type aberrations (CSA) and chromatid-type aberrations (CTA). In contrast, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels and the frequency of mutagen-induced micronuclei (MN-IND) were not significantly different between the groups. Chromosome-type aberrations (CSA) were significantly more frequent in T2DM patients compared to T1DM patients; no significant differences between diabetes types were found when comparing other types of DNA damage.
3. Age and DSPN emerged as the main contributors to DNA damage. Disease duration and patients' body mass index (BMI) increased the frequency of chromosomal aberrations (CA). Primary arterial hypertension (PAH) and chronic kidney disease (CKD) were associated with a risk of higher 8-OHdG levels. Treatment with metformin, statins and insulin reduced the frequency of DNA damage.
4. In addition to the well-established classical clinical risk factors for developing diabetic complications, further associations were identified between DSPN and MN-IND, CAN and SCE-IND, retinopathy and MN-IND. These associations suggest that patients with diabetic microvascular complications may be more susceptible to mutagenic effects.
5. Changes in the expression of miRNA-16, miR-17, miR-106a and miR223 are associated with some clinical indicators in the T1DM patient group: mir-16 expression was negatively correlated with the duration of poor glycemic control; mir-17 expression was negatively correlated with waist and hip circumference, while mir-106a and mir-223 expression was negatively correlated with waist circumference. In a logistic regression model, the expression of miR-16 and mir-223

can be used as a prognostic indicator of T1DM. Lower expression of mir-106a was found in T2DM patients compared to controls, but mir-106a did not reach statistical significance as a T2DM prognostic indicator in the logistic regression model.

6. Short-term alpha-lipoic acid (ALA) intravenous therapy reduced the severity of neuropathic pain and the levels of the oxidative stress marker, 8-OHdG.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.