

MikroRNA - novi biomarker za ranu detekciju i praćenje pacijenata sa tipom 2 šećerne bolesti

Barać, Dominik Veselko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:801347>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Dominik Veselko Barać

**MikroRNA - novi biomarker za ranu detekciju i
praćenje pacijenata sa
šećernom bolesti tipa 2**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća klinička biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom red. prof. dr. sc. Roberte Petlevski.

Zahvala

Želim se zahvaliti svojim roditeljima, braći, djevojci i prijateljima na podršci tijekom cijelog studija. Također se želim zahvaliti i svojoj mentorici na kvalitetnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Šećerna bolest

1.1.1. Opći pregled bolesti

1.1.2. Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2.....1

1.2. MikroRNA

1.2.1. Opći pregled miRNA

1.2.2. Biogeneza miRNA.....3

1.2.3. Diceri.....5

2. OBRAZLOŽENJE TEME.....7

3. MATERIJALI I METODE.....8

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Epidemiologija šećerne bolesti.....9

4.2. Simptomi i dugotrajne komplikacije.....10

4.3. Dijagnostika.....11

4.4. Klasični biomarkeri

4.4.1. Biomarkeri kod šećerne bolesti tipa 114

4.4.2. Biomarkeri kod šećerne bolesti tipa 2.....15

4.5. Uloga miRNA u šećernoj bolesti

4.5.1. Funkcionalna uloga miRNA.....17

4.5.2. Uloga miRNA u patogenezi šećerne bolesti.....18

4.5.3. Uloga miRNA u stanicama koje luče inzulin.....20

4.5.4. Uloga miRNA u ciljnim tkivima inzulina.....23

4.5.4.1. Uloga miRNA u jetri.....24

4.5.4.2. Uloga miRNA u adipoznom tkivu

4.6. miRNA kao biomarker

4.6.1. miRNA kao potencijalni marker za šećernu bolest.....25

4.6.2. Profili miRNA ekspresije kod šećerne bolesti.....26

4.6.3. Prediktivna moć miRNA kod komplikacija šećerne bolesti.....27

4.6.4. miRNA kao biomarker za šećernu bolest tipa 2.....28

4.6.5. Izazovi miRNA kao biomarkera.....33

4.6.6. Budućnost miRNA kao biomarkera šećerne bolesti.....34

| | |
|--|-----------|
| 5. ZAKLJUČCI..... | 36 |
| 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA..... | 37 |
| 7. LITERATURA..... | 39 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY..... | 46 |
| 9. PRILOZI..... | 48 |
| 10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA..... | 49 |

1. UVOD

1.1. Šećerna bolest

1.1.1. Opći pregled bolesti

Šećerna bolest (lat. diabetes mellitus) je naziv za skupinu metaboličkih bolesti koje se ispoljavaju hiperglikemijom koja može biti rezultat poremećaja lučenja ili djelovanja inzulina ili oboje. Kod dugotrajne kronične hiperglikemije javljaju se disfunkcija i oštećenje organa kao što su retinopatija, nefropatija, periferna neuropatija, aterosklerotična kardiovaskularna, periferna arterijska i cerebrovaskularna bolest (Thomas,2020.). Najčešća i najjednostavnija podjela šećerne bolesti je na tip 1 (T1DM) i tip 2 (T2DM) te gestacijska šećerna bolest (GDM). Tip 1 (T1DM) je karakteriziran autoimunim uništavanjem β stanica Langerhansovih otočića u pankreasu što obično vodi do apsolutnog nedostatka inzulina te se najčešće nasljeđuje genetskim putem. Tip 2 (T2DM), kojim se ovaj rad bavi, uzrokovan je progresivnim gubitkom lučenja inzulina β -stanica najčešće kao posljedica inzulinske rezistencije. Gestacijska šećerna bolest (GDM) dijagnosticira se u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće ako nije jasno izražena šećerna bolest prije trudnoće. Ovaj tip karakteriziran je s komplikacijama za majku, fetus i novorođenče (Thomas, 2020.).

1.1.2. Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2

Glavne karakteristike T2DM su nesposobnost tkiva osjetljivih na inzulin da na odgovarajući način reagiraju na inzulín (inzulinska rezistencija), smanjena funkcija β stanica Langerhansovih otočića te smanjena sekrecija inzulina (Thomas,2020.). Oslobođanje i aktivnost inzulina su bitni procesi za homeostazu glukoze, stoga su molekularni mehanizmi koji sudjeluju u sintezi i oslobađanju inzulina, te njegovom određivanju , strogo regulirani. Defekti u bilo kojem od mehanizama uključenih u te procese mogu dovesti do metaboličke neravnoteže odgovorne za razvoj bolesti. Organi koji sudjeluju u razvoju T2DM su gušterača (β -stanice i α -stanice), jetra, skeletni mišići, bubrezi, mozak, tanko crijevo i masno tkivo (DeFronzo R.A., 2009.). Poremećaj lučenja inzulina, kao jedna od glavnih karakteristika T2DM, je općenito progresivan, a njegovo napredovanje uključuje i lipotoksičnost. Ako se na vrijeme ne liječi, uviđa se da uzrokuje smanjenje stanične mase gušterače u pokusima na životinjama (Kohei, 2010.) . Napredovanje poremećaja funkcije stanica gušterače bitno utječe na dugotrajnu kontrolu glukoze u krvi. Definitivan i konačan uzrok smanjene funkcije β -stanica u T2DM je zasad nepoznat, ali jedan značajan čimbenik je sigurno samo smanjenje broja β -stanica. U pretilih osoba s povišenom razinom glukoze natašte, broj β -stanica je smanjen za 50% u usporedbi sa zdravim osobama, a

studija Prospective Diabetes u Ujedinjenom Kraljevstvu pokazala je da se lučenje inzulina kod osoba sa šećernom bolesti tipa 2 također smanjuje na 50% pri postavljanju dijagnoze (Thomas, 2020.). Smanjena funkcija β stanica uzrokuje slijedeće poremećaje:

- U ranim fazama T2DM, periodično i brzo (pulsativno) lučenje inzulina je poremećeno
- Bazalna sekrecija inzulina je preniska u odnosu na stupanj prekomjerne tjelesne težine i hiperglikemije dok su razine inzulina natašte normalne, niske ili povišene
- Lučenje inzulina stimulirano prisutnošću glukoze je smanjeno. Osobe sa šećernom bolesti tipa 2 s hiperglikemijom natašte stoga nemaju prvu fazu inzulinskog odgovora na opterećenje glukozom koja je normalan odgovor nakon obroka. Čak i u slučaju usporedbe odnosa doze i odgovora između koncentracije glukoze i lučenja inzulina nakon stimulacije ne-glukoznim nutrijentima i tvarima u zdravih osoba u usporedbi s osobama sa šećernom bolesti tipa 2, očito je da je sposobnost glukoze da poveća inzulinski odgovor znatno smanjena. Maksimalno lučenje inzulina smanjeno je u usporedbi sa zdravim osobama, a studije pokazuju da je defekt β -stanica obrnuto povezan s glukozom natašte: što je viša koncentracija glukoze natašte, to je niže lučenje inzulina (Thomas, 2020.).

U šećernoj bolesti glavni simptom je hiperglikemija, koja se u početku poremećaja javlja samo nakon uzimanja hrane bogate ugljikohidratima, a kasnije i natašte. U hiperglikemiji pacijent može razviti komu zbog poremećaja metabolizma mozga jer je glukoza jedini izvor energije koji mozak može iskoristiti. Kad koncentracija glukoze u krvi prijeđe granicu koju bubrežni kanalici mogu reapsorbirati, glukozu možemo naći i u mokraći što dovodi do glukozurije. Samim prisustvom povećane količine glukoze u mokraći, dolazi do navlačenja vode u bubrežne kanaliće i nastaje osmotska diureza. Metabolizam pokušava stanje smanjene iskoristivosti glukoze kompenzirati preko metabolizma aminokiselina i lipida, pa se pojačano troše lipidi i aminokiseline te metabolizmom tih nutrijenata dolazi do ketoacidoze. Acidoza podražava respiracijski centar pa pacijent duboko diše (Kussmaulovo disanje). Stanice izmjenjuju kalijeve ione za ione vodika (kompenzacija acidoze) i nastaje hiperkalijemija. Zbog povećane diureze, pojačano se luči kalij i dolazi do smanjenog ukupnog kalija u organizmu. Stanice neovisne o inzulinu gomilaju glukozu i dolazi do njihovog oštećenja (eritrociti, očna leća, živčano tkivo) što dovodi do periferne neuropatije, katarakte itd. (Krmpotić, 2020)

1.2. MikroRNA

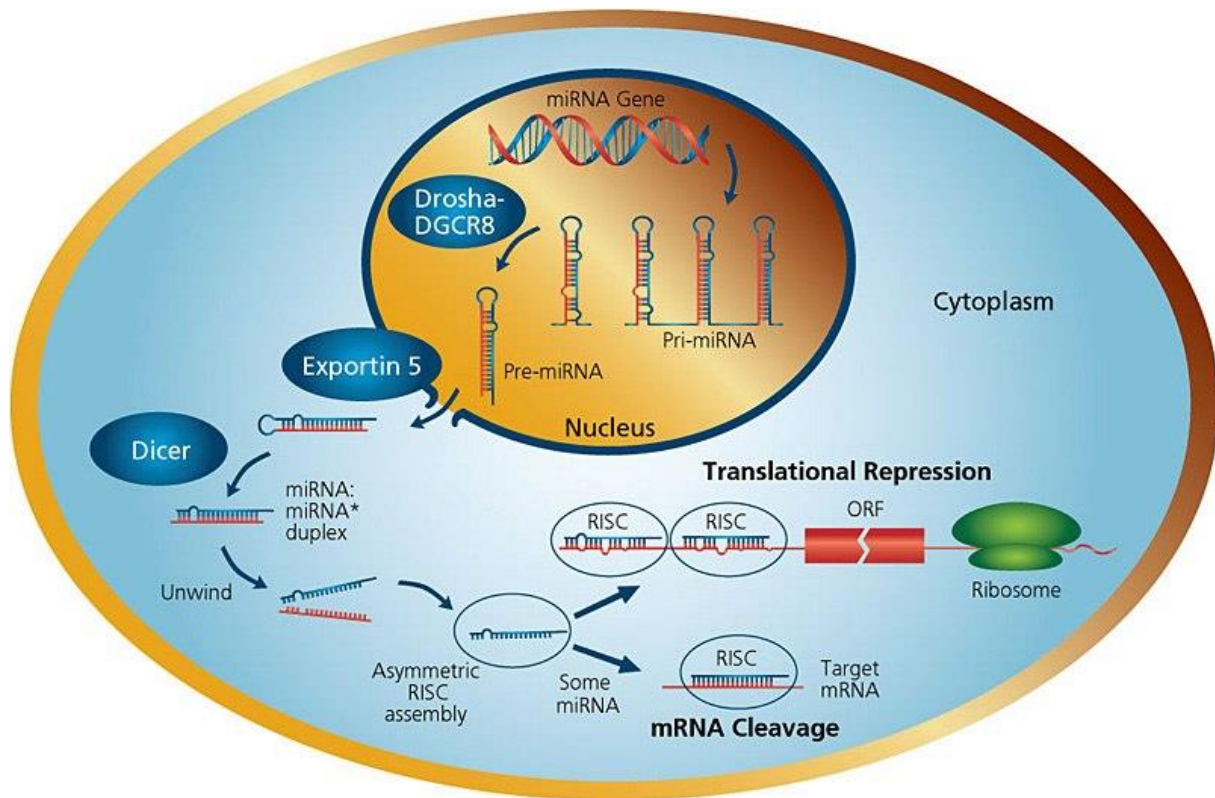
1.2.1. Opći pregled miRNA

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće RNA molekule koje su duge oko 21-25 nukleotida te funkcioniraju kao translacijski represori djelomičnim uparivanjem sa 3'netranslatiranom (UTR) regijom ciljnog glasnika RNA. MikroRNA su djelomično komplementarne jednoj ili više molekula glasničke RNA (mRNA), a njihova glavna funkcija je smanjiti ekspresiju gena na različite načine, uključujući translacijsku represiju, cijepanje mRNA i deadenilaciju. Ovi regulatori ekspresije gena prvi put su otkriveni u *Caenorhabditis elegans* i kasnije kod kralježnjaka i biljaka (Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, 1993). Prema posljednjim procjenama, ljudski genom kodira više od 1600 miRNA prekursora, generirajući do 2237 zrelih miRNA od kojih svaki ima potencijal kontroliranja stotina meta. MiRNA su danas univerzalno prepoznate kao glavni regulatori genske ekspresije i kao ključni kontrolori nekoliko bioloških i patoloških procesa (Flynt, A.S. & Lai, E.C. 2008.) Geni koji kodiraju miRNA su mnogo duži od obrađene zrele molekule miRNA. MiRNA nastaju od RNA prekursora matične petlje generirane iz neovisnih transkripcijskih jedinica ili iz introna gena koji kodiraju proteine. Ovi primarni transkripti se nazivaju pri-miRNA i u početku se obrađuju kako bi se proizvele kraće RNA molekule (pre-miRNA), a zatim odlaze u citosol gdje se dalje obrađuju kako bi stvorile zrele oblike miRNA. Poznato je da mnoge miRNA borave u intronima njihovih gena domaćina pre-mRNA i dijele svoje regulatorne elemente, primarni transkript i imaju sličan profil ekspresije. Za ostatak gena miRNA koji se transkribiraju iz vlastitih promotora, nekoliko primarnih transkripata je u potpunosti identificirano.

1.2.2. Biogeneza miRNA

MikroRNA se transkribiraju pomoću RNA polimeraze II kao veliki RNA prekursori nazvani pri-miRNA i sastoje se od 5' kape i poli-A repa. Pri-miRNA se obrađuju u jezgri pomoću kompleksa koji se sastoji od enzima RNase III Drosha i dvolančanog proteina koji veže RNA, Pasha/DGCR8. Pre-miRNA koje nastanu su duge otprilike 70 nukleotida. Također, presavijene su u nesavršene petlje. Pre-miRNA se zatim izvoze u citoplazmu pomoću proteina eksportina karioferina 5 (Exp5) i Ran-GTP kompleksa. Eksportin je receptorski protein koji prepoznaje signal za izlazak iz jezgre pa sudjeluje u prijenosu molekula iz jezgre u citoplazmu. Ran (nuklearni protein povezan s ras) je mali protein koji veže GTP. On pripada superobitelji RAS i bez njega se translokacija RNA i proteina kroz kompleks nuklearnih pora ne može odvijati. Ran GTPaza veže Exp5 i tvori nuklearni heterotrimer s pre-miRNA. Jednom kada se pre-

miRNA nađe u citoplazmi, prolazi dodatni korak obrade pomoću enzima RNAza III Dicer koji stvara konačnu molekulu miRNA, dvolančanu RNA duljine približno 22 nukleotida. Dicer također pokreće stvaranje RNA-induciranog kompleksa utišavanja (RISC). On služi za usmjeravanje translacijske represije ciljne mRNA ili oslobađanje od strane stanice. U tom slučaju, miRNA se povezuju s proteinima, lipoproteinima ili se ugrađuju unutar vezikule koje se oslobađaju u ekstracelularnom prostoru nakon odvajanja mjehurića plazma membrane ili nakon fuzije multivezikularnih tijela s plazma membranom. RISC je odgovoran za utišavanje gena uočeno zbog ekspresije miRNA i interferencije RNA. (MiRNA (microRNA) Introduction, https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/mirna-introduction?gclid=CjwKCAjwy_aUBhACEiwA2IHHQLVMBEmBB77VymWGzk2buF3v8pHOZPyKzykyUsnR1p43muTgSgAmVhoCcIwQAvD_BwE).



Slika 1. Biološki putevi prilikom biogeneze mi-RNA (preuzeto iz miRNA (microRNA) Introduction(https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/mirna-introduction?gclid=CjwKCAjwy_aUBhACEiwA2IHHQLVMBEmBB77VymWGzk2buF3v8pHOZPyKzykyUsnR1p43muTgSgAmVhoCcIwQAvD_BwE, pristupljeno 10.6.2022.))

