

## Investigation of the Expression of lncRNA HOTAIR and lncRNA PVT1 in Individuals with Diabetic Nephropathy

Seyed Mohsen Aghaei-Zarch<sup>1</sup>,  
Leila Mahmoudieh<sup>2</sup>,  
Mohammad Miryounesi<sup>3</sup>,  
Abolfazl Movafagh<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Medical Genetics, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Endocrinology, Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 26, 2025; Accepted November 12, 2025)

### Abstract

**Background and purpose:** Diabetic nephropathy (DN) is a major microvascular complication of type 2 diabetes mellitus (T2DM) that can lead to kidney failure. In this study, the expressions of the lncRNA *HOTAIR* and *PVT1* genes were investigated in individuals with type 2 diabetes with DN, individuals with type 2 diabetes without DN, pre-diabetic individuals, and healthy controls. The study also examined the expression levels of lncRNA *HOTAIR* and *PVT1* in HEK-293 cells treated with high glucose (HG) and normal glucose (NG).

**Materials and methods:** In this cross-sectional study, the expression levels of the lncRNA *HOTAIR* and *PVT1* genes were compared among four groups: 50 healthy individuals, 50 individuals with prediabetes, 50 patients with T2DM, and 50 patients with DN. To model DN in vitro, HEK-293 cells were cultured under high-glucose (HG; 100 mmol/L) and normal-glucose (NG) conditions for 72 hours, and the expression levels of *HOTAIR* and *PVT1* were measured in the treated cells.

**Results:** The current work showed that the expression level of lncRNA *PVT1* was significantly increased in individuals with DN compared with the healthy and prediabetic groups, but there was no significant difference when compared with the T2DM group. The analysis also indicated that the expression level of lncRNA *HOTAIR* was elevated in the DN group compared with the other groups. Under high-glucose (HG) conditions, an increase in lncRNA *PVT1* expression was observed, while no change was detected in the expression level of lncRNA *HOTAIR*.

**Conclusion:** The results of this study suggest that lncRNA *HOTAIR* and lncRNA *PVT1* play roles in the pathogenesis of DN, with lncRNA *PVT1* showing a stronger association with glucose-induced cellular changes than lncRNA *HOTAIR*.

**Keywords:** Diabetic Nephropathy, lncRNA *HOTAIR*, lncRNA *PVT1*

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (251): 53-64 (Persian).

**Corresponding Author:** Abolfazl Movafagh - School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: movafagh.a@sbmu.ac.ir)

# بررسی بیان ژن های *lncRNA PVT1* و *lncRNA HOTAIR* در افراد مبتلا به نوروباتی دیابتی

سید محسن آقایی زارچ<sup>۱</sup>لیلا محمودیه<sup>۲</sup>محمد میریونسی<sup>۳</sup>ابوالفضل موفق<sup>۴</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** نوروباتی دیابتی یکی از عوارض میکروواسکولار دیابت نوع دو است که می تواند منجر به نارسایی کلیوی گردد. در این مطالعه به بررسی بیان ژن های *lncRNA PVT1* و *lncRNA HOTAIR* در افراد مبتلا به DN (دیابت نوع دو با نوروباتی دیابتی)، افراد مبتلا به T2DM (دیابت نوع دو بدون نوروباتی دیابتی)، گروه Pre-diabetes (پره دیابتی) و گروه Control (افراد سالم) پرداخته شد. علاوه بر این، میزان بیان *lncRNA PVT1* و *lncRNA HOTAIR* در سلول های HEK-293 تحت تیمار با گلوکز بالا و گلوکز طبیعی ارزیابی شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی، سطوح بیان ژن های *lncRNA PVT1* و *lncRNA HOTAIR* در بین چهار گروه، ۵۰ فرد سالم، ۵۰ فرد مبتلا به Pre-diabetes، ۵۰ بیمار مبتلا به T2DM و ۵۰ بیمار مبتلا به DN، مقایسه گردید. هم چنین برای القای مدل DN در محیط آزمایشگاهی، سلول های HEK-293 به میزان ۷۲ ساعت در شرایط گلوکز بالا (100mmolar/l) و گلوکز طبیعی تیمار شدند، و میزان بیان ژن های هدف در سلول های مورد نظر اندازه گیری شد.

**یافته ها:** میزان بیان *lncRNA PVT1* به میزان قابل ملاحظه ای در افراد مبتلا به DN نسبت به گروه سالم و pre-diabetes افزایش می یابد ولی تفاوت معنی داری با گروه T2DM نشان نمی دهد. هم چنین میزان بیان *lncRNA HOTAIR* در گروه DN در مقایسه با سایر گروه ها افزایش یافت. هم چنین، گلوکز بالا باعث افزایش میزان بیان *lncRNA PVT1* شد، در حالی که تغییری در میزان بیان *lncRNA HOTAIR* ایجاد نکرد.

**استنتاج:** ژن های *lncRNA PVT1* و *lncRNA HOTAIR* در پاتوژنز DN دخالت دارند، و هم چنین *lncRNA HOTAIR* به همراهی قوی تری با تغییرات سلولی ناشی از گلوکز دارد.

**واژه های کلیدی:** نوروباتی دیابتی، *lncRNA PVT1*، *lncRNA HOTAIR*

**مؤلف مسئول:** ابوالفضل موفق - تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، خیابان اعرابی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی E-mail: movafagh.a@sbmu.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار غدد درون ریز و متابولیسم (بالغین)، گروه غدد درون ریز بالغین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. دانشیار ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. استاد ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۵/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۵/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۸/۲۱

## مقدمه

دیابت نوع ۲ (Type 2 diabetes mellitus: T2DM) شایع‌ترین نوع دیابت است که در اثر تعامل عوامل ژنتیکی و محیطی ایجاد می‌شود (۱). T2DM یک اختلال مزمن متابولیک با زمینه التهابی است که با هیپرگلیسمی پایدار مشخص می‌شود. سطوح بالای قند خون در طولانی مدت می‌تواند بر عملکرد ارگانهایی نظیر کلیه، قلب، و چشم تأثیر گذارد (۲). نوروپاتی دیابتی (Diabetic neuropathy: DN) یک ویژگی پیچیده کلاسیک است که توسعه آن در یک فرد ناشی از مشارکت ژن‌های متعدد است که بیان آن‌ها می‌تواند توسط عوامل محیطی دستخوش تغییراتی گردد (۳). DN یکی از جدی‌ترین و شایع‌ترین عوارضی است که می‌تواند منجر به مرگ در بیماران دیابتی شود و همچنین یکی از عوامل اصلی در بروز مرحله نهایی بیماری کلیوی (End-stage renal disease) است (۴). از مشخصه اصلی DN تجمع پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، فعال شدن میوفیبروبلاست‌ها و فیروزه شدن توبول‌های بینایی است. آلبومینوری به‌طور گسترده‌ای به عنوان نشانگر زیستی برای DN استفاده می‌شود، با این حال مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این مارکر به اندازه کافی برای تشخیص بیماری DN دقیق نیست و همانند GFR (Glomerular filtration rate) اندازه‌گیری آلبومین ۲۴ ساعته فرآیندی زمان‌بر است. دفع آلبومین ادراری همچنین ممکن است به دلایلی غیر از بیماری کلیوی دیابتی، مانند فعالیت بدنی، عفونت، تب، هیپرگلیسمی قابل توجه، قاعدگی و فشار خون بالا افزایش یابد (۵). بنابراین نیازمند بومارکرهای دقیق‌تری هست که در تشخیص اولیه و مدیریت این بیماری کمک کننده باشد (۶).

مولکول RNA غیرکدکننده طویل (long non-coding RNA: lncRNA) گروهی از مولکول‌های غیرکدکننده هستند که طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند که نقش بسیار مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد بازی می‌کنند (۷، ۸). مطالعات زیادی اخیراً در مورد نقش lncRNA‌ها در پاتوژنز DN انجام شده است (۹-۱۱).

LncRNA plasmacytoma variant (PVT1) translocation 1 مولکولی با ۱۷۱۶ نوکلئوتید که در ناحیه کروموزومی 8q24.21 قرار دارد. PVT1 در سلول‌های پودوسیتی اولیه موش‌های مبتلا به DN و نیز سلول‌های پودوسیتی کشت داده شده در محیط high-glucose (HG) افزایش می‌یابد. علاوه بر این مشخص گردید که مهار PVT1 که با افزایش FOXA1 همراه است می‌تواند از آپوپتوز سلول‌های پودوسیتی در DN جلوگیری کند (۱۲). intergenic RNA (HOTAIR) یک lncRNA با طول ۲/۲ کیلو باز که از رشته آنتی سنس ژن HOX C رونویسی می‌شود و از طریق تنظیم‌کننده‌های اپی ژنتیکی نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کند (۱۳). مطالعات که اخیراً انجام شده نشان داده است که این lncRNA توسط پودوسیت‌های گلومرولی هم در انسان و هم در موش بیان می‌شود و بیان آن در مدل‌های موشی DKD و نیز سلول‌های پودوسیتی بیماران مبتلا به DN افزایش می‌یابد (۱۴). همچنین در مطالعه دیگر مشخص گردید که lncRNA HOTAIR با مهار اکسیداتیو استرس و تغییر مسیرهای اپی ژنتیکی نقش بسیار مهمی در پاتوژنز رتینوپاتی دیابتی ایفا می‌کند و می‌تواند برای اهداف تشخیصی و درمانی استفاده شود (۱۵). این مطالعات نشان می‌دهند که lncRNA PVT1 و lncRNA HOTAIR نقش بسیار مهمی در پاتوژنز T2DM و عوارض میکروواسکولار آن نظیر DN ایفا می‌کنند و می‌توان از آن‌ها برای تشخیص اولیه و پایش این بیماری استفاده کرد.

مطالعات اخیر نشان داده است که lncRNA‌ها پایداری بالایی در مایعات مختلف بدن از جمله خون دارند. علاوه بر این، بد تنظیمی lncRNA در بافت‌های مختلف بدن در بیماری‌های مخلف به وضوح در مایعات مختلف بدن، از جمله خون کامل، پلاسما، ادرار، بزاق و آب معده منعکس می‌شود (۱۶، ۱۷). هم‌چنین مطالعه متآنالیزی که اخیراً انجام شده مشخص گردید که lncRNA‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی

رضایت آگاهانه از همه افراد قبل از شرکت در مطالعه اخذ شد.

#### ارزیابی های آزمایشگاهی

در این مطالعه از هر فرد شرکت کننده ۱۰ میلی لیتر خون پس از ناشتا بودن به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت (فقط مجاز به مصرف آب بودن) تحت شرایط استریل در آزمایشگاه تشخیصی مرکز پزشکی شهید لبافی نژاد گرفته شد. نمونه ها به صورت تکی جمع آوری و مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه های خون پس از لخته شدن در دمای اتاق به مدت تقریباً یک ساعت، با استفاده از سانتریفیوژ Sigma در سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سرم جدا شود و سپس سرم ها رو به منظور انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. در هر چهار گروه سطح گلوکز خون، HbA1c، پروفایل لیپیدی و کراتینین با استفاده از کیت پارس آزمون اندازه گیری شد.

#### کشت سلول و تیمار با گلوکز بالا

سلول های انسانی HEK293 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شدند. این سلول ها ابتدا در محیط DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA; ) Dulbecco's Modified Eagle's (Cat. No. 11965092 FBS; ) Medium حاوی ۱۰ درصد (v/v) سرم جنین گاوی (FBS; Gibco; Cat. No. 16000044)، پنی سیلین (100 U/ml) و استرپتومایسین (100 µg/ml) کشت داده شدند. سلول ها در انکوباتور با دمای ۳۷ °C، غلظت ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت نسبی ۹۵ درصد نگهداری شدند. در مرحله تیمار، سلول های HEK293 پس از سه پاساژ متوالی و رسیدن به ۸۰-۷۰ درصد تراکم، به محیط (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA; Cat. No. 11875093 RPMI 1640) منتقل شدند. این محیط دارای دو نوع غلظت گلوکز، گلوکز نرمال (5/5 mM) و گلوکز بالا (100 mM) بود که برای مقایسه اثرات تغییر غلظت

بالقوه برای T2DM و عوارض آن نظیر DN مورد استفاده قرار گیرند (۱۸). بنابراین مولکول های lncRNA موجود در خون کامل و سرم از مولکول های جدید در تشخیص مولکولی است که امکان غربالگری بیماری های متعدد و پایش آن ها را دهد. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان lncRNA HOTAIR و lncRNA PVT1 در ارتباط با T2DM و DN است تا درک از نقش این lncRNA ها در پاتوژنز DN ارتقا دهد.

#### مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، در مجموع ۲۰۰ فرد شامل ۵۰ مورد مبتلا به DN، ۵۰ مورد مبتلا به T2DM، ۵۰ مورد pre-diabetes و ۵۰ فرد سالم با همسان سازی بر اساس سن (۵۵ تا ۷۰ سال) و جنس (میزان مرد/زن مشابه در هر گروه) انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه به صورت تصادفی از مرکز پزشکی شهید لبافی نژاد در تهران، ایران، در بازه زمانی ۱۴۰۳ تا ۱۴۰۴ انتخاب شدند. معیار ورود به مطالعه شامل افرادی است که توسط پزشک فوق تخصص غدد، بر اساس معیارهای تشخیصی انجمن دیابت آمریکا (ADA)، مبتلا به T2DM تشخیص داده شده باشند. هم چنین از میان افراد دیابتی، وجود افزایش دفع آلبومین ادرار، آلبومین ادرار بیش از ۳۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت و یا آلبومین / کراتینین بیش از 30 mg / gr در نمونه های تصادفی ادرار، در دو یا چند نمونه پیوسته ادرار به عنوان بیمار DN در نظر گرفته شد. هم چنین معیارهای خروج از مطالعه شامل افراد کم تر از ۳۰ سال یا بالاتر از ۷۵ سال، بیماران با بیماری قلبی عروقی، نارسایی شدید کبدی، عفونت های دستگاه ادراری، بارداری یا التهاب مزمن، بیماران دیابتی با سایر علل تایید شده گلو مریلوی پاتی، مانند گلو مریلوی نفروت غشایی (MGN)، نفروپاتی غشایی (MN)، و نفروپاتی IgM بود. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (IR.SBMU.MSP.REC.1403.378) تایید شد.

گلوکز بر بیان ژن انتخاب شدند، زیرا این سطوح نمایانگر شرایط فیزیولوژیک و هاپیرگلاسمی هستند. سلول‌ها در هر شرایط به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. محیط کشت هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض شد تا از تجمع متابولیت‌ها جلوگیری شود. در پایان تیمار، سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA (۰/۲۵ درصد) جدا شده و با PBS سرد شسته شدند. سپس سلول‌ها برداشت شده و برای استخراج RNA و بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند.

#### استخراج RNA و اندازه‌گیری IncRNA های مورد مطالعه

از کیت ویراژن برای استخراج RNA از خون کامل افراد مورد مطالعه استفاده شد (Viragen, Iran, Cat No; VB-4050). برای ارزیابی کمی RNA حاصل از استخراج هر نمونه، از دستگاه نانودراپ (Bio-RAD550, usA) استفاده شده است که میزان جذب نمونه در طول موج ۲۶۰nm، غلظت RNA نمونه‌ها را مشخص می‌کند. هم‌چنین برای تعیین میزان خلوص RNA و وجود آلودگی DNA، نسبت A260/A280 هر نمونه محاسبه شد که نمونه خالص RNA، عددی بین ۱/۸-۲ را نشان می‌دهد. هم‌چنین برای ارزیابی کیفی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز با آگاروز ۲ درصد استفاده شد. برای استخراج RNA از سلول‌های HEK-293، از معرف <sup>TM</sup>TRIzol (Genexco، ایران) طبق پروتکل توصیه شده استفاده گردید. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت ویراژن طبق پروتکل انجام شد، که در آن از ۱ میکروگرم RNA به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت (Viragen, Iran, Cat No; VB-5050). سپس از تکنیک qRT-PCR برای سنجش بیان ژن‌های IncRNA *PVT1* و IncRNA *HOTAIR* استفاده شد. به منظور طراحی پرایمرها ابتدا توالی RNA از سایت <http://www.NCBI.org> استخراج شد، سپس به روش ذکر شده در Gene runner نواحی مورد نظر برای ژن‌های هدف طراحی گردید و در نهایت در

سایت BLAST نواحی به طور اختصاصی تایید گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول شماره ۱، آمده است. در این مطالعه از ژن  $\beta 2M$  به دلیل پایداری بیان آن در شرایط مورد مطالعه به عنوان ژن کنترل برای نرمالیزاسیون استفاده شد (۱۹). تمامی آزمایشات به صورت دو بار تکرار با استفاده از مستر میکس آمپلیکون بر روی سیستم StepOnePlus انجام شد.

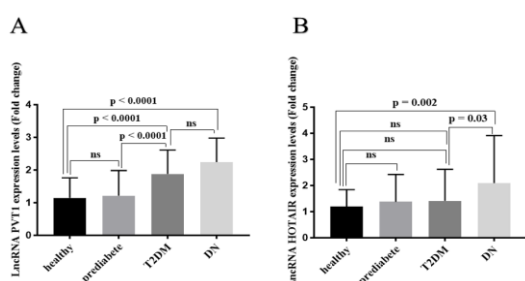
جدول شماره ۱: توالی اولیگونوکلوئیدی پرایمرهای مورد استفاده

| Gene name            | Sequence 5'-3'                                                    |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| IncRNA <i>HOTAIR</i> | Forward: TTCCACAGACCAACACCCC<br>Reverse: CACTCCCCACTCCCTACT       |
| IncRNA <i>PVT1</i>   | Forward: GTTCAAGTATTTCTGAGCCTG<br>Reverse: ATCTCAACCTCTCAGCCA     |
| $\beta 2M$           | Forward: TGTCTTTTCAGCAAGGACTGGT<br>Reverse: TGCTTACATGTCTCGATCCCA |

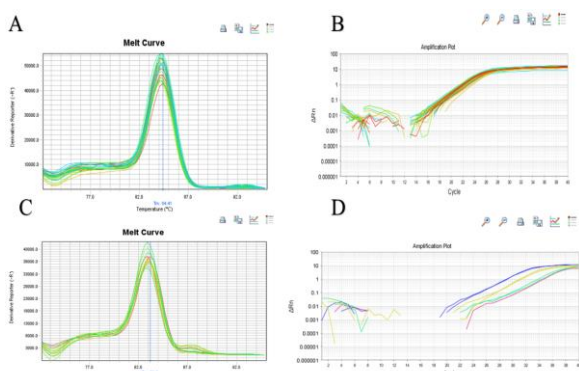
#### آنالیزهای آماری

در این مطالعه تمامی داده‌ها به صورت نرمال توزیع شده‌اند و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. از one-way analysis of variance (ANOVA) و به دنبال آن آزمون Tukey برای آنالیز آماری استفاده شد. گروه‌های مورد مقایسه در این مطالعه شامل گروه کنترل سالم (n=۵۰) گروه pre-diabetes (n=۵۰)، گروه T2DM (n=۵۰) و گروه DN (n=۵۰) بودند. هم‌چنین از متد لیواک ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) برای محاسبه نسبی بیان ژن‌های مورد هدف یعنی IncRNA *HOTAIR* و *PVT1* استفاده شد. در این روش، مقدار Ct هر ژن هدف نسبت به ژن مرجع ( $\beta 2M$ ) نرمال‌سازی گردید و بیان نسبی به صورت تغییر بیان (fold change) در مقایسه با گروه کنترل اندازه‌گیری شد. از منحنی راک (receiver operating characteristic) و سطح زیر نمودار ROC (AUC) برای ارزیابی امکان استفاده از IncRNA های مورد مطالعه به عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص زودرس DN استفاده شد. برای تعیین نقاط بهینه cut-off از Youden index استفاده شد (حداکثر مقدار