1.3. Dicer

Dicer, također poznati kao endoribonukleaze Dicer ili helikaze s motivom RNAze, su veliki proteini od 200 kDa koji su kod ljudi kodiran genom DICER1. Sadrže ATPazu/RNA helikazu, domenu DUF283 (domena nepoznate funkcije), domenu PAZ (Piwi, Argonaut i Zwiller) koja može vezati karakteristične dvije baze 3' kraja mi i siRNA te se nalazi na čelu molekule. Dicer također sadrže dvije katalitičke RNAza III domene (RIIIa i RIIIb) koje čine katalitičku jezgru dicera te se nalaze na donjoj polovici molekule, i C-terminalnu dvolančanu RNA-vezujuću domenu (dsRBD)(Min-Sun Song and John J. Rossi, 2017). PAZ domena Dicera jedinstvena je po tome što ima dodatnu petlju obogaćenu bazičnim aminokiselinama. Ove razlike kod Dicera mogu utjecati na RNA vezanje i predaju supstrata drugim proteinskim kompleksima. Budući

da je dio obitelji RNase III, Dicer cijepa dvolančanu RNA (dsRNA) i pre-mikroRNA (pre-miRNA) u kratke dvolančane RNA fragmente koji su zapravo mikroRNA. Dicer je građen kao monomer i ima jedan centar za obradu s intramolekularnom dimerizacijom dviju domena RNaze III. Svaka domena RNaze neovisno reže jedan RNA lanac kako bi se generirali produkti s 2-nt 3' krajevima. Uz izdvajanje miRNA iz pre-miRNA, Dicer enzimi obrađuju dsRNA u siRNA. Za razliku od siRNA, mikroRNA mogu usmjeriti RISC na smanjenje ekspresije gena translacijskom represijom (na temelju niže komplementarnosti između miRNA i mRNA) ili funkcionirati kao siRNA i posredovati u cijepanju mRNA. Izbor post-transkripcijskih mehanizama nije određen porijeklom RNA za utišavanje (siRNA ili miRNA), već stupnjem komplementarnosti. Ako je miRNA savršeno ili gotovo komplementarna svojoj meti, može specifično cijepati ciljnu mRNA. Endogeno eksprimirane miRNA obično su nesavršeno komplementarne svojim ciljnim genima i moduliraju učinak na ekspresiju gena putem translacijske represije (Min-Sun Song and John J. Rossi, 2017).

Biogeneza većine malih vrsti RNA, kao miRNA i siRNA, odvija se postupno u citoplazmi. U ovom procesu događa se povezivanje s dicerom i specifičnim članovima velike obitelji Argonaut proteina (AGO) i sklapanje u različite efektorske komplekse, kao što je RNA-inducirani kompleks za utišavanje (RISC). Argonaut proteini imaju endonukleaznu aktivnost usmjerenu prema lancima mRNA koji su komplementarni njihovom vezanom miRNA fragmentu. Argonaut proteini su također djelomično odgovorni za odabir vodećeg lanca i uništavanje putničkog lanca. Prvo, RNA tvori pre-RISC kompleks s dicerom (Betancur J.G. and Tomari Y. 2012) uz pomoć Hsc70/Hsp90 šaperonskog sustava. Zatim se događa cijepanje RNA od strane dicera i dva proteina koja vežu dsRNA, TRBP (HIV trans-aktivirajući odgovor RNA-vezujući protein) i PACT (proteinski aktivator PKR). Nakon što se mala dvolančana RNA uhvati, jedan od dva lanca se postaje vodič ili aktivni lanac i ugrađuje se u AGO protein kako bi formirao RISC. Dvolančana RNA se odmotava i AGO2 ragrađi drugi lanac koji se još naziva i putnički lanac. Na odluku koji će lanac biti vodeći najviše utječe termodinamička asimetrija kraja male RNA dvolančane molekule. Obično je lanac manje stabilnim 5' krajem vodeći lanac (Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena S.D., 2003). Zadnji korak je prepoznavanje ciljnog mjesta komplementarnim intermolekularnim uparivanjem baza kroz jednolančanu vodeću RNA molekulu. Rezultirajuće RISC vezane miRNA ili siRNA ili usmjeravaju razgradnju komplementarnih RNA specifičnu za sekvencu ili inhibiraju translaciju djelomično komplementarnih ciljnih glasničkih RNA post-transkripcijskim utišavanjem gena u citoplazmi, dijelom ovisno o prirodi i stupnju vodiča/cilja komplementarnost.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Šećerna bolest je u današnjem modernom dobu sve češća i zastupljenija bolest. Iako ima genetičkih faktora koji utječu na prevalenciju bolesti, sve bitniji se čine okolišni čimbenici kao što su stil života, loša prehrana, stres itd., sve redom faktori koji su u današnjem dobu sve zastupljeniji. Šećerna bolest tipa 2, kojim se ovaj rad bavi, je bolest koja se sporo razvija te je stoga rana dijagnoza od ključne važnosti. Potrebni su što bolji, točniji i prediktivniji markeri za bolest uz koje se može napraviti rana dijagnostika. Ovaj rad će se baviti pitanjem je li miRNA upravo taj biomarker koji će nam olakšati ranu detekciju šećerne bolesti tipa 2 i kvalitetno praćenje terapije.

3. MATERIJALI I METODE

U pisanju ovog rada korišteni su relevantni udžbenici iz medicinske fiziologije, patofiziologije, patologije, biokemije, genetike i dijabetologije čiji su literaturni podaci vezani uz šećernu bolest, njenu dijagnozu te za miRNA. Dan je pregled osnovnih saznanja o šećernoj bolesti (patofiziologija, epidemiologija, simptomi i komplikacije, dijagnoza) i o miRNA kao alatu u dijagnozi šećerne bolesti. Osim navedene literature, koristio sam se i stručnim te znanstvenim radovima do kojih sam došao pretraživanjem bibliografskih baza podataka (prema ključnim riječima (diabetes mellitus type 2, diagnostics of diabetes mellitus type 2, miRNA, miRNA as a predictive marker for diabetes mellitus type 2 etc.) te rezultatima pretraživanja mrežnih stranica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Epidemiologija šećerne bolesti

Prema najnovijim procjenama, prevalencija šećerne bolesti u svijetu među odraslim osobama u dobi od 20-79 godina iznosi 6,4% te se razlikuje se između kontinenata: Sjeverna Amerika 10,2%, Bliski istok 9,3%, Jugoistočna Azija 7,6%, Europa 6,9%, Južna Amerika 6,6% i Afrika 3,8%, a više od 90% ima šećernu bolest tipa 2 (T2DM) (Shaw, Sicree, Zimmet, 2010.). Svjetska prevalencija šećerne bolesti među odraslim osobama 1980. iznosila je 108 milijuna te se u 2014. popela na 442 milijuna što je izrazito zabrinjavajuć porast. Novija istraživanja nam kažu da će se broj odraslih oboljelih od šećerne bolesti, u dobi od 20-79 godina, popeti na nevjerojatnih 439 milijuna do 2030. godine, te 592 milijuna u 2035. (WHO, Diabetes, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>). Između 2010. i 2030., povećanje broja odraslih osoba sa šećernom bolesti iznosit će 69% za zemlje u razvoju i 20% za razvijene zemlje (Shaw, Sicree, Zimmet, 2010.). Šećerna bolest je u 2019. bila deveti vodeći uzrok smrti na svijetu s više od 1,5 milijuna smrti direktno uzrokovanih šećernom bolesti.

Geografski, incidencija šećerne bolesti može varirati i do 400 puta. Općenito, zemlje u Europi i Sjevernoj Americi imaju ili visoku ili srednje učestalost. Učestalost u Africi je općenito srednja, a u Aziji niska, s izuzetkom Kuvajta (Forouhi, Wareham 2014.) Ovim uviđamo da je incidencija viša u razvijenijim dijelovima svijeta.

T1DM može se pojaviti u bilo kojoj dobi, ali u većini slučajeva, bolest se pojavljuje do 14. godine. Općenito, sve populacije pokazuju stalan porast stope incidencije s dobi do oko 10-15 godina. Statistički je incidencija veća među muškom djecom, dok je suprotno uočeno u zemljama s niskom sveukupnom incidencijom, ali su te razlike male. Kad pričamo o godišnjim stopama povećanja incidencije, one iznose 2,8-3,0% u svijetu te 3,8% u Europi.

Kod T2DM također postoje bitne geografske razlike u incidenciji. Incidencija je najniža u ruralnim područjima zemalja u razvoju, srednja u razvijenim zemljama, a najviša u određenim etničkim skupinama, najviše onima koje vode "zapadnjački stil života". Bitan faktor u incidenciji je pretilost te je uočeno i dokazano da populacije s najvećom prevalencijom imaju visoku prevalenciju pretilosti. Dijabetes je do četiri do šest puta češći u Južnoazijskoj i afričko-karipskoj populaciji u usporedbi s europskom bijelom populacijom (Forouhi N.G., Merrick D., Goyder E., 2006.). Razlika u incidenciji među spolovima je zanemariva s obzirom na ukupan broj oboljelih te iznosi oko 14 milijuna više oboljelih muškaraca nego žena.

Tablica 1. Prevalencija dijabetesa u svijetu (preuzeto i prilagođeno iz Forouhi i Wareham, (2014) uz dopuštenje izdavača)

| 2013. | | | 2035. | |
|-------|------------|--|------------|--|
| | Zemlja | Broj odraslih s dijabetesom (milijuni) | Zemlja | Broj odraslih s dijabetesom (milijuni) |
| 1 | Kina | 98,4 | Kina | 142,7 |
| 2 | Indija | 65,1 | Indija | 109,0 |
| 3 | Brazil | 11,9 | Brazil | 19,2 |
| 4 | Rusija | 10,9 | Meksiko | 15,7 |
| 5 | Meksiko | 8,7 | Indonezija | 14,1 |
| 6 | Indonezija | 8,5 | Egipat | 13,1 |
| 7 | Njemačka | 7,6 | Pakistan | 12,8 |
| 8 | Egipat | 7,5 | Turska | 11,8 |
| 9 | Japan | 7,2 | Rusija | 11,2 |

4.2. Simptomi i dugotrajne komplikacije

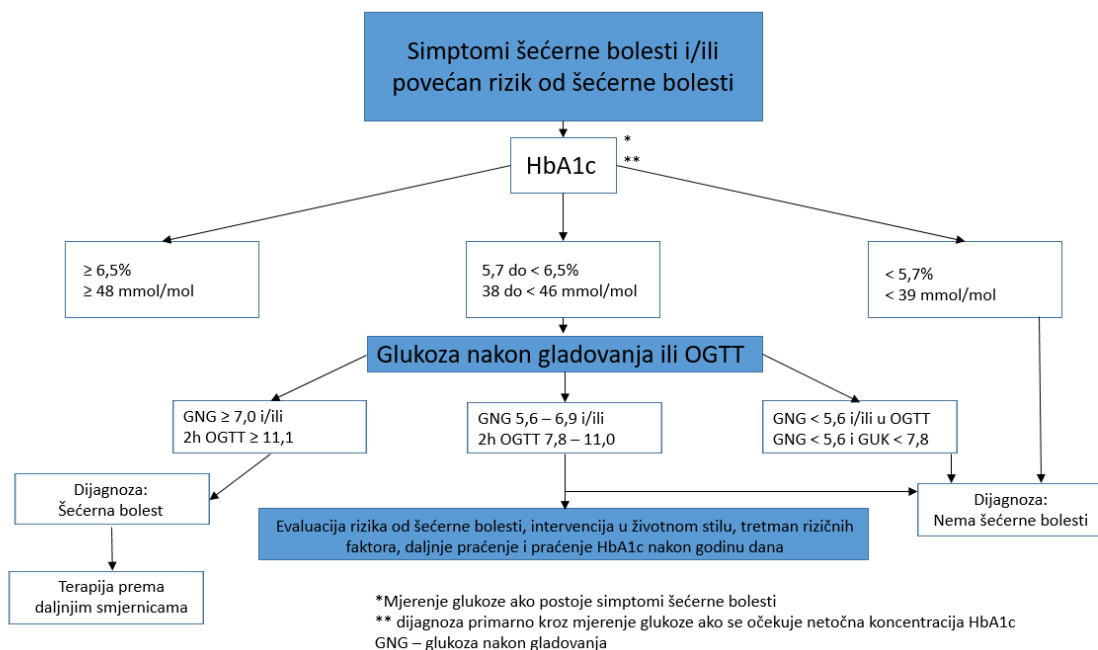
Iako zahvaća jako velik broj ljudi, T2DM je jako komplicirana bolest sa multiorganskim efektima te je potrebno još puno istraživanja do potpunog razumijevanja. Glavni simptomi koji se javljaju kod šećerne bolesti su povećani osjećaji gladi i žeđi, učestalo mokrenje, gubitak na tjelesnoj masi, pretjerani umor, zamućenje vida, učestale infekcije, umrtvljenost ili osjećaj bockanja u rukama i nogama itd. Glavni uzročnik ovih simptoma, direktno ili indirektno, je hiperglikemija. Pod utjecajem hiperglikemije na tijelo javljaju se poliurija, polidipsija, gubitak težine koji se zna javiti s polifagijom, te zamagljen vid. Akutne, po život opasne posljedice nekontroliranog dijabetesa su hiperglikemija s ketoacidozom i hiperosmolarni neketotički sindrom. Kronična hiperglikemija također može biti popraćena oštećenjem rasta u djece i povećanom osjetljivošću na infekcije. (Thomas, 2020.) Općenito komplikacije vezane za dijabetes možemo podijeliti na akutne i kronične. Kod akutnih komplikacija najvažnije su dijabetička ketoacidoza (DKA) te hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje (HHS).

DKA je uzrokovana smanjenom razinom inzulina, smanjenom upotrebom glukoze i povećanom glukoneogenezom zbog povišenih regulatornih hormona, uključujući katekolamine, glukagon i kortizol. Najčešće su zahvaćene osobe sa šećernom bolesti tipa 1, ali može se javiti i kod osoba

sa šećernom bolesti tipa 2, a najčešće je uzrokovana preskakanjem liječenja, infekcijom ili zlouporabom alkohola (Trachtenbarg DE., 2005). Aktivnost lipaze se povećava, uzrokujući razgradnju masnog tkiva koje daje slobodne masne kiseline jer tijelo nema mogućnost iskorištavanja glukoze pa treba alternativne izvore energije. Nastale komponente pretvaraju se u acetyl CoA, od kojih neke ulaze u Krebsov ciklus za proizvodnju energije, a ostatak se razgrađuje na ketonska tijela (aceton, acetoacetat i β hidroksibutirat). Iako se mogu iskoristiti za dobivanje energije, ketonska tijela se brzo nakupljaju. Ovi faktori zajedno potiču hiperglikemiju što dovodi do osmotske diureze, a ona rezultira dehidracijom, metaboličkom acidozom i hiperosmolarnim stanjem. Prezentacija DKA varira ovisno o težini stanja i komorbiditetima. Dehidracija uzrokuje tahikardiju, oslabljeni turgor kože, suhe sluznice i ortostatsku hipotenziju. Metabolička acidoza vodi do kompenzacijskog dubokog (Kussmaulovog) disanja, a povišena koncentracija acetona se može osjetiti kao karakteristični miris u dahu pacijenta (Krmpotić,2020). Stanje svijesti može varirati od somnolencije do letargije i kome. Parametri na kojima se temelji dijagnoza DKA su povišena razina glukoze ($>13,88$ mmol/L), pH manji od 7,3, koncentracija bikarbonata u serumu manja od 18 mmol/L i povišena razina ketona u serumu (Westerberg DP., 2013).

4.3. Dijagnostika

S obzirom na dugotrajan razvoj bolesti, bitno je dijagnozu postaviti rano da bi liječenje počelo što prije i kako bi se izbjegle sve moguće komplikacije koje su rezultat šećerne bolesti. Testiranje za šećernu bolest treba provesti u ljudi kod kojih postoji sumnja na šećernu bolest. Ako pacijent prepozna simptome koji upućuju na šećernu bolest, ako pri mjerenju glukoze u krvi rezultat koncentracije iznosi više od 4,4 mmol/L te ako su u fizikalnom nalazu pronađeni objektivni znakovi koji mogu biti posljedica komplikacije dijabetesa, tada se postavlja sumnja na šećernu bolest (Krmpotić,2020).