pre-diabetes با مقایسه  $(2/244 \pm 1/7349)$  در مقایسه با pre-diabetes  $(P < 0/0001)$  و گروه کنترل  $(P < 0/0001)$  به میزان معنی داری افزایش می یابد، اما تغییر معنی داری با گروه T2DM نشان نمی دهد  $(P = 0/056)$  (تصویر شماره ۱، A). هم چنین، میزان بیان، هیچ گونه تفاوت معنی داری بین گروه های کنترل و pre-diabetes نشان نمی دهد  $(P = 0/96)$  (تصویر شماره 1، A). هم چنین تمام منحنی ذوب ژن lncRNA PVT1 حاوی پیک های منفرد بودند که نشان دهنده اختصاصیت محصولات PCR است (تصویر شماره 2، A و تصویر شماره 2، B).



تصویر شماره ۱: میزان بیان lncRNA HOTAIR و lncRNA PVT1 در بین چهار گروه مورد مطالعه، افراد سالم، افراد pre-diabetes، افراد T2DM و بیماران مبتلا به DN، سطح بیان با استفاده از qRT-PCR اندازه گیری شد، داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه می شوند و تعداد نمونه ها در هر گروه ۵۰ نفر است. تفاوت معنی داری بین گروه ها نشان داده شده است  $(P < 0/05)$ .



تصویر شماره ۲: منحنی ذوب و تکثیر ژن های lncRNA PVT1 (A) و lncRNA HOTAIR (B و C) و تصاویر A و B به ترتیب منحنی های ذوب و تکثیر lncRNA PVT1 را نشان می دهد و تصاویر C و D به ترتیب منحنی ذوب و تکثیر lncRNA HOTAIR را نشان می دهد.

(sensitivity + specificity). آنالیز ROC به صورت دو به دو بین گروه ها، DN در مقابل گروه کنترل سالم، DN در مقابل pre-diabetes و DN در مقابل T2DM انجام شد. تعداد نمونه ها در هر گروه ۵۰ نفر تعیین گردید. مقدار p-value کم تر از 0/05 از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. در نهایت از نرم افزار (GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA) برای تحلیل های آماری استفاده شد.

## یافته ها

مشخصات دموگرافیک و بالینی شرکت کنندگان در مطالعه این مطالعه مقطعی شامل ۲۰۰ شرکت کننده، شامل ۵۰ فرد مبتلا به DN، ۵۰ فرد مبتلا به T2DM، ۵۰ فرد مبتلا به pre-diabetes و ۵۰ فرد سالم همسان با سن و جنس بود. جدول شماره ۲، به ویژگی های بالینی شرکت کنندگان در مطالعه را ارائه می دهد.

جدول شماره ۲: اطلاعات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه

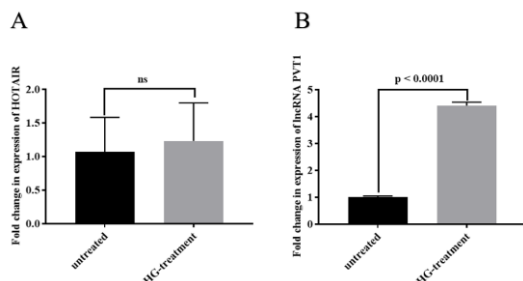
| متغیر                | گروه کنترل (نفر ۵۰) | گروه پره دیابتی (نفر ۵۰) | گروه دیابت نوع دو (نفر ۵۰) | گروه غروبیاتی (نفر ۵۰) | سطح معنی داری |
|----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|---------------|
| سن (سال)             | $64/32 \pm 3/59$    | $63/62 \pm 3/85$         | $63/42 \pm 4/47$           | $62/08 \pm 5/04$       | $P < 0/05$    |
| جنسیت (مرد / زن)     | $52/48 \pm 26/24$   | $56/44 \pm 28/22$        | $48/52 \pm 24/26$          | $52/48 \pm 26/24$      | —             |
| فشارخون (mmHg)       | $86/66 \pm 7/59$    | $112/4 \pm 8/16$         | $155/5 \pm 14/61$          | $208 \pm 14/33$        | $P < 0/05$    |
| هموگلوبین A1c (درصد) | $4/8 \pm 0/27$      | $6/4 \pm 0/2$            | $8/7 \pm 0/16$             | $8/5 \pm 0/22$         | $P < 0/05$    |
| کلسیم (mg/dL)        | $156/7 \pm 26/22$   | $169/6 \pm 22/07$        | $180/2 \pm 31/57$          | $198/6 \pm 29/37$      | $P < 0/05$    |
| کراتینین (mg/dL)     | $0/82 \pm 0/16$     | $0/84 \pm 0/06$          | $0/97 \pm 0/05$            | $1/8 \pm 0/21$         | $P < 0/05$    |

اطلاعات به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  نشان داده شده اند.

بیان نسبی lncRNA PVT1 در بیماران DN، T2DM، pre-diabetes و افراد سالم

در مقایسه با گروه کنترل (بیان نسبی =  $0/6125 \pm 0/7296$ ) افراد مبتلا به T2DM (بیان نسبی =  $0/7296 \pm 0/881$ ) میزان افزایش یافته ای از lncRNA PVT1 را نشان دادند  $(P < 0/0001)$  (تصویر شماره 1، A). علاوه بر این، در این مطالعه مشخص گردید که میزان بیان lncRNA PVT1 در افراد مبتلا به DN (بیان نسبی =

گلوکز طبیعی دیده نشد ( $1/073 \pm 0/509$ ) ( $P < 0/05$ ) (تصویر شماره 3، A).



تصویر شماره 3: میزان بیان *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* در سلول های HEK-293 تیمار شده با گلوکز بالا و گلوکز طبیعی، سطح بیان با استفاده از qRT-PCR اندازه گیری شد، داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه می شوند، تفاوت معنی داری بین گروه ها نشان داده شده است ( $P < 0/05$ ).

بیان نسبی *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* در تشخیص زودرس DN

در مطالعه حاضر به منظور بررسی ویژگی تشخیصی *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* در تشخیص زودرس DN از آنالیز راک استفاده شد (تصویر شماره 4). برای هر یک از این *lncRNA* ها، منحنی ROC رسم گردید و مقادیر AUC (مساحت زیر منحنی)، حساسیت و ویژگی محاسبه شدند. نتایج نشان داد که بیان نسبی *lncRNA PVT1* دارای AUC برابر با  $0/8748$  در تمایز DN از گروه سالم بود که نشان دهنده قابلیت تشخیص مناسب در تفکیک بیماران مبتلا به DN از گروه سالم می باشد (تصویر شماره 4، D). در مقابل بیان نسبی *lncRNA HOTAIR* پتانسیل بالایی برای تمایز DN از گروه سالم نشان نداد. این نتایج نشان می دهد که بیان نسبی *lncRNA PVT1* می تواند به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تشخیص زودرس DN مورد استفاده قرار گیرد (جدول شماره 3).