Slika 2. Algoritam za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti (preuzeto iz Kerner i Bruckel (2014.) uz dopuštenje izdavača)

Najčešći parametri koji se mjere kod dijagnostike šećerne bolesti su koncentracija glukoze i HbA1c. Zlatni standard za dijagnosticiranje šećerne bolesti je mjerenje koncentracije glukoze u venskoj plazmi. Ovo mjerenje može biti točno samo ako je glikoliza inhibirana u uzorku krvi čim se uzorkovanje obavi. To se može učiniti na dva načina. Ili se epruvetu za krv pohrani na led i krv se centrifugira unutar 30 minuta ili se glikoliza u epruveti učinkovito inhibira odgovarajućim tvarima (citrat plus fluor) (Mellitus, W. Kerner, J. Brückel, 2014.)

Tablica 2. Smjernice za dijagnozu šećerne bolesti (preuzeto i prilagođeno iz Kerner i Bruckel (2014.) uz dopuštenje izdavača)

| | | |
|--|---------|---------------|
| HbA1c | ≥ 6,5 % | ≥ 48 mmol/mol |
| Slučajna razina koncentracije glukoze u plazmi | | ≥ 11,1 mmol/l |
| Glukoza u plazmi natašte | | ≥ 7,0 mmol/l |
| OGTT | | ≥ 11,1 mmol/l |

Ove smjernice preporučuju korištenje HbA1c za dijagnosticiranje šećerne bolesti od 2010. Ovo je postalo moguće međunarodnom standardizacijom metoda za mjerenje. HbA1c se smatra prikladnim kao primarni dijagnostički alat za isključivanje šećerne bolesti s velikom sigurnošću te za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti u nekim slučajevima. Epidemiološka istraživanja pokazala su da je specifičnost HbA1c $\geq 6,5$ % dovoljno visoka da opravda dijagnozu šećerne bolesti, a osjetljivost HbA1c $< 5,7$ % dovoljno je visoka da opravda isključivanje šećerne bolesti iz dijagnostičke odluke. Stoga se iz ovih razloga preporuča ovim smjernicama da kada se razina HbA1c kreće između 5,7 i 6,4 %, šećerna bolest i predijabetes se dijagnosticiraju mjerenjem koncentracije glukoze u skladu s tradicionalnim kriterijima. (Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus, W. Kerner, J. Brückel, 2014.)

Tablica 3. Kriteriji za diferencijalnu dijagnostiku T1DM i T2DM (preuzeto i prilagođeno iz Kerner i Bruckel (2014.) uz dopuštenje izdavača)

| | Tip 1 | Tip 2 |
|--|--|------------------------------------|
| Dob manifestacije | Uglavnom djeca, adolescenti i mladi odrasli | Uglavnom srednja i starija dob |
| Početak | Akutni do subakutni | Obično postupan |
| Simptomi | Poliurija, polidipsija, gubitak težine, umor | Često nema pritužbi |
| Tjelesna težina | Najčešće normalna | Obično prekomjerna tjelesna težina |
| Predispozicija za ketozu | Izražena | Slaba ili nikakva |
| Lučenje inzulina | Smanjeno ili nikakvo | Ispod normalnog do visokog |
| Inzulinska rezistencija | Niska ili nepostojeća | Izražena |
| Učestalost u obiteljskoj anamnezi bolesnika | Obično negativna | Tipično pozitivna |
| Sukladnost s identičnim blizancima | 30 do 50 % | Preko 50 % |

| | | |
|--|--|--|
| Nasljednost | Multifaktorijalna (poligenetska) | Višefaktorska (najvjerojatnije poligenetska, ali genetska heterogenost je moguća) |
| Povezanost s HLA sustavom | Prisutna | Nije prisutna |
| Antitijela povezana s dijabetesom | Približno 90-95 % na početku (GAD, ICA, IA-2, IAA) | Nema |
| Metabolizam | Nestabilan | Stabilan |
| Odgovor na antidijetike koji stimuliraju lučenje inzulina | Obično nema | Često dobar na prvu |
| Terapija inzulinom | Potrebna | Obično nije potrebna dok ne dođe do smanjenja lučenja inzulina nakon godina bolesti |

4.4. Klasični biomarkeri

4.4.1. Biomarkeri kod šećerne bolesti tipa 1

T1DM se dijagnosticira obično kada je više od 90% β -stanica gušterače uništeno od strane imunološkog sustava (Type 1 diabetes islet autoantibody markers, Winter, Harris, Schatz, 2002). Napredovanje bolesti je može potrajati više mjeseci i godina te tako omogućava dugo razdoblje za dijagnozu i liječenje pacijenata. Zahvaljujući nedavnim istraživanjima je postignut značajan pomak u očuvanju funkcije preostalih β -stanica pri ranom razvoju T1DM korištenjem lijekova koji utišavaju imunosni sustav (Orban, 2011.). Ono što bi dodatno pridonijelo učinkovitosti ovakvog terapijskog pristupa je da se bolest otkrije u ranom stadiju. Prisutnost autoantitijela protiv antigena otočića u krvi je obilježje bolesti pa se oni obično koriste kao

biomarker za šećernu bolest tipa 1. Antitijela koja se najčešće spominju u tom kontekstu su protiv

- stanica otočića (ICA)
- inzulina (IAA)
- tirozin fosfataze IA-2 i IA-2 β
- glutamat dekarboksilaze (GADA)
- transporter cinka 8 (ZnT8)(Purohit, She, 2008.)

.Ovi biomarkeri, kombinirano sa razinom C-peptida mogu biti dobar pokazatelj autoimunosti i funkcije beta-stanica. Unatoč prednosti korištenja autoantitijela otočića kao biomarkera, nailazimo na ograničenja:

- pojava autoantitijela događa se relativno kasno u tijeku T1DM,
- sama prisutnost autoantitijela ne garantira razvitak bolesti, što znači da neće sve osobe koje su pozitivne na antitijela razviti šećernu bolest tipa 1
- za praćenje terapijskih ishoda antitijela nisu prigodna (Purohit, She, 2008.). Zato je važno da se pronađu dodatni biomarkeri za T1DM koji bi upotpunili informacije dobivene iz prisutnosti autoantitijela i drugih čimbenika rizika (dob, obiteljska povijest, geni osjetljivosti i okolišni faktori).

4.4.2. Biomarkeri kod šećerne bolesti tipa 2

Za dijagnozu šećerne bolesti tipa 2 kod ljudi kod kojih se sumnja na T2DM, koristi se kombinacija lako dostupnih serumskih parametara (uključujući glukozu, triacilglicerol, kolesterol, lipoproteine i HbA1c), fizikalne karakteristike (indeks tjelesne mase, omjer struka i bokova, krvni tlak i spol) i životne navike (konzumacija hrane, tjelesna neaktivnost i pušenje). Kombinacijom svih ovih tradicionalnih/klasičnih biomarkera i čimbenika rizika, vjerojatnost predviđanja razvoja bolesti kreće se od 0,85 do 0,90 u razdoblju od 5 do 10 godina prije pojave T2DM (Schulze, M.B., 2009.). I druge molekule možemo iskoristiti kao biomarkere kao što su hormoni, citokini, adipokini, feritin i C-reaktivni protein ali su korisni samo u kombinaciji sa drugim markerima (Muller, 2012.). Ovi serumski pokazatelji učinkoviti su u predviđanju napredovanja T2DM kod osoba koje već pokazuju metaboličke promjene, ali ne mogu procijeniti osjetljivost na bolest u općoj populaciji i nisu specifični za šećernu bolest. Genotipska analiza ima mogućnost identifikacije pojedinaca podložnih razvoju T2DM kasnije u životu ali samo u kombinaciji sa klasičnim biomarkerima. Međutim, do sada prediktivne

vrijednosti genotipskih svojstava nisu prelazile 0,60 (Muller, 2012.). Sve ovo nas upućuje na potrebu za pronalaskom biomarkera koji omogućavaju rano predviđanje razvoja bolesti.

Tablica 4. Krvni parametri i biomarkeri koji se trenutno koriste za predviđanje i dijagnozu T1DM i T2DM (preuzeto i prilagođeno iz Guay i Regazzi, (2013.) uz dopuštenje izdavača)

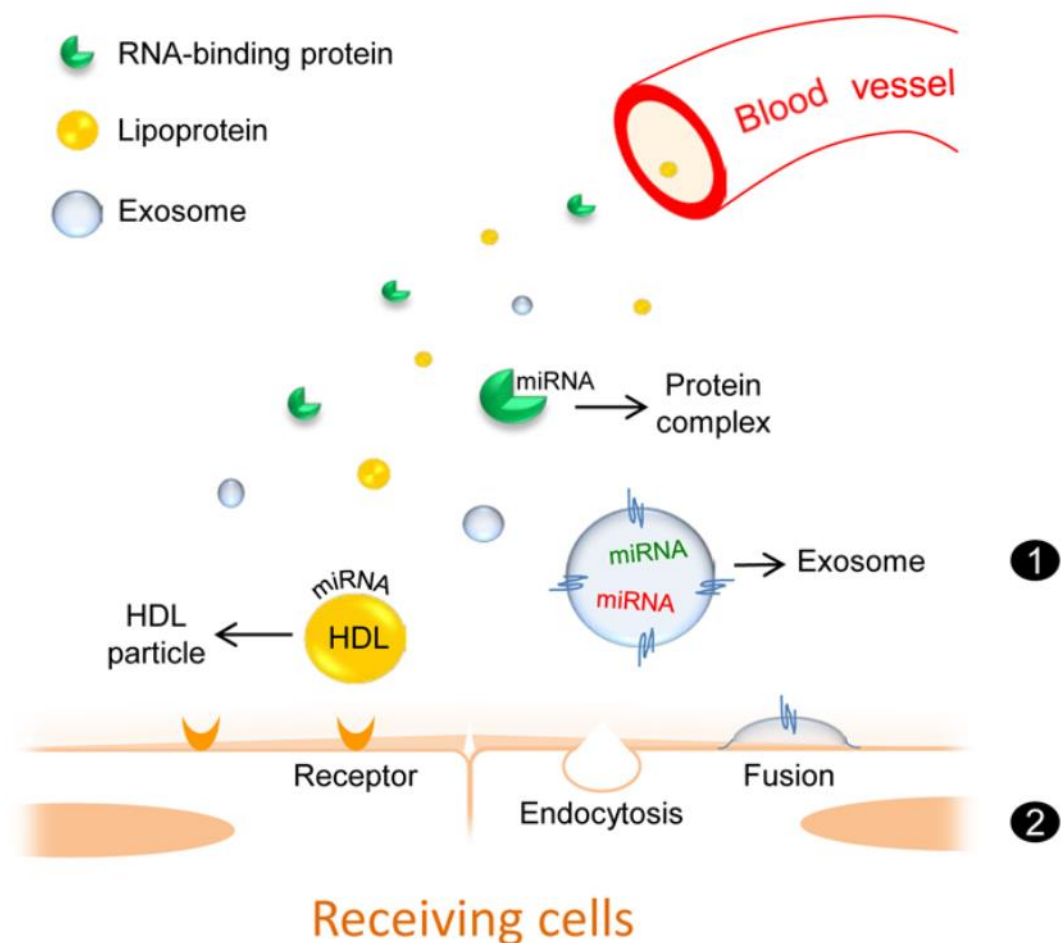
| Tip dijabetesa | Biomarker | | |
|----------------|------------------|---|---|
| | Tip | Ime | Simbol |
| T1DM i T2DM | Parametri u krvi | Glikemija Hemoglobin A1c | HbA1c |
| T1DM | Autoantigeni | Glutamat dekarboksilaza Inzulin Stanice otočića Tirozin fosfataze Cink transporter 8 | GADA IAA ICA IA-2,IA-2 β ZnT8 |
| T2DM | | | |

4.5. Uloga miRNA u šećernoj bolesti

4.5.1 Funkcionalna uloga miRNA

MiRNA nemaju samo funkciju regulacije gena unutar stanica u kojoj nastaju, već se mogu naći i u tjelesnim tekućinama poput krvi, zajedno sa proteinima, mikrovezikulama ili lipoproteinskim kompleksima (Gibbings, Ciaudo, Erhardt, Voinnet, 2009.). Njihova funkcija još nije točno utvrđena, ali in vitro studije nam ukazuju da miRNA koje se prenose egzosomima (vidi okvir 2) ili lipoproteinima visoke gustoće (HDL) se mogu prenijeti u aktivnom obliku do stanica primatelja (Vickers, Palmisano, Shoucri, Shamburek, Remaley, 2011.). Ova nova otkrića nam ukazuju na mogućnost još neistražene komunikacije među stanicama. Istraživanja nam također pokazuju da su ovakve miRNA ,koje se transportiraju kroz tijelo, jako otporne na cikluse smrzavanja/odmrzavanja i druge drastične eksperimentalne uvjete (Kroh, Parkin, Mitchell, Tewari, 2010.). Iz tog razloga se uzorci plazme ili seruma mogu pohranjivati na -20 °C ili -80 °C a da se zafrži stabilnost uzorka, To nam govori da su miRNA dovoljno stabilne da nam služe kao biomarkeri. Osim toga, cirkulirajuće miRNA imaju još značajki koje ih čine dobrim potencijalnim biomarkerima:

- osim u krvi, nalaze se i u drugim tjelesnim tekućinama koje možemo analizirati kao što su slina, urin, majčino mlijeko i amnionska tekućina (Weber, 2010.)
- mogu se određivati visokoosjetljivim i specifičnim kvantitativnim PCR metodama
- zdravi donori nemaju značajnije varijacije miRNA profila tijekom dana
- miRNA se mogu mjeriti i u serumu i u plazmi (Weber, 2010.)



Slika 3. Transport miRNA u ljudskom organizmu (preuzeto iz Guay i Regazzi, (2013.) uz dopuštenje izdavača)

4.5.2 Uloga miRNA u patogenezi šećerne bolesti

Iako većina njih nije specifična za tip stanice, β -stanice gušterače i ciljna tkiva i stanice inzulina izlučuju definirani profil miRNA, te su ti profili široko rašireni u svim tkivima ljudskog tijela. Iznimka koja je najznačajnija je miR-375, miRNA koja se nalazi u velikim količinama u pankreasnim otočićima te ima ulogu u regulaciji ekspresije gena koji su uključeni u lučenje hormona (Poy, 2004.). Također ima važnu ulogu i u β -stanicama Langerhansovih otočića koje povećavaju masu kao odgovor na inzulinsku rezistenciju (Poy, 2009.). Ono što je jako važno je da se profil ekspresije miRNA u β -stanicama i ciljanim tkivima inzulina mijenjaju i u T1DM i T2DM što najvjerojatnije pridonosi oštećenju funkcija ovih tkiva (Kumar, Nath, Prasad, Sharma, Li, 2012.). Istraživanja s NOD miševima, modela T1DM, pokazuju da njihovi otočići imaju povećane razine nekoliko miRNA uključujući miR-21, -29 i -146a, te navedene miRNA imaju štetan učinak na funkcije β -stanica (Roggli, 2012.). U otočićima ob/ob i db/db miševa, dva modela pretilosti i T2DM, većina tih miRNA je izmjenjena u (Zhao, 2009.). MiRNA koje

također imaju poremećeno izlučivanje u ciljnim tkivima inzulina ob/ob miševa, GK štakora s šećernom bolesti i dijetalnih mišjih modela pretilosti uključuju miR-802, miR-143 i dvije blisko povezane miRNA, miR-103 i -107. Istraživanja na miševima pomogla su da se i kod ljudi primijete promjene miRNA povezane sa šećernom bolesti. U biopsijama ljudskog skeletnog mišića kod T2DM pacijenata otkriveno je više od šezdeset različito izraženih miRNA. Te disregulirane miRNA uključuju pojačanu regulaciju miR-143 i nižu regulaciju dvaju miRNA specifičnih za skeletne mišiće, miR-206 i miR-133a (Gallagher, 2010.). Ono što nam je bitno je da se uvidjelo da je oko 15% tih miRNA u osoba s poremećenom tolerancijom glukoze već imalo promijenjen profil ekspresije što ukazuje na uključenost tih miRNA u ranim fazama razvoja bolesti. Inzulin bi trebao imati regulatornu ulogu kod ekspresije tih miRNA, ali izgleda da je kod osoba sa šećernom bolesti taj regulatorni proces poremećen. Opisane promjene u ciljnim tkivima inzulina nisu jedini rezultat šećerne bolesti, već su zabilježene promjene u ekspresiji miRNA u krvnim žilama, srcu, mrežnici i bubrezima što znači da su miRNA uključene i u druge, dugotrajnije komplikacije šećerne bolesti (Kantharidis, Wang, Carew, Lan, 2011.).

U svrhu identificiranja signala jedinstvenih za stres otočića, tkivo porijekla cirkulirajućih miRNA je ključno. Međutim, budući da miRNA imaju različite uloge u različitim tkivima i ekspimiraju se u brojnim tkivima s različitim obrascima ekspresije, takva je određivanja izazovno provesti u praksi. Primjera radi, ranije spomenuta miR-375 je izražena u otočićima, ali uglavnom se ekspimirira u stanicama hipofize. Iako su otočići ključni za održavanje homeostaze glukoze i energije, u tom procesu održavanja ravnoteže sudjeluju i drugi organi poput mozga, jetre, masnog tkiva i mišića. Istraživanja su pokazala da je od miRNA koje su dosljedno regulirane u tijelu, jedino miR-150-5p, koja je nađena u krvi zdravih osoba bez dijagnosticirane šećerne bolesti koji su imali autoantitijela, pretilih osoba ili osoba sa T2DM, ima najveću ekspresiju u gušterači (Ludwig, Leidinger, Becker, Backes, Fehlmann, Pallasch, Rheinheimer, Meder, Stähler, Meese, 2016.). Ipak, bez obzira iz kojeg tkiva dolaze, profili ekspresije miRNA u ranom stadiju razvoja bolesti ključni su za odvajanje onih koji su u riziku od šećerne bolesti od opće populacije. Iako cirkulirajuće miRNA mogu imati ulogu u komunikaciji kroz mnoga tkiva, te je njihova funkcionalna važnost nepoznata, one potencijalno mogu biti rezultat određenog patološkog procesa tijekom razvoja bolesti. Na primjer, sniženi miR-126 u krvi kod osoba sa pre-DM ili T2DM ukazuje na endotelnu disfunkciju izazvanu izloženošću hiperglikemiji i korelira sa subklinikom i manifestnom perifernom arterijskom

bolešću u pre-DM i T2DM (Zampetaki, Kiechl, Drozdov, Willeit, Mayr, Prokopi, Mayr, Weger, Oberhollenzer, Bonora, 2010.).

4.5.3. Uloga miRNA u stanicama koje luče inzulin

Koristeći mišji model kojem selektivno nedostaje miRNA procesirajući enzim Dicer u gušterači, istraživači su uspjeli dokazati da su miRNA bitne za formiranje zdravih otočića gušterače (Lynn, Skewes-Cox, Kosaka, McManus, Harfe BD, 2007.). Sve endokrine stanice gušterače kod Dicer defektnih miševa specifičnih za gušteraču pokazuju ozbiljne abnormalnosti, pri čemu su beta stanice koje proizvode inzulin najugroženije. Osim za miR-375, za vrlo malo miRNA je pronađeno da se preferirano eksprimiraju u mišjim i ljudskim otočićima, a njihove funkcije u razvoju otočića su nepoznate.

Otpuštanje inzulina uzrokovano glukozom negativno je regulirano miR-375 u zrelim beta-stanicama. Prekomjerna ekspresija miR-375 utječe na završni stadij u sekretornom putu inzulina, ali nema utjecaja na sintezu ATP-a ili povećanje intracelularnog Ca²⁺ izazvanog glukozom., te je također dokazano da miR-375 također sudjeluje i u regulaciji ekspresije inzulinskog gena (Guay, Roggli, Nesca, Jacovetti, Regazzi, 2011.). U miR-375 knockout miševa, potvrđena je uloga ove miRNA u održavanju homeostaze glukoze u krvi. Iako imaju normalno lučenje i klirensu inzulina, ovi miševi imaju hiperglikemiju i intoleranciju na glukozu. Takav fenotip miševa je uzrokovan povećanjem broja α -stanica, a naknadna povećana glukoneogeneza i proizvodnja glukoze u jetri uzrokovani su povećanjem razine glukagona u plazmi. S druge strane, miševi u ovoj skupini imali su manju staničnu masu β -stanica zbog smanjene proliferacije. Zanimljivo je primijetiti da je genetska delecija miR-375 u ob/ob miševa značajno smanjila sposobnost da se endokrinim djelovanjem suprotstavi inzulinskoj rezistenciji i dovela do ozbiljnog dijabetičkog stanja (Gallagher, 2010.). Kao rezultat toga, miR-375 je ključna za brojne karakteristike beta stanica, uključujući ekspresiju i izlučivanje inzulina, proliferaciju beta stanica i prilagodbu beta stanica na inzulinsku rezistenciju. Uz miR-375, druge miRNA također pridonose finom podešavanju proizvodnje inzulina mijenjanjem koncentracije vitalnih komponenti egzocitoznog mehanizma.

Istraživanja su pokazala da povećanje miR-9 oslobađa ograničenje ekspresije granofilina negativnog regulatora inzulinske egzocitoze koji cilja transkripcijski faktor Onecut 2, što rezultira neispravnim oslobađanjem inzulina kao odgovor na podražaje (Guay, Roggli, Nesca,

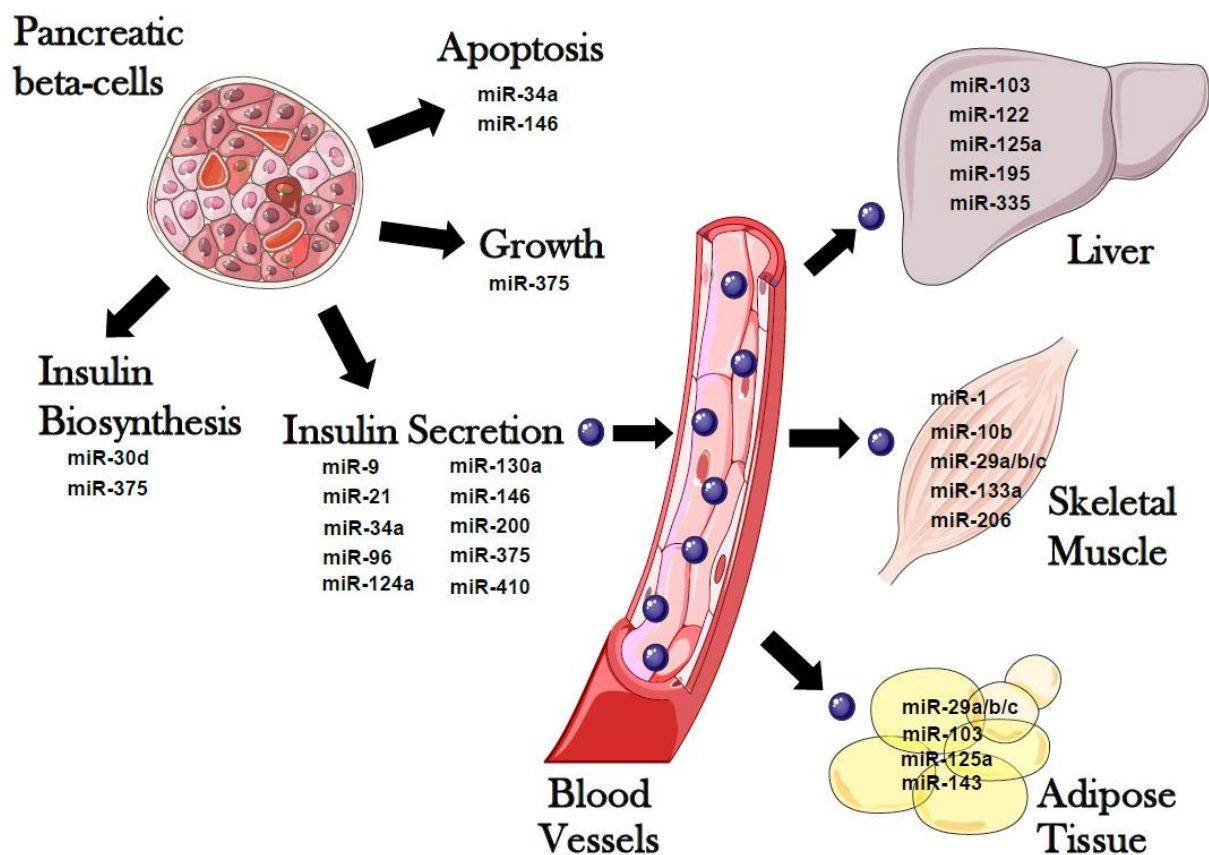
Jacovetti, Regazzi, 2011.). Međutim, prekomjerna ekspresija miR-96 utječe na sličan način na ekspresiju granofilina i lučenje inzulina.

Ekspresija granofilina i lučenje inzulina podjednako su pod utjecajem prekomjerne ekspresije miR-96, ali u ovom slučaju učinak nije povezan s *Onecut2* (Lovis, Gattesco, Regazzi, 2008.). Također, miR-96 smanjuje ekspresiju *Noc2*, efektora Rab GTPaze potrebnog za inzulinsku egzocitozu, a u istom istraživanju otkriveno je da prekomjerna ekspresija miR-124a izravno ili neizravno mijenja ekspresiju raznih dijelova sustava egzocitoze. To je povezano s povećanjem bazalnog otpuštanja inzulina i smanjenjem egzocitoze inzulina kod spoja koji urokuje sekreciju (Lovis, Gattesco, Regazzi, 2008). U skladu s ovim nalazima, otkriveno je da miR-124a uzrokuje nastanak početnih okolnosti koje rezultiraju povećanjem intracelularnog Ca^{2+} i smanjenjem uvjeta u kojima se stimulacija odvija (Guay, Roggli, Nesca, Jacovetti, Regazzi, 2011.). U kasnijim istraživanjima otkriveno je da je *Foxa2* specifična meta miR-124a te su podjedinice K^+ kanala osjetljive na ATP kodirane *Foxa2* ciljnim genima. MiR-124a inhibira ekspresiju transkripcijskih faktora *Kir6.2*, *Sur-1* i *Pdx-1*, a kroz israživanja je otkriveno da miR-130a, miR-200 i miR-410 također imaju ulogu u kontroliranju lučenja inzulina (Hennessy E, Clynes M, Jeppesen PB, O'Driscoll L., 2010.). Ranije spomenute studije promijenile su ili povećale ekspresiju pomoću molekularnih metoda određenih miRNA u nastojanju da se identificira potencijalna uloga u regulaciji funkcije stanica gušterače. S razvojem metoda za globalnu analizu miRNA i koristeći profiliranje, bilo je moguće sustavno tražiti miRNA koje bi mogle pridonijeti abnormalnoj funkciji stanica u fiziopatološkim okolnostima. U ranim fazama razvoja T1DM, u otočiće gušterače dolaze imunološke i T stanice, te otočići postaju izloženi djelovanju proupalnih medijatori kao što je IL-1, IFN i TNF. Kronična izloženost ovim citokinima ima štetan učinak na funkcije β -stanica gušterače što dovodi do smanjenja sadržaja inzulina, poremećaja u sekreciji inzulina i osjetljivosti na apoptozu. Globalno miRNA profiliranje stanične linije koja izlučuje inzulinske stanice tretirane proupalnim citokinima pokazala je značajno povećanje miR-21, miR-146 i miR-34a (Guay, Roggli, Nesca, Jacovetti, Regazzi, 2011). Isti su rezultati primijećeni kod tek izoliranih ljudskih otočića gušterače. Osim toga, pokazalo se da su ove miRNA povećane u otočićima gušterače NOD miševa koji razvijaju predijabetički inzulinitis. Blokada tih istih miRNA pomoću antisense nukleotidnih lanaca spriječila je smanjenje izlučivanje inzulina izazvano glukozom što je inducirano produljenom izloženošću IL-1 β i zaštitila β -stanica od stanične smrti izazvane citokinima. Molekularni procesi na kojima se temelji zaštitna funkcija anti-miRNA samo je djelomično shvaćena. Djelovanje anti-miR34 spriječilo je smanjenje ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl2 što se

obično primjećuje kod kronične izloženosti citokinima. Suprotno tome, blokada aktivnosti miR-146a omogućila je djelomično smanjenje indukcije c-Jun uzrokovana citokinima objašnjavajući zašto je prethodna obrada stanica s anti-miR146 poboljšala njihovo preživljavanje. Štetni učinci dugotrajne izloženosti slobodnoj masnoj kiselini palmitatu oponašaju okolišne čimbenike koji pogoduju degeneraciji beta stanica. Kao rezultat pojavljuju se defekti izlučivanja inzulina uzrokovani glukozom i senzibilizacija na apoptozu. Kroz istraživanja je otkriveno da kada su otočići gušterače ili stanične linije koje izlučuju inzulin izložene palmitatu, dolazi do povećanja miR-34a i miR-146 (Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, 2008). Koncentracije ove dvije miRNA su abnormalno visoke u otočićima uklonjenim iz miševa s dijabetesom tipa db/db. Povećana miR-34a ekspresija je uzrokovana aktivacijom p53 puta i uzrokuje smanjenje izlučivanja inzulina izazvanog hranjivim tvarima i osjetljivost stanica na apoptozu (Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, 2008). Ti učinci su bili povezani sa smanjenjem ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl2 i VAMP-2, proteina koji ima jednu od glavnih uloga u inzulinskoj egzocitozi. Blokada miR-a 34a ili aktivnost miR-146 djelomično je uzrokovala spriječavanje apoptoze β -stanica izazvano palmitatom, ali je neadekvatna za uspostavljanje normalne sekretorne aktivnosti (Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, 2008). Kada je stanična linija gušterače MIN6 bila izložena visokim koncentracijama glukoze kroz duže vrijeme, primjećene su promjene u ekspresiji nekoliko različitih miRNA (Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S., 2009.). Konkretno, miR-124a, miR-107 i miR-30d bili su povećani u hiperglikemijskim okolnostima, dok su miR-296, miR-484 i miR-690 bile snižene. Prekomjerna ekspresija MiR-30d smanjila je ekspresiju inzulinskog gena, što ukazuje na potencijalnu ulogu ove miRNA u defektnoj biosintezi inzulina kod osoba sa šećernom bolesti. Izloženost staničnih linija koje proizvode inzulin i izlaganje primarnih štakorskih otočića visokim koncentracijama glukoze dovelo je do smanjenja ekspresija miR-375 i odgovarajuće povećanje o fosfoinozolidu ovisne protein kinaze-1 (PDK1), koja izravni cilj miRNA i neophodna je za regulacija sinteze DNA i ekspresije gena inzulina (El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E, 2008). Začudo, stupanj u otočićima sitih dijabetičkih GK štakora, miR-375 je smanjen, te se pretpostavlja da je ovaj proces ,posredovan glukozom, također može dogoditi in vivo (El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E, 2008.)

4.5.4 Uloga miRNA u ciljnim tkivima inzulina

Pravilna ravnoteža između količine inzulina koju stvaraju beta stanice i osjetljivosti ciljnih tkiva na djelovanje hormona neophodna je za održavanje homeostaze glukoze u krvi. Inzulinska rezistencija je stanje izazvano nizom fizioloških i patoloških pojava, kao što su pretilost, trudnoća i stres, koji smanjuju inzulinsku osjetljivost perifernih tkiva kao što su jetra, masno tkivo i skeletni mišići. Normalna proizvodnja inzulina se povećava kako bi se nadoknadila smanjena osjetljivost tkiva na djelovanje inzulina. Kronična hiperglikemija i razvoj T2DM rezultat su neuspjeha u rješavanju inzulinske rezistencije. Iako određeni biološki putevi koji pokreću inzulinsku rezistenciju još uvijek nisu u potpunosti poznati, nagađa se da miRNA imaju ulogu u tim procesima.



Slika 4. Uloga raznih miRNA u regulaciji održavanja homeostaze glukoze u tijelu (preuzeto iz Guay i sur. (2011.) uz dopuštenje izdavača)

4.5.4.1 Uloga miRNA u jetri

Disregulacija ekspresije miRNA u jetri može utjecati na homeostazu glukoze i ubrzati pojavu šećerne bolesti. Rano nakon rođenja, selektivno brisanje Dicera, enzima za obradu miRNA, u jetri je dovelo do blage hiperglikemije u stanju sitosti i teške hipoglikemije u stanju gladovanja jer su zalihe glikogena bile iscrpljene (Sekine S, Ogawa R, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M., 2009.). Hepatociti iz životinja bez Dicera pokazali su povećanu apoptozu, kompenzacijsku proliferaciju i povećanu akumulaciju lipida što je rezultiralo steatozom. U Dicer-nultim hepatocitima, razine četiriju miRNA kojih ima u izobilju u jetri - miR-122, miR-148a, miR-192 i miR-194, bile su smanjene, što ukazuje na potencijalnu ulogu ovih molekula u kontroli lipida i glukoze metabolizam. Najzastupljenija miRNA u jetri je miR-122, na kojoj su provedena mnoga istraživanja zbog njene potencijalne uloge u regulaciji bioloških procesa u jetri (Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, 2006.).

Antagomir-122, antisense oligonukleotid konjugiran s kolesterolom, primijenjen je intravenski miševima i izazvao je gotovo potpuno smanjenje miR-122 u hepatocitima. To je smanjilo brzinu jetrene sinteze masnih kiselina i kolesterola te razinu kolesterola u plazmi, a afrički zeleni majmuni dali su slične rezultate (Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, 2008.). Zajedno, ovi rezultati istraživanja pokazuju koliko ključnu funkciju miR-122 ima u kontroli razine kolesterola u krvi. Nadalje, inhibicija miR-122 u jetri smanjila je kolesterol u plazmi i značajno poboljšala steatozu jetre u mišjem modelu pretilosti izazvane obilnom prehranom, što sugerira da se inhibicija miR-122 može koristiti kao terapijska strategija za snižavanje razine kolesterola. U usporedbi s normoglikemičnim sojevima Brown-Norway (BN), hiperglikemični GK štakori pokazali su znatno povišenje miR-125a, prema globalnom profiliranju miRNA pronađenih u jetri i masnom tkivu (Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Wills QF, Kaisaki PJ, Barrett A, 2009.). Prema računalnim projekcijama, miR-125a bi mogla ciljati gene uključene u metabolizam lipida i glukoze. Stoga, pojačana regulacija miR-125a može pridonijeti disregulaciji ekspresije gena koja rezultira inzulinskom rezistencijom u životinjskim modelima, međutim njihova točna funkcija u kontroli funkcije jetre još nije poznata (Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, 2009.). Ekspresija miR-335, koja je u korelaciji s većom jetrenom i tjelesnom težinom, kao i razinama jetrenih triglicerida i kolesterola, povećana je u različitim modelima pretilih miševa, uključujući ob/ob i db/db životinje (Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, 2009.). Bit će potrebno više istraživanja da se shvati kako se miRNA reguliraju u jetri na početku dijabetesa i da se točno odredi kako jetra kontrolira homeostazu glukoze.

4.5.4.2 Uloga miRNA u adipoznom tkivu

Inzulin povećava lipogenezu u masnom tkivu, što pretvara glukozu u krvi u masne kiseline za učinkovito poticanje skladištenja energije. U istraživanjima je utvrđeno da nekoliko miRNA koje su povećane tijekom diferencijacije ljudskih pre-adipocita uključuju miR-143. U sljedećem izvješću potvrđena je funkcija miR-143 u diferencijaciji adipocita (Xie H, Lim B, 2009.). Ekspresija miR-103 i miR-143 povećala se i in vitro i in vivo tijekom adipogeneze. Ove dvije miRNA bile su prekomjerno eksprimirane u pre-adipocitima, što je rezultiralo porastom markera adipogeneze i nakupljanjem lipida. Ono što je zanimljivo je da adipociti iz ob/ob miševa, modela inzulinske rezistencije i pretilosti, imaju smanjene razine miR-103 i miR-143. Inkubacijom 3T3-L1 adipocita u prisutnosti visoke koncentracije glukoze i inzulina, bilo je moguće replicirati povišenje miR-29a i miR-29b u epruveti. Poznato je da ove okolnosti uzrokuju inzulinsku rezistenciju, što sugerira da miR-29 može igrati ulogu u ovom procesu u adipocitima. Zapravo, prekomjerna ekspresija miR-29 u 3T3-L1 adipocitima smanjila je apsorpciju glukoze induciranu inzulinom, vjerojatno opstrukcijom inzulinskog signaliziranja kroz AKT fosforilaciju. Ovi rezultati zajedno impliciraju da miR-29 može posredovati u nekim od puteva koji uzrokuju inzulinsku rezistenciju kod T2DM.

4.6 miRNA kao biomarker

4.6.1 miRNA kao potencijalni marker za šećernu bolest

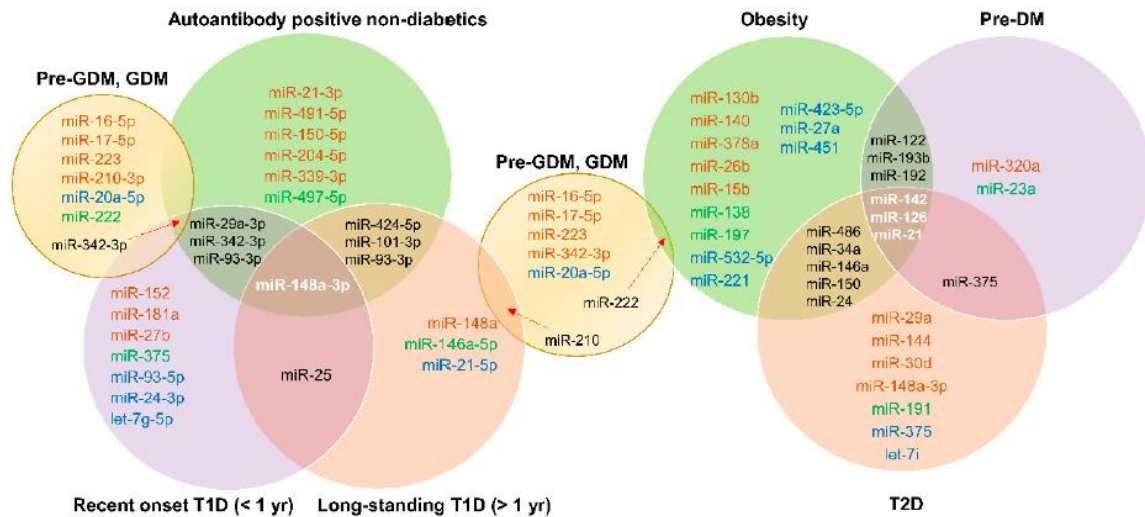
U potrazi za novim biomarkerima za šećernu bolest, otkriveno je da su razine miRNA u serumu ljudi i drugih životinja stabilne, ponovljive i dosljedne među pojedincima. MiRNA u plazmi uspoređene su s miRNA krvnih stanica kako bi se vidjelo jesu li miRNA plazme samo rezultat razgradnje krvnih stanica. Otkriveno je da je većina miRNA široko rasprostranjena, iako su druge otkrivene samo u serumu (Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, 2008.). Ova otkrića upućuju na to da su stanice izvan krvnih žila izvor barem nekih cirkulirajućih miRNA. S obzirom da serum sadrži ribonukleaze, postojanje miRNA u krvi može se na prvi pogled činiti neočekivanim zbog prisutnosti RNAaza. Međutim, miRNA u plazmi otporne su na oštre laboratorijske uvjete i tretman RNazom (Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, 2008.). Brojne studije su pokazale da se miRNA u krvi ne nalaze u svom prirodnom stanju, već se otpuštaju u mikrovezikularne strukture poput egzosoma ili apoptotičkih tijela, gdje cirkuliraju

dok su zaštićene od oksidacije. Vjeruje se da cirkulirajuće mikrovezikule olakšavaju komunikaciju među stanicama kao i razmjenu genetskog materijala između zdravih i oštećenih stanica i tkiva. Kao rezultat toga, profiliranje miRNA iz mikrovezikula koje cirkuliraju u krvi može odražavati fiziopatološko stanje pojedinca. MiRNA profili krvi osoba sa šećernom bolesti i zdravih sudionika analizirana je i pronađeno je 65 miRNA koje su bile često ekspresirane i 42 koje su bile različito ekspresirane. Iz ovih se podataka ne mogu izvući zaključci jer nisu pružene informacije o identitetu miRNA ili kliničkim karakteristikama osoba s šećernom bolesti. Međutim, ova otkrića upućuju na to da se miRNA u plazmi mogu mijenjati ovisno o tome je li osoba zdrava ili bolesna, što ih čini obećavajućim novim biomarkerima. Budući da se osobama sa šećernom bolesti obično prekasno postavi dijagnoza, biomarkeri bi mogli biti od velike pomoći u kontekstu šećerne bolesti kako bi se spriječio razvoj bolesti. U istraživanju koje su proveli Zampetaki i sur. ispitivane su razine miRNA u uzorcima plazme iz velike prospektivne populacijske studije s više od 800 sudionika (Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, 2010.). Njih 80 imalo je T2DM, a tijekom 10-godišnjeg istraživanja T2DM razvio se kod 19 osoba koje su na početku studije imale normoglikemiju. Trinaest miRNA koje su bile različito izražene u pacijenata s T2DM otkrivene su usporedbom skupnih miRNA plazma osoba s T2DM s kontrolnim skupinama koje odgovaraju dobi i spolu. Pet od njih—miR-15a, miR-28-3p, miR-126, miR-223 i miR-320—imalo je promjenu ekspresije prije početka bolesti. Sedamdeset posto pacijenata s T2DM moglo se identificirati ispitivanjem ove skupine od pet miRNA. Osobe s T2DM kojima nije dijagnosticiran T2DM ili su imali dobro kontrolirani T2DM ili su imali niže razine glukoze natašte. Zanimljivo je primijetiti da je 52% normoglikemičnih osoba koji su razvili T2DM tijekom sljedećih 10 godina već pripadalo skupini sa šećernom bolesti. Zajedno, ovi nalazi upućuju na prve dokaze o posebnom miRNA krvnom profilu koji može pomoći u identificiranju ljudi s prevalentnim ili incidentnim dijabetesom od zdravih kontrolnih osoba u kombinaciji s drugim kriterijima.

4.6.2 Profili miRNA ekspresije kod šećerne bolesti

Na slici 5 možemo vidjeti tipične miRNA profile za pojedince s rizikom od T1DM, uključujući one s novodijagnosticiranim, dugotrajnim, pretilim, pre-DM, T2DM i GDM-om. MiR-148a-3p prevladava u svim stadijima T1DM, što ukazuje na mogućnost da služi kao rani biomarker specifičan za etiologiju T1DM. MiR-29a-3p, miR-342-3p i miR-93-3p prevladavali su kod ljudi s nedavnom pojavom T1DM, kao i kod onih s rizikom za to stanje. miR-25 bio je čest u bolesnika s nedavnom pojavom ili postojanim T1DM. MiR-142, miR-126 i miR-21 bile su prevladavajuće miRNA povezane s pretilošću, pre-DM i T2DM. miR-375 bio je zajednički i

pacijentima prije DM i T2DM, što ukazuje na ranu uključenost ove miRNA u patogenezu T2DM. Oni s GDM, oni s rizikom od razvoja T1DM i osobe s T1DM su dijelili povećanu ekspresiju miR-342-3p, ali oni s GDM-om i dugotrajnim T1DM-om dijelili su miR-210. Čini se da postoje neke zajedničke karakteristike, ali potrebno je više istraživanja kako bi se izvukli čvrsti zaključci o odnosima između različitih oblika šećerne bolesti.



Slika 5. Najčešći profili skpresije miRNA kod oba tipa šećerne bolesti (preuzeto iz Vasu i sur. (2019.) uz dopuštenje izdavača)

4.6.3 Prediktivna moć miRNA kod komplikacija šećerne bolesti

T1DM i T2DM povezani su s dugoročnim mikro- i makrovaskularnim problemima koji imaju loš učinak na životni vijek i kvalitetu života. Identifikacija biomarkera koji mogu predvidjeti tko će vjerojatno razviti ozbiljne simptome poput retinopatije, nefropatije ili kardiovaskularnih problema omogućila bi prilagođavanje strategija terapije i smanjenje predviđenih učinaka bolesti. Ipak, još uvijek nedostaju pouzdani biomarkeri za te kronične posljedice. Budući da kardiovaskularni problemi mogu uzrokovati do 80% rane smrtnosti kod osoba sa šećernom bolesti, oni su veliki problem(Winer, N., Sowers, 2004.). Značajno poboljšanje u liječenju šećerne bolesti bilo bi sprječavanje ili barem odgađanje ovih komplikacija. U bolesnika s T2DM, Zampetaki i kolege otkrili su jasan profil miRNA u plazmi. Razina miR-126 pokazala je najveću korelaciju s T2DM i povezivala se s prevalencijom očitih i subkliničkih vaskularnih poremećaja među miRNA koje pokazuju karakteristične promjene(Zampetaki, A. et al., 2010.). Druga studija je otkrila da uzorci krvi uzeti od ljudi s koronarnom arterijskom bolešću imaju

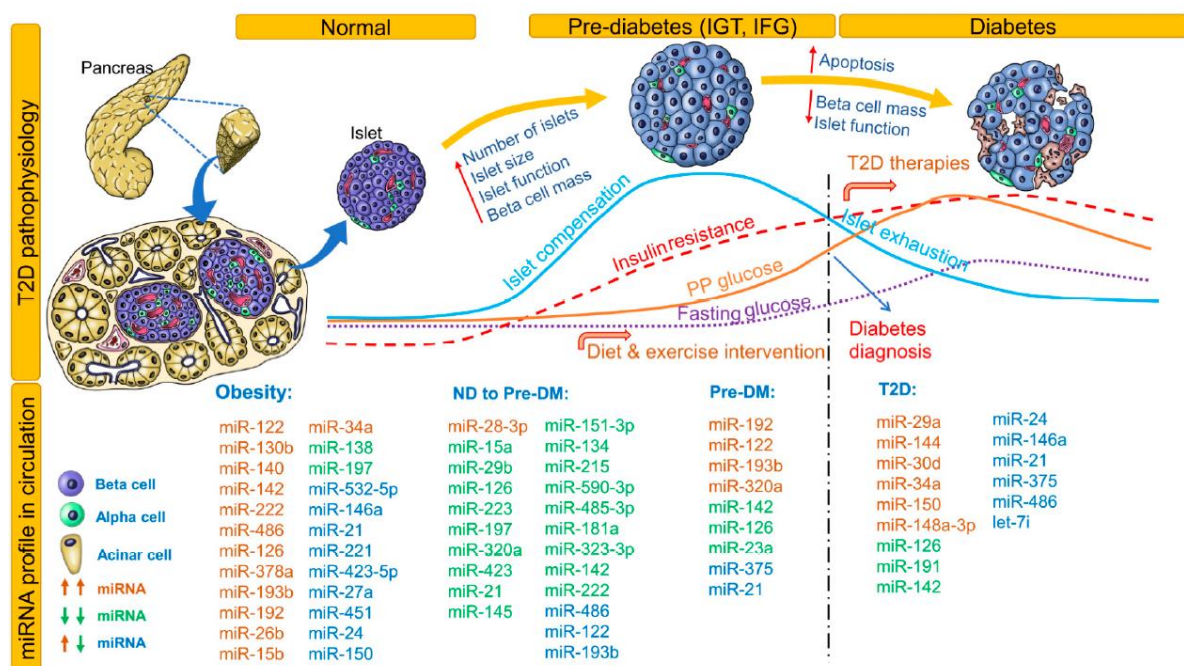
smanjenu regulaciju miR-126 (Fichtlscherer, S. et al., 2010.). Nadalje, trajna izloženost endotelnih stanica visokim razinama glukoze u krvi smanjuje količinu miR-126 otpuštenu u apoptotičnim tijelima, čineći ovu miRNA izvrstan prospektivni biomarker za praćenje vaskularnih problema osoba sa šećernom bolesti (Zampetaki, A. et al., 2010.). Još jedna miRNA endotelnih stanica koja zaslužuje dodatna istraživanja je miR-503. Ova kratka nekodirajuća RNA izražena je na višoj razini u mišićnim biopsijama i plazmi dobivenoj iz periferne krvi u osoba sa šećernom bolesti s ishemijom ekstremiteta (Caporali, A. et al., 2011.). Lokalna supresija miR-503 je poboljšala vaskularni popravak i oporavak krvotoka u mišjem modelu ishemije ekstremiteta. 20–30% bolesnika s T2DM ima disfunkciju bubrega. Prethodno istraživanje sugeriralo je da bi mikroalbuminurija mogla poslužiti kao biomarker za predviđanje razvoja ove ozbiljne komplikacije, ali novija istraživanja su pokazala da značajan dio osoba sa šećernom bolesti doživi zatajenje bubrega prije ili čak bez detektabilne mikroalbuminurije (Macisaac, R.J. & Jerums, G. 2011.). Praćenje zatajenja bubrega u bolesnika s dijabetesom omogućeno je cirkulirajućim miRNA. U stvari, pronađen je odnos između nekoliko određenih cirkulirajućih miRNA i brzine glomerularne filtracije, dobro poznatog pokazatelja progresije bubrežne bolesti (Neal, C.S. et al., 2011.). Važno je provesti opsežne prospektivne studije na osobama sa šećernom bolesti koji imaju zatajenje bubrega kako bi se odredio određeni profil miRNA u plazmi ili urinu koji predviđa razvoj ovog problema. Budući da je jednostavno prikupiti velike količine urina na neinvazivan način, urin služi kao dobar izvor miRNA. Dodatno, urinarni egzosomi dolaze iz različitih tipova stanica u cijelom mokraćnom traktu, što ih čini savršenim alatom za praćenje razvoja bubrežnih bolesti (Alvarez, M.L. & Distefano, J.K. 2013.). Trenutno nema podataka o korištenju cirkulirajućih miRNA za predviđanje dijabetičke retinopatije, ali buduća istraživanja usmjerena na procjenu potencijalne korisnosti miRNA kao prediktora šećerne bolesti bi se mogla pokazati kao jako vrijedno otkriće.

4.6.4 miRNA kao biomarker za šećernu bolest tipa 2

Profili cirkulirajuće miRNA prije očitih promjena u homeostazi glukoze i početka ireverzibilnog gubitka beta-stanične mase otkriveni su israživanjima slučaja kontrole provedenim na zdravim pojedincima uz praćenje budućeg razvoja pre-DM ili T2DM. Na primjer, razine miR-221, miR-28-3p, miR-142-3p, miR-486-3p i miR-486-5p mogu se koristiti za klasifikaciju pretilosti i procjenu rizika u zdrave 7-godišnje djece (Prats-Puig, Ortega, Mercader, Moreno-Navarrete, Moreno, Bonet, Ricart, López-Bermejo, Fernández-Real, 2013.). Nakon dvogodišnjeg praćenja, početne razine miR-122, miR-15a, miR-197, miR-320a, miR-423 i miR-486 bile su u obrnutoj korelaciji s razvojem glikemijskog oštećenja u zdravih

osoba bez šećerne bolesti (Flowers, Gadgil, Aouizerat, Kanaya, 2015.). U drugoj skupini zdravih odraslih osoba bez šećerne bolesti, miR-320a i miR-486-5p povećali su vjerojatnost inzulinske rezistencije, dok ju je miR-375 smanjio (Flowers, Gadgil, Aouizerat, Kanaya, 2015.). Na temelju početnih razina miR-15a, miR-126, miR-320, miR-223 i miR-28-3p, normoglikemični pacijenti koji su razvili T2DM tijekom desetogodišnjeg razdoblja ispravno su kategorizirani kao osobe sa šećernom bolesti u skupini studije Bruneck (Flowers, Aouizerat, Abbasi, Lamendola, Grove, Fukuoka, Reaven, 2015.). Stoga, procjena miRNA potpisa umjesto pojedinačnog miRNA profila može pomoći u točnom identificiranju T2DM i njegovom odvajanju od drugih poremećaja. U drugoj zdravoj skupini, miR-126, miR-148a i miR-375 imali su negativne korelacije s vrijednostima površine glukoze ispod krivulje koncentracije, dok su miR-29a i miR-21 imali pozitivne korelacije s vrijednostima homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR) i homeostazni model procjene funkcije stanica (HOMA-B) (Seyhan, Nunez Lopez, Xie, Yi, Mathews, Pasarica, Pratley, 2016.). U europskoj skupini studija odnosa između osjetljivosti na inzulin i rizika od kardiovaskularnih bolesti (RISC) osoba bez šećerne bolesti, normotenzivnih pojedinaca koji su razvili pre-DM nakon 3 godine praćenja, miR-181a, miR-323-3p, miR-342-3p, miR-222, miR-483-5p, miR-151-5p, miR-532-3p, miR-142-5p, miR-625, miR-27b i miR-590-3p bili su prognostički i dijagnostički biomarkeri disfunkcije beta stanica. U ovoj skupini, miRNA potpis smanjenih miR-21, miR-145, miR-151-3p, miR-134, miR-215, miR-590-3p, miR-485-3p, miR-181a i miR-323-3p bio je dijagnostika disfunkcije beta-stanica (Belongie, Ferrannini, Johnson, Andrade-Gordon, Hansen, Petrie, 2017.). Više razine miR-122 bile su povezane s povišenim jetrenim enzimima, pretilošću, upalom, inzulinskom rezistencijom i lošim profilom lipida u uzorku opće populacije od 1000 ljudi. Terapija atropastatinom značajno je smanjila razine miR-122 u serumu. Tijekom razdoblja od 15 godina, ljudi s višim razinama miR-122 na početku imali su veću vjerojatnost da će razviti T2DM ili metabolički sindrom (Willeit, Skroblin, Moschen, Yin, Kaudewitz, Zampetaki, Barwari, Whitehead, Ramírez, Goedeke, et al. 2017.). Čini se da su razine miR-28-3p, miR-142, miR-486, miR-122, miR-15a, miR-320a, miR-126 i miR-375 dosljedno promijenjene u cirkulaciji u različitim skupinama čak i prije razvoja bilo kakvih kliničkih simptoma, prema nalazima ovih istraživanja. Potrebna su dodatna istraživanja u zdravoj populaciji kako bi se potvrdili ovi rezultati i identificirali cirkulirajući miRNA potpisi koji su dosljedni i specifični za razvoj T2DM. Pretilost povećava rizik od razvoja T2DM i metaboličkog sindroma (šećerna bolest uzrokovana pretilošću). MiR-144-5p, let-7d, miR-34a i miR-532-5p značajno su predvidjeli inzulinsku rezistenciju kod pretilih Europljana (Jones, Danielson, Benton, Ziegler, Shah, Stubbs, Das, Macartney-Coxson, 2017.). Izgleda da je

gubitak tjelesne težine poboljšao profil cirkulirajuće miRNA kod osoba s metaboličkim sindromom uključenih u ispitivanje Practicing Restorative Yoga vs. Stretching for the Metabolic Syndrome (PRYSMS) (Flowers, Kanaya, Fukuoka, Allen, Cooper, Aouizerat, 2017.). Akutna aerobna vježba u jednoj sesiji značajno je podigla razine cirkulirajućih miRNA povezanih s upalom u drugom uzorku pretilih. Nasuprot tome, tromjesečna intervencija vježbanja značajno je smanjila razine miR-146a-5p, što je također u korelaciji sa smanjenjem ukupnog kolesterola i opsega struka.



Slika 6. Profil cirkulirajućih miRNA u različitim stadijima šećerne bolesti tipa 2 (preuzeto iz Vasu i sur. (2019.) uz dopuštenje izdavača)

Razine MiR-125b, miR-378a, miR-192, miR-629, miR-22-5p i miR-15a smanjene su u pacijenata koji su bili podvrgnuti barijatrijskom kirurškom zahvatu (Alkandari, Ashrafian, Sathyapalan, Sedman, Darzi, Holmes, Athanasiou, Atkin, Gooderham, 2018.). Nakon barijatrijske operacije, identična smanjenja cirkulirajućih miRNA (iako različitih miRNA) uočena su u zasebnom uzorku. MiRNA profili se stoga mogu koristiti za razumijevanje i praćenje učinkovitosti intervencijskih programa. Progresivna inzulinska rezistencija uzrokuje kompenzaciju otočića, koja održava homeostazu glukoze. Smanjenje sekretornog kapaciteta beta-stanica obilježje je abnormalnog glikemijskog stanja koje se razvija kako bolest napreduje. IFG ili IGT mogu se koristiti za opisivanje ovog abnormalnog glikemijskog stanja. Pojedinci, međutim, mogu pokazivati oba stanja, što ilustrira činjenicu da T2DM ima raznolik

patogenezu. Unatoč pogoršanju glikemijskog stanja, pacijentima su potrebne godine da im se dijagnostivis T2DM, a stanje se često pogrešno dijagnosticira jer se niti jedan od ovih pokazatelja ne ispituje dovoljno često ili dovoljno temeljito. Nadalje, zbog varijacija u procijenjenim rasponima kliničkih pokazatelja i utjecaja čimbenika načina života, teško je razlikovati pacijente prije šećerne bolesti od zdrave populacije. U tom smislu, jedinstveni profili miRNA mogu se koristiti za predviđanje budućeg razvoja T2DM iako kronologija napredovanja od pre-DM do T2DM varira. Snažan prediktor T2DM-a u kohorti Bruneckovog ispitivanja bio je miR-126, s razinama koje su postupno padale s kontrola na one s IFG/IGT-om na one s T2DM-om. Panel miRNA, uključujući miR-15a, miR-126, miR-320, miR-223 i miR-28-3p, može se koristiti za točnu klasifikaciju slučajeva T2DM (Zampetaki, Kiechl, Drozdov, Willeit, Mayr, Prokopi, Mayr, Weger, Oberhollenzer, Bonora, et al. 2010.). MiR-126 pokazao je obrnutu korelaciju s glukozom natašte, HbA1c i glukozom jedan sat nakon obroka u dvije dodatne skupine (Zhang, Lv, Li, Chen, Liu, Wang, Su, 2013.). Glukoza u plazmi natašte snažno je povezana s miR-486, miR-146b i miR-15b u bolesnika s T2DM-om, a ovi se biomarkeri mogu koristiti za razlikovanje bolesnika s T2DM-om od zdravih kontrolnih osoba (Cui, You, Zhu, Wang, Zhou, Li, Wen, Xia, Wang, Ji, et al. 2018.). Vjerojatnost da će se razviti T2DM bila je najveća u pacijenata prije T2DM s višim razinama miR-150 i miR-30a-5p ili nižim razinama miR-375 i miR-15a (Jiménez-Lucena, Camargo, Alcalá-Díaz, Romero-Baldonado, Luque, van Ommen, Delgado-Lista, Ordovás, Pérez-Martínez, Rangel-Zúñiga et al. 2018.). Nakon 5 godina praćenja, miRNA panel koji se sastoji od miR-7641-3p, miR-136-5p, miR-490-3p, miR-501-5p, miR-127-5p, miR-4532-5p, miR-483-5p i miR-210-3p mogli su napraviti razliku između pretilih ljudi koji nisu napredovali od onih koji jesu i koji su dobili T2DM (Ghai, Baxter, Wu, Kim, Kuusisto, Laakso, Connolly, Li, Andrade-Gordon, Wang, 2019.). Stoga klasificiranje zdravstvenog stanja pacijenata pomoću panela miRNA i drugih kliničkih mjera kao što je HbA1c može pomoći u ranom otkrivanju bolesti. Korištenje biomarkera moglo bi pomoći u procjeni učinkovitosti intervencija kao i prognoze bolesti. Na primjer, povišene razine miR-150 i miR-130a-5p bile su povezane sa smanjenjem dispozicijskog indeksa (signaliziranje inzulina i otpuštanje) u pacijenata prije T2DM-a uključenih u studiju CORDIOPREV; povišene razine miR-150 bile su povezane sa smanjenjem indeksa osjetljivosti na inzulin i indeksa osjetljivosti mišića na inzulin; a povišene razine miR-375 bile su povezane sa smanjenjem indeksa inzulinske rezistencije jetre nakon 4-godišnjeg praćenja (Jiménez-Lucena, Camargo, Alcalá-Díaz, Romero-Baldonado, Luque, van Ommen, Delgado-Lista, Ordovás, Pérez-Martínez, Rangel-Zúñiga et al. 2018.). Druga skupina

pacijenta prije T2DM pokazala je povoljnu korelaciju između triglicerida u krvi i miR-192 i miR-193b.

Tijekom šest tjedana, program intervencije aktivnosti značajno je snizio te razine (Párrizas, Brugnara, Esteban, González-Franquesa, Canivell, Murillo, Gordillo-Bastidas, Cussó, Cadefau, García-Roves et al. 2015). Nakon tromjesečne intervencije mršavljenja, razine miR-326, miR-24, miR-425 i miR-652 u krvi porasle su u osoba s metaboličkim sindromom, dok su miR-106b, miR-140, miR-20b, miR-363, miR-486, miR-532, miR-92a, miR-93 i miR-let7c razine su pale. Utvrđeno je da su promjene u razinama sljedećih miRNA značajno povezane s promjenom težine tijekom razdoblja od tri mjeseca: miR-146a, miR-151a, miR-23a, miR-181b, miR-181d, miR-21, miR-221, miR-222, miR-223, miR-23, miR-24 i miR-27b. Nakon tri mjeseca, postojala je značajna korelacija između osnovnih razina miR-143, miR-145, miR-146, miR-191, miR-221, miR-23a, miR-29a i miR-584 i promjene težine (Flowers, Kanaya, Fukuoka, Allen, Cooper, 2017.). Kod ljudi s rizikom od T2DM, porast miR-152 uzrokovan vitaminom D negativno je korelirao s HbA1c, dok je pad miR-192 u povoljnoj korelaciji s glukozom natašte (Nunez Lopez, Pittas, Pratley, Seyhan, 2017.). Povišene razine miR-144, miR-20a i let-7b u kineskoj populaciji s IFG povećale su rizik za T2DM i pozitivno korelirale s HOMA-IR, dok su smanjene razine miR-142 povećale rizik za IFG i negativno korelirale s HOMA-IR (Liang, Dong, Zhang, Wang, He, Yan, 2018.). U skupini od 871 osobe, miR-144-5p bio je obrnuto povezan s razinama inzulina, ažuriranim vrijednostima modela procjene homeostaze (HOMA2) i razinama triglicerida bez obzira na stanje bolesti (pre-DM, T2DM, kontrole bez dijabetesa). Geni miR-122-5p, miR-184 i miR-339-3p povezani su s HOMA2, odnosno inzulinom. HbA1c i sljedeći geni povezani pozitivno: miR-144-5p, miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-642a-5p i miR-181a-2-3p; i negativno: miR-148a-3p, miR-15-3p, miR-93-5p i miR-18-3p. Osim općeg populacijskog trenda, miR-122-5p je bio neovisno povezan s inzulinom i indeksom HOMA2 kod osoba s IFG-om, dok je miR-146b-5p bio povezan s HbA1c. Nadalje, miR-106b-5p i miR-885-5p pokazali su snažnu korelaciju s razinama glukoze u serumu (Mononen, Lyytikäinen, Seppälä, Mishra, Juonala, Waldenberger, Klopp, Illig, Leiviskä, Loo, et al. 2019.). Bez obzira na prisutnost bolesti, ove opće populacijske studije ključne su za razumijevanje odnosa između miRNA i metaboličkih markera. MiRNA potpise treba proučavati u različitim etničkim zajednicama kako bi se vidjelo mogu li predvidjeti pre-DM ili T2DM. Vjerojatno je da na određene miRNA potpise utječu rasne karakteristike. Na primjer, miR-15a, miR-29b, miR-24, miR-126, miR-144, miR-223, miR-191 i miR-486-5p pokazali su negativnu korelaciju s indeksom osjetljivosti na inzulin u švedskoj populaciji. MiR-197, ali ne

i miRNA identificirane u švedskoj skupini, pozitivno povezane s indeksom osjetljivosti na inzulin u iračkoj skupini, što ukazuje na odnose specifične za etničku pripadnost (Wang, Sundquist, Zöller, Memon, Palmér, Sundquist, Bennet, 2014.). Sve u svemu, jedinstveni miRNA profili mogu se koristiti za predviđanje napredovanja T2DM-a. Kako bi se povećala moć predviđanja ovih potpisa, potrebno je razviti miRNA potpise specifične za etničku pripadnost.

4.6.5 Izazovi miRNA kao biomarkera

Iako teoretski dobar biomarker za šećernu bolest tipa 2, istraživanja su pokazala da je samo mali broj pouzdanih miRNA profila ekspresije konzistentan. Zbog tehnoloških problema u rukovanju uzorcima, mjerenju miRNA i interpretaciji podataka, moguće je propustiti značaj miRNA. Što se tiče varijacija u serumu i plazmi, važno je razmotriti kako trombociti utječu na sadržaj miRNA. Idealne miRNA u cirkulaciji bile bi bez stanica i odražavale bi stvarno bolesno stanje. U većini istraživanja provodile su se analize korištenjem skupova uzoraka, što nije najbolja metoda za bilo koju analizu jer skupovi uzoraka postavljaju premisu da svaki član skupine ima istu bolest pa se ne nudi dovoljno informacija o varijabilnosti. Kako bi se točno identificirali miRNA profili za određeno stanje bolesti, veličina uzorka je ključna stvar. Ključno je uspostaviti dosljednost u miRNA profilima u neovisnim centrima pa uključivanje što više istraživanja u naše analize daje priliku optimizirati i oblikovati buduća istraživanja. Nadalje, nekoliko tehnika normalizacije koristi se u istraživanjima, u rasponu od egzogenih spike-in kontrola do endogenih miRNA kontrola. Iako je upotreba endogenih kontrola održavanja uobičajena praksa za analizu ekspresije gena qPCR, treba biti oprezan pri korištenju istih kontrola za mjerenje cirkulirajućih miRNA. Na primjer, miR-191 korišten je u jednoj studiji kao endogena kontrola za normalizaciju (Pescador, Pérez-Barba, Ibarra, Corbatón, Martínez-Larrad, Serrano-Ríos, 2013.), međutim daljnja istraživanja su pokazala da pre-DM i pretilost mogu utjecati na razine miR-191 u krvi (Flowers, Gadgil, Aouizerat, Kanaya, 2015.). Egzogene spike-in kontrole, s druge strane, koriste se za objašnjenje tehničkih varijacija u ekstrakciji miRNA i konverziji cDNA. Dodatno, za unos cDNA, trenutno dostupni komercijalni kompleti savjetuju prilagodbu podataka unosu uzorka (volumen plazme ili seruma) za razliku od koncentracije RNA (kao što je norma za qPCR). To je prvenstveno zbog izazova u procjeni koncentracije miRNA. Udio miRNA u kratkim RNA može varirati između uzoraka čak i kada se mogu izračunati male količine RNA. Takve varijacije u sićušnom ulazu RNA za pretvorbu cDNA mogle bi ispoljavati iskrivljene rezultate. Udio miRNA cirkulirajućih kratkih RNA manji je u normalnim zdravim uvjetima, tako da prilagođavanje unosa za cDNA volumenu

uzorka može uzrokovati pristranost u analizi podataka. Prilagođavanjem ekspresije broju očitavanja umjesto unosa uzorka, sekvenciranje male RNA nadilazi ovu pristranost. Ova je strategija, međutim, nepraktična jer je sićušno sekvenciranje RNA preskupo da bi se provodilo često. Ti se problemi mogu riješiti korištenjem sintetičkih zamjena miRNA za apsolutno određivanje količina miRNA. Osim toga, analiza korelacije i usporedba različitih skupova podataka također će imati koristi od apsolutne kvantifikacije pa bi tehnike ekspresije miRNA trebale biti standardizirane za potencijalnu kliničku upotrebu.

4.6.6. Budućnost miRNA kao biomarkera šećerne bolesti

Gore navedeni rezultati podržavaju privlačnost miRNA kao potpuno novih biomarkera šećerne bolesti. Zapravo, promjene u razinama podskupa ovih malih molekula RNA u tjelesnim tekućinama obećavaju pružanje svježih informacija za rano otkrivanje ljudi u riziku od razvoja šećerne bolesti i njenih komplikacija, za praćenje tijeka bolesti ili za procjenu učinkovitosti terapije. Međutim mora se postići značajan znanstveni i tehnološki napredak prije nego što se ti ciljevi mogu ispuniti. MiRNA u optjecaju trebale bi zamijeniti ili dopuniti postojeće standardne biomarkere. Stoga je potrebno sustavno uspoređivati njihovu sposobnost predviđanja pojave šećerne bolesti ili njenih posljedica s onima već postojećih biomarkera. Prikupljanje uzoraka podataka, standardiziranje tehnologija određivanja miRNA, praćenje i evaluacija povezanosti sa stadijem bolesti i poboljšanje njihove dijagnostičke i prognostičke moći za stvaranje strategija terapijske intervencije je od velike važnosti. Bit će ključno pažljivo ispitati mogu li miRNA ranije i/ili preciznije identificirati osobe koji su u opasnosti od bolesti ili njenih dugoročnih učinaka. Nadajmo se da će se situacija promijeniti u budućnosti, međutim za većinu objavljenih istraživanja sada nema jasne koristi od zamjene procjena cirkulirajućih razina miRNA za druge konvencionalne biomarkere. Iako su brojni članci opisali promjene u miRNA koje su povezane s šećernom bolesti ili njenim posljedicama, još uvijek ne postoji suglasnost među istraživačima u pogledu najvažnijih miRNA koje treba ispitati. To se može djelomično povezati s raznolikošću metoda koje su istraživači odabrali. Brojne miRNA sustavno su profilirane u nekim istraživanjima, dok su se druge usredotočile na nekoliko odabranih miRNA za koje se smatralo da će biti podložnije šećernoj bolesti. Kako bismo olakšali usporedbu rezultata različitih studija i došli do konsenzusa o miRNA koje su najprikladnije da služe kao rani biomarkeri šećerne bolesti, hitno su potrebne standardizirane tehnike za pripremu uzorka, ekstrakciju RNA i analizu miRNA. Stupanj hemolize i stanične kontaminacije imaju značajan utjecaj na količinu specifičnih miRNA u plazmi, čineći ih manje korisnima kao kliničkim biomarkerima (McDonald, Milosevic, Reddi, Grebe, Algeciras-

Schimnich, 2011.). Šećerna bolest je komplicirano stanje koje uzrokuje značajne metaboličke promjene i značajne prilagodbe funkcije više organa. MiRNA se smatraju mogućim biomarkerima za sve više i više bolesti. Stoga će biti ključno utvrditi jesu li otkrivene promjene miRNA samo indikativne za predijabetičko ili dijabetičko stanje ili se također vide u drugim fiziološkim ili patološkim okolnostima, kao što je odgovor na promjene u prehrani, upalu, autoimunost, rak, itd. Razine miRNA u krvi ne povezuju se odmah s promjenama u beta-stanicama gušterače ili ciljnim tkivima inzulina koje se javljaju kod dijabetesa, a njihovo podrijetlo sada je uglavnom nejasno. MiRNA se mogu transportirati putem membranski vezanih vezikula, proteinskih kompleksa ili lipoproteinskih čestica i mogu ih aktivno ili pasivno otpuštati brojne stanice. Velika većina studija do sada je izravno ispitivala razinu miRNA u plazmi (ili serumu). Ovo je nedvojbeno jednostavna i praktična strategija, ali malo je vjerojatno da će promjene u količini miRNA koje dolaze iz određenih vrsta stanica koje nisu u neposrednoj blizini krvi ili nisu osobito brojne imati veliki utjecaj na skup plazmatskih miRNA i vjerojatno će proći nezapaženo. Procesi koji omogućuju preciznu procjenu miRNA transportiranih egzozomima, proteinskim kompleksima ili lipoproteinima vjerojatno će pružiti detaljnije informacije o fiziološkom ili patološkom statusu ciljnih organa unatoč tome što su tehnički zahtjevni. Korištenjem prisutnosti karakterističnih proteina na površini vezikula, moglo bi se moći afinitetno pročistiti membranski vezane vezikule koje dolaze iz određene klase stanica (Muller, 2012.). Ova će metoda biti posebno prikladna za procjenu rezidualne stanične mase kod osoba s T1DM koje su nedavno dobili dijagnozu. Zapravo, miRNA koje oslobađaju stanice koje izlučuju inzulin čine samo mali dio nekodirajućih RNA koje cirkuliraju u cirkulaciji. Traženjem miRNA koje su značajno obogaćene -stanicama, kao što je miR-375, ovaj bi problem mogao biti djelomično riješen. Proizvodnja egzozoma od strane brojnih staničnih linija koje izlučuju inzulin pokazala se značajnom, a istraživanja sugeriraju da je proizvodnja egzozoma od strane štakorskih i ljudskih stanica otočića slična (Guay, Menoud, Gattesco, Regazzi, 2012.). Egzozomi iz stanica otočića mogu se obogatiti pomoću određenih procesa, koji bi vjerojatno poboljšali sposobnost otkrivanja određenih promjena u stanicama koje izlučuju inzulin i omogućili točniju procjenu funkcionalne stanične mase.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju proučene literature, može se zaključiti sljedeće:

- Šećerna bolest tipa 2 je jedan od vodećih svjetskih zdravstvenih problema a predviđanja kažu da će kroz vrijeme sve više ljudi obolijevati od te bolesti
- Iz tog razloga trebaju nam bolji biomarkeri za točniju identifikaciju onih koji su u opasnosti od razvoja šećerne bolesti i njenih komplikacija, za praćenje tijeka bolesti i/ili za procjenu učinkovitosti terapije
- Istraživanja nam pokazuju da je miRNA važan regulator ekspresije gena. Promjene u koncentraciji niza miRNA u stanicama koje izlučuju inzulin i ciljnim tkivima inzulina povezane su sa šećernom bolesti tipa 1 i tipa 2
- Već imamo dostupne spojeve koji mogu učinkovito kontrolirati ekspresiju miRNA i in vitro i in vivo. Nažalost, trenutačno ne postoje metode kojima bi se te molekule ciljale specifično na način specifičan za stanicu. Otkriće metoda koje dopuštaju in vivo primjenu oponašanja miRNA ili anti-miRs selektivno u beta stanicama i ciljnim tkivima inzulina moglo bi omogućiti korekciju kritičnih razina miRNA u dijabetičkim stanjima i otvoriti put za nove terapije
- Budući da ih je jednostavno uzorkovati, miRNA su stabilne pod različitim okolnostima pohrane i jednostavne za analizu korištenjem testova koji su precizni, osjetljivi i ponovljivi
- U uzorcima osoba sa šećernom bolesti iz različitih skupina, istraživanja su identificirala karakteristične promjene u razinama miRNA u krvi, ali kontinuirane promjene u profilu ekspresije miRNA za T1DM, T2DM ili njihove komplikacije još nisu definirani.
- Iako mjerenja cirkulirajuće miRNA imaju potencijal poboljšati identifikaciju ljudi predisponiranih za razvoj šećerne bolesti, niz važnih pitanja, kao što je izbor najprikladnijih protokola uzorkovanja krvi (serum, plazma, egzosomi, itd.), još uvijek je neriješen
- U budućnosti bi moglo biti moguće identificirati osobe koji su u riziku od obolijevanja od šećerne bolesti tipa 1 ili tipa 2 i potencijalno zaustaviti napredovanje bolesti mjerenjem razine određenih miRNA

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AGO- Argonaut proteini

AKT- proteinska kinaza B

ATP- adenzin trifosfat

BN- Brown-Norway

cDNA- cirkulirajuća DNA

db/db- vrsta miševa s poremećenim lučenjem leptina

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

dsRNA- dvolančana RNA

GADA- antitijela protiv glutamat dekarboksilaze

GK- Goto kakizaki vrsta štakora

GTP- gvanin trifosfat

HbA1c- hemoglobin A1c

HDL- lipoproteini visoke gustoće

HHS- hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje

HOMA2- model procjene homeostaze

HOMA-IR- homeostatski model procjene inzulinske rezistencije

HOMA-B- homeostazni model procjene funkcije stanica

IAA- antitijela protiv inzulina

IA-2, IA-2 β - antitijela na tirozin fosfataze

ICA- antitijela protiv stanica β stanica Langerhansovih otočića

IFG- impaired fasting glucose, poremećena glukoza kod gladi

IFN- inteferon gama

IGT- impaired glucose tolerance, poremećena tolerancija na glukozu

IL-1- interleukin 1

IL-1 β - interleukin 1 beta

NOD- dijabetiski ali ne pretili miševi

ob/ob- vrsta miševa s poremećenim lučenjem leptina

OGTT- oralni test tolerancije na glukozu

PACT- proteinski aktivator PKR

PAZ- domena koja sadrži Piwi, Argonaut i Zwillie podjedinice

PDK1- protein kinaza 1

pre-DM- rani stadij razvoja šećerne bolesti

PRYSMS- Practicing Restorative Yoga vs. Stretching for the Metabolic Syndrome

qPCR- lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

RISC- RNA inducirani kompleks utišavanja

siRNA- jednolančana RNA

TNF- tumor nekrotski faktor

TRBP- HIV trans-aktivirajući odgovor RNA-vezujući protein

VAMP-2- Vesicle-associated membrane protein 2, membranski protein povezan s vezikulama

ZnT8- transporter cinka

7. LITERATURA

Alkandari, Ashrafian, Sathyapalan, Sedman, Darzi, Holmes, Athanasiou, Atkin, Gooderham, Improved physiology and metabolic flux after Roux-en-Y gastric bypass is associated with temporal changes in the circulating microRNAome: A longitudinal study in humans. *BMC Obes.*, 2018., 5, 20,

Alvarez, M.L. & Distefano, J.K. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Res Clin Pract* 2013., 99, 1-11,

Belongie, Ferrannini, Johnson, Andrade-Gordon, Hansen, Petrie, Identification of novel biomarkers to monitor β -cell function and enable early detection of type 2 diabetes risk. *PLoS ONE*, 2017. , 12

Betancur J.G., Tomari Y. Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals. ;2012., 24–30

Caporali, A. et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* , 2011.123, 282-91

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 2008., 18, 997-1006,

Cui, You, Zhu, Wang, Zhou, Li, Wen, Xia, Wang, Ji, et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism*, 2018. 78, 95–105

DeFronzo R.A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009.

Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.*, 2008. 452, 896-9

El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miRNA-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008. 57, 2708-17

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miRNA-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*. 2006. 3, 87-98,

Fichtlscherer, S. et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010. 107, 677-84

Flowers, Aouizerat, Abbasi, Lamendola, Grove, Fukuoka, Reaven, Circulating microRNA-320a and microRNA-486 predict thiazolidinedione response: Moving towards precision health for diabetes prevention. *Metabolism*, 2015, 64, 1051–1059

Flowers, E.; Gadgil, M.; Aouizerat, B.E.; Kanaya, A.M. Circulating microRNAs associated with glycemic impairment and progression in Asian Indians. *Biomark. Res.*, 2015, 3, 22

Flowers, Kanaya, Fukuoka, Allen, Cooper, Aouizerat, Preliminary evidence supports circulating microRNAs as prognostic biomarkers for type 2 diabetes. *Obes. Sci. Pract.*, 2017, 3, 446–452

Flynt, A.S. & Lai, E.C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet* 2008, 9, 831-42

Forouhi N.G., Merrick D., Goyder E. Diabetes prevalence in England, 2001 – estimates from an epidemiological model. *Diabetic Med*. 2006, 23, 189–197

Forouhi, Wareham. Epidemiology of diabetes, 2014, 42, 698-702

Gallagher, I.J. et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med* ,2010, 2, 9,

Ghai, Baxter, Wu, Kim, Kuusisto, Laakso, Connolly, Li, Andrade-Gordon, Wang, Circulating RNAs as predictive markers for the progression of type 2 diabetes. *J. Cell. Mol. Med.*, 2019, 23, 2753–2768

Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009, 11, 1143-9

Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R, Diabetes mellitus, a microRNA-related disease?, *The journal of laboratory and clinical medicine*, 2011, 157, 253-64

Guay, Menoud, Gattesco, Regazzi, MicroRNA transfer as a new cell-to-cell communication mode between pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2012, 55, S95

Hennessy E, Clynes M, Jeppesen PB, O'Driscoll L. Identification of microRNA with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 396, 457-62

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Wills QF, Kaisaki PJ, Barrett A, et al. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of Type 2 Diabetes. *BMC Med Genomics.*, 2009, 2, 54

Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2, Kokic, Prašek, Pavlic Renar, Rahelic, Pavic, Jandric Balen, Radman, Duvnjak, Jurišić-Eržen, Božikov, Matic, Zjajac-Rotkvic, Crncevic-Orlic, Krnic, Željko Metelko, 2011.; 8

Jiménez-Lucena, Camago, Alcalá-Díaz, Romero-Baldonado, Luque, van Ommen, Delgado-Lista, Ordovás, Pérez-Martínez, Rangel-Zúñiga et al. A plasma circulating miRNAs profile predicts type 2 diabetes mellitus and prediabetes, *CORDIOPREV study. Exp. Mol. Med.*, 2018, 50, 168

Jones, Danielson, Benton, Ziegler, Shah, Stubbs, Das, Macartney-Coxson, miRNA signatures of insulin resistance in obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 2017, 25, 1734–1744

Kantharidis, P., Wang, B., Carew, R.M. & Lan, H.Y. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes* 2011, 60, 1832-7

Kerner W, Brückel J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014, 122, 384-386

Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena S.D., Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003, 115, 209–216

Kohei KAKU, Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy, *JMAJ*, 2010, 53, 41-43

Krmpotić, 2020, ŠEĆERNA BOLEST I NJEZINE KOMPLIKACIJE, 2020;1-7

Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S. & Tewari, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010, 50, 298-301

Kumar, M., Nath, S., Prasad, H.K., Sharma, G.D. & Li, Y. MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus. *Protein Cell* 2012, 3, 726-38

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 193, 75, 843-54

Liang, Dong, Zhang, Wang, He, Yan, Identification of neuroendocrine stress response-related circulating microRNAs as biomarkers for type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Front. Endocrinol.*, 2018., 9, 132,

Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res.* 2009., 50, 1756-65,

Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biological chemistry.* 2008., 389, 305-12

Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes.* 2008, 389, 305-12

Ludwig, N.; Leidinger, P.; Becker, K.; Backes, C.; Fehlmann, T.; Pallasch, C.; Rheinheimer, S.; Meder, B.; Stähler, C.; Meese, E.; et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44, 3865–3877

Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes*, 2007, 56, 2938-45

Macisaac, R.J. & Jerums, G. Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011, 20, 246-57

McDonald, Milosevic, Reddi, Grebe, Algeciras-Schimmich, Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 2011, 57, 833-40

Min-Sun Song and John J. Rossi, Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity, *Biochem J*, 2017, 474, 1603-1618

MiRNA (microRNA) Introduction, https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/mirna-introduction?gclid=CjwKCAjwy_aUBhACEiwA2IHHQLVMBEmBB77VymWGzk2buF3v8pHOZPyKzykyUsnR1p43muTgSgAmVhoCcIwQAvD_BwE_, pristupljeno 10.6.2022.

Mononen, Lyytikäinen, Seppälä, Mishra, Juonala, Waldenberger, Klopp, Illig, Leiviskä, Loo, et al. Whole blood microRNA levels associate with glycemic status and correlate with target mRNAs in pathways important to type 2 diabetes. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 8887

Muller, G. Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2012, 5, 247-82

Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, et al. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, 385, 492-6

Neal, C.S. et al. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011, 26, 3794-802

Nunez Lopez, Pittas, Pratley, Seyhan, Circulating levels of miRNA-7, miRNA-152 and miRNA-192 respond to vitamin D supplementation in adults with prediabetes and correlate with improvements in glycemic control. *J. Nutr. Biochem.*, 2017, 49, 117–122

Orban, T. et al. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2011, 378, 412-9

Párrizas, Brugnara, Esteban, González-Franquesa, Canivell, Murillo, Gordillo-Bastidas, Cussó, Cadefau, García-Roves et al. Circulating miRNA-192 and miRNA-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, 100, E407–E415

Pescador, Pérez-Barba, Ibarra, Corbatón, Martínez-Larrad, Serrano-Ríos, Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS ONE*, 2013, 8

Poy, M.N. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004, 432, 226-30

Prats-Puig, Ortega, Mercader, Moreno-Navarrete, Moreno, Bonet, Ricart, López-Bermejo, Fernández-Real, Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, 98, E1655–E1660

Purohit, S. & She, J.X. Biomarkers for type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Med* 2008, 1, 98-116

Roggli, E. et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*, 2012, 61, 1742-51

Seyhan, Nunez Lopez, Xie, Yi, Mathews, Pasarica, Pratley, Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: *A pilot cross-sectional study*. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 31479

Schulze, M.B. et al. Use of multiple metabolic and genetic markers to improve the prediction of type 2 diabetes: the EPIC-Potsdam Study. *Diabetes Care* 2009, 32, 2116-9

Sekine S, Ogawa R, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation. *J Pathol.*, 2009, 219, 365-72

Shaw, Sicree, Zimmet, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 1, 4-14

Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miRNA-30d in insulin transcription. *RNA*, 2009, 15, 287-93

Thomas, Clinical Laboratory Diagnostics, 2020, 3.1.1 – 3.1.6.3. https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k03.html#_idTextAnchor1100 pristupljeno 1.6.2022.

Trachtenbarg DE. Diabetic ketoacidosis. *Am Fam Physician*. 2005, 71, 1705-1714

Vasu S, Kumano K, Darden C M, Rahman I, Lawrence MC, Naziruddin B, MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States, *Cells*, 2019. 8, 1533

Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D. & Remaley, A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011, 13, 423-33

Wang, Sundquist, Zöller, Memon, Palmér, Sundquist, Bennet, Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2. *PLoS ONE*, 9, 2014.

Weber, J.A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 2010, 56, 1733-41

Westerberg DP. Diabetic ketoacidosis: evaluation and treatment. *Am Fam Physician*. 2013, 87, 337-346

WHO, Diabetes, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Willeit, Skroblin, Moschen, Yin, Kaudewitz, Zampetaki, Barwari, Whitehead, Ramírez, Goedeke, et al. Circulating microRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2017, 66, 347–357

Winer, N. & Sowers, J.R. Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol*, 2004., 44, 397-405

Winter, W.E., Harris, N. & Schatz, D. Type 1 diabetes islet autoantibody markers. *Diabetes Technol Ther*, 2002, 4, 817-39

Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes*., 2009, 58, 1050-7,

Zampetaki, A.; Kiechl, S.; Drozdov, I.; Willeit, P.; Mayr, U.; Prokopi, M.; Mayr, A.; Weger, S.; Oberhollenzer, F.; Bonora, E.; et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miRNA-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ. Res.*, 2016, 107, 810–817

Zhang, Lv, Li, Chen, Liu, Wang, Su, Plasma miRNA-126 is a potential biomarker for early prediction of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *BioMed Res. Int.*, 2013, 761617,

Zhao, E. et al. Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice. *Mamm Genome* 2009, 20, 476-85

8. SAŽETAK/SUMMARY

Šećerna bolest tipa 2 jedno je od najčešćih oboljenja i najvećih izazova suvremene medicine. Glavne karakteristike T2DM su nesposobnost tkiva osjetljivih na inzulin da na odgovarajući način reagiraju na inzulin (inzulinska rezistencija), smanjena funkcija β stanica Langerhansovih otočića te smanjena sekrecija inzulina. Definitivan i konačan uzrok smanjene funkcije β -stanica u T2DM je zasad nepoznat a smatra se da ulogu imaju genetski i okolišni čimbenici. T2DM je jako komplicirana bolest sa multiorganskim efektima a glavni simptomi koji se javljaju su povećani osjećaji gladi i žeđi, učestalo mokrenje, gubitak na tjelesnoj masi, pretjerani umor te je glavni uzročnik ovih simptoma hiperglikemija. Javlja se potreba za biomarkerima koji će nam pomoći da ranije otkrijemo bolest i kvalitetnije pratimo učinak terapije. MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće RNA molekule koje su duge oko 21-25 nukleotida te funkcioniraju kao translacijski represori. MiRNA su danas univerzalno prepoznate kao glavni regulatori genske ekspresije i kao ključni kontrolori nekoliko bioloških i patoloških procesa. MiRNA nemaju samo funkciju regulacije gena unutar stanica u kojoj nastaju, već se mogu naći i u tjelesnim tekućinama poput krvi, zajedno sa proteinima, mikrovezikulama ili lipoproteinskim kompleksima. Neke značajke miRNA koje ih čine dobrim biomarkerima su da se osim u krvi, nalaze se i u drugim tjelesnim tekućinama koje možemo analizirati kao što su slina, urin, majčino mlijeko i amnionska tekućina, mogu se određivati visokoosjetljivim i specifičnim kvantitativnim PCR metodama, zdravi donori nemaju značajnije varijacije miRNA profila tijekom dana te se mogu mjeriti i u serumu i u plazmi. Ono što je jako važno je da se profil ekspresije miRNA u β -stanicama i ciljanim tkivima inzulina mijenjaju i u T1DM i T2DM što najvjerojatnije pridonosi oštećenju funkcija ovih tkiva. Iako teoretski dobar biomarker za šećernu bolest tipa 2, istraživanja su pokazala da je samo mali broj pouzdanih miRNA profila ekspresije konzistentan. Zbog tehnoloških problema u rukovanju uzorcima, mjerenju miRNA i interpretaciji podataka, moguće je propustiti značaj miRNA. MiRNA koje bi se koristile trebale bi zamijeniti ili dopuniti postojeće standardne biomarkere. Stoga je potrebno sustavno uspoređivati njihovu sposobnost predviđanja pojave šećerne bolesti ili njenih posljedica s onima već postojećih biomarkera.

Type 2 diabetes is one of the most common diseases and the greatest challenges of modern medicine. The main characteristics of T2DM are the inability of insulin-sensitive tissues to respond appropriately to insulin (insulin resistance), reduced β -cell function of the islets of Langerhans, and reduced insulin secretion. The definitive and definitive cause of reduced β -cell function in T2DM is currently unknown, and it is believed that genetic and environmental factors play a role. T2DM is a very complicated disease with multiorgan effects, and the main symptoms that occur are increased feelings of hunger and thirst, frequent urination, weight loss, excessive fatigue, and the main cause of these symptoms is hyperglycemia. There is a need for biomarkers that will help us detect the disease earlier and better monitor the effect of therapy. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that are about 21-25 nucleotides long and function as translational repressors. MiRNAs are now universally recognized as the main regulators of gene expression and as key controllers of several biological and pathological processes. MiRNAs not only have the function of gene regulation inside the cells in which they are produced, but can also be found in body fluids such as blood, together with proteins, microvesicles or lipoprotein complexes. Some features of miRNAs that make them good biomarkers are that apart from blood, they are also found in other body fluids that we can analyze such as saliva, urine, breast milk and amniotic fluid, they can be determined by highly sensitive and specific quantitative PCR methods, healthy donors do not have more significant variations of the miRNA profile during the day and can be measured in both serum and plasma. What is very important is that the expression profile of miRNAs in β -cells and target tissues of insulin are changed in both T1DM and T2DM, which most likely contributes to the impairment of the functions of these tissues. Although theoretically a good biomarker for type 2 diabetes, research has shown that only a small number of reliable miRNA expression profiles are consistent. Due to technological problems in sample handling, miRNA measurement and data interpretation, it is possible to miss the significance of miRNAs. The miRNAs that would be used should replace or complement existing standard biomarkers. Therefore, it is necessary to systematically compare their ability to predict the onset of diabetes or its consequences with those of already existing biomarkers.

9. PRILOZI

U ovom radu nisu korišteni eksperimentalni podaci, anketni upitnici, protokoli korišteni u istraživanju i slično.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

MIKRORNA – NOVI BIOMARKER ZA RANU DETEKCIJU I PRAĆENJE PACIJENATA SA TIPOM 2 ŠEĆERNE BOLESTI

Dominik Veselko Barać

SAŽETAK

Šećerna bolest tipa 2 jedno je od najčešćih oboljenja i najvećih izazova suvremene medicine. Glavne karakteristike T2DM su nesposobnost tkiva osjetljivih na inzulin da na odgovarajući način reagiraju na inzulin (inzulinska rezistencija), smanjena funkcija β stanica Langerhansovih otočića te smanjena sekrecija inzulina. Definitivan i konačan uzrok smanjene funkcije β -stanica u T2DM je zasad nepoznat a smatra se da ulogu imaju genetski i okolišni čimbenici. T2DM je jako komplicirana bolest sa multiorganskim efektima a glavni simptomi koji se javljaju su povećani osjećaji gladi i žeđi, učestalo mokrenje, gubitak na tjelesnoj masi, pretjerani umor te je glavni uzročnik ovih simptoma hiperglikemija. Javlja se potreba za biomarkerima koji će nam pomoći da ranije otkrijemo bolest i kvalitetnije pratimo učinak terapije. MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće RNA molekule koje su duge oko 21-25 nukleotida te funkcioniraju kao translacijski represori. MiRNA su danas univerzalno prepoznate kao glavni regulatori genske ekspresije i kao ključni kontrolori nekoliko bioloških i patoloških procesa. MiRNA nemaju samo funkciju regulacije gena unutar stanica u kojoj nastaju, već se mogu naći i u tjelesnim tekućinama poput krvi, zajedno sa proteinima, mikrovezikulama ili lipoproteinskim kompleksima. Neke značajke miRNA koje ih čine dobrim biomarkerima su da se osim u krvi, nalaze se i u drugim tjelesnim tekućinama koje možemo analizirati kao što su slina, urin, majčino mlijeko i amnionska tekućina, mogu se određivati visokoosjetljivim i specifičnim kvantitativnim PCR metodama, zdravi donori nemaju značajnije varijacije miRNA profila tijekom dana te se mogu mjeriti i u serumu i u plazmi. Ono što je jako važno je da se profil ekspresije miRNA u β -stanicama i ciljanim tkivima inzulina mijenjaju i u T1DM i T2DM što najvjerojatnije pridonosi oštećenju funkcija ovih tkiva. Iako teoretski dobar biomarker za šećernu bolest tipa 2, istraživanja su pokazala da je samo mali broj pouzdanih miRNA profila ekspresije konzistentan. Zbog tehnoloških problema u rukovanju uzorcima, mjerenju miRNA i interpretaciji podataka, moguće je propustiti značaj miRNA. MiRNA koje bi se koristile trebale bi zamijeniti ili dopuniti postojeće standardne biomarkere. Stoga je potrebno sustavno uspoređivati njihovu sposobnost predviđanja pojave šećerne bolesti ili njenih posljedica s onima već postojećih biomarkera.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranice, 6 grafičkih prikaza, 4 tablice i 77 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Šećerna bolest tipa 2, mikroRNA, biomarker, dijagnostika, β -stanice, genska ekspresija

Mentor: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Doc. dr. sc. Anita Somborac Bačura, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskobiokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: prosinac 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

MICRO RNA – NEW BIOMARKER FOR EARLY DETECTION AND MONITORING OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

Dominik Veselko Barać

SUMMARY

Type 2 diabetes is one of the most common diseases and the greatest challenges of modern medicine. The main characteristics of T2DM are the inability of insulin-sensitive tissues to respond appropriately to insulin (insulin resistance), reduced β -cell function of the islets of Langerhans, and reduced insulin secretion. The definitive and definitive cause of reduced β -cell function in T2DM is currently unknown, and it is believed that genetic and environmental factors play a role. T2DM is a very complicated disease with multiorgan effects, and the main symptoms that occur are increased feelings of hunger and thirst, frequent urination, weight loss, excessive fatigue, and the main cause of these symptoms is hyperglycemia. There is a need for biomarkers that will help us detect the disease earlier and better monitor the effect of therapy. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that are about 21-25 nucleotides long and function as translational repressors. MiRNAs are now universally recognized as the main regulators of gene expression and as key controllers of several biological and pathological processes. MiRNAs not only have the function of gene regulation inside the cells in which they are produced, but can also be found in body fluids such as blood, together with proteins, microvesicles or lipoprotein complexes. Some features of miRNAs that make them good biomarkers are that apart from blood, they are also found in other body fluids that we can analyze such as saliva, urine, breast milk and amniotic fluid, they can be determined by highly sensitive and specific quantitative PCR methods, healthy donors do not have more significant variations of the miRNA profile during the day and can be measured in both serum and plasma. What is very important is that the expression profile of miRNAs in β -cells and target tissues of insulin are changed in both T1DM and T2DM, which most likely contributes to the impairment of the functions of these tissues. Although theoretically a good biomarker for type 2 diabetes, research has shown that only a small number of reliable miRNA expression profiles are consistent. Due to technological problems in sample handling, miRNA measurement and data interpretation, it is possible to miss the significance of miRNAs. The miRNAs that would be used should replace or complement existing standard biomarkers. Therefore, it is necessary to systematically compare their ability to predict the onset of diabetes or its consequences with those of already existing biomarkers.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 6 figures, 4 tables and 77 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Type 2 diabetes, microRNA, biomarker, diagnostics, β -cells, gene expression

Mentor: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Anita Somborac Bačura Ph.D. *Docent University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: December 2022.