بیان نسبی *lncRNA HOTAIR* در بیماران DN، *T2DM*، *pre-diabetes* و افراد سالم

در مقایسه با گروه کنترل (بیان نسبی =  $0/6477 \pm$ )  $1/195$  تغییر معنی داری در گروه های *pre-diabetes* (بیان نسبی =  $1/378 \pm 0/043$ )، *T2DM* (بیان نسبی =  $1/414 \pm 0/209$ ) مشاهده نگردید (تصویر شماره 1، B). اما در مطالعه حاضر مشاهده گردید که میزان بیان *lncRNA HOTAIR* در گروه DN (بیان نسبی =  $1/82 \pm$ )  $2/096$  در مقایسه با *T2DM* ( $P = 0/03$ )، *pre-diabetes* ( $P = 0/02$ ) و سالم ( $P = 0/002$ ) به میزان معنی داری افزایش می یابد (تصویر شماره 1، B). هم چنین تمام منحنی ذوب ژن *lncRNA HOTAIR* حاوی پیک های منفرد بودند که نشان دهنده اختصاصیت محصولات PCR است (تصویر شماره 2، C و تصویر شماره 2، D).

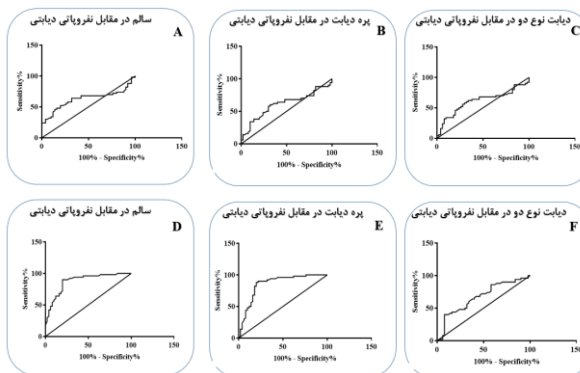
بیان نسبی *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* در سلول های HEK-293 تیمار شده با گلوکز بالا و گلوکز طبیعی

در این مطالعه سلول های HEK-293 را کشت داده و سپس به دو گروه تیمار شده با گلوکز بالا ( $100\text{mmol/L glucose}$ ) و تیمار شده با گلوکز طبیعی ( $5\text{mmol/L glucose}$ ) تقسیم بندی شد. بعد از ۷۲ ساعت تیمار با گلوکز، از سلول های هدف RNA استخراج شد و در نهایت از آنالیزهای qRT-PCR برای بررسی اثر گلوکز بالا بر روی میزان بیان *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* استفاده شد. در این مطالعه مشخص گردید که میزان بیان *lncRNA PVT1* به میزان قابل ملاحظه ای در سلول های تیمار شده با گلوکز بالا ( $4/409 \pm 0/126$ ) در مقایسه با سلول های تیمار شده با گلوکز طبیعی ( $1/001 \pm 0/051$ ) افزایش می یابد ( $P < 0/0001$ ) (تصویر شماره 3، B). در مقابل، در این مطالعه تغییرات معنی داری در میزان بیان *lncRNA HOTAIR* در بین سلول های تیمار شده با گلوکز بالا ( $1/233 \pm 0/564$ ) و سلول های تیمار شده با

استفاده در تمام بیماران را ندارد (۲۱). بنابراین، جستجو برای بیومارکرهای سرمی سریع و موثر برای پیش‌بینی زود هنگام خطر DM و DN برای برخی از بیمارانی که برای پیوستن کلیه مناسب نیستند، ضروری است. در نتیجه یافتن بیومارکرهای غیر تهاجمی که می‌توانند مرحله اولیه DN را برای راهنمایی تشخیص و درمان بالینی شناسایی کنند، اهمیت زیادی دارد. مطالعات سال‌های گذشته نشان داده است که بسیاری از lncRNA ها با DN همراهی نزدیکی دارند. بنابراین در این مطالعه به بررسی بیان lncRNA HOTAIR و PVT1 در افراد مبتلا به DN، مبتلایان به T2DM، pre-diabetes و گروه سالم به منظور استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی در شناسایی اولیه DN پرداخته شد.

ژن PVT1، یک RNA طولانی غیر کد کننده (lncRNA) است که در فرآیندهای پاتولوژیک مختلف، به ویژه در سرطان و آسیب سلولی نقش دارد (۲۲، ۲۳). این lncRNA به عنوان یک عامل کلیدی در پیشرفت DN ظاهر شده است و افزایش بیان آن در بیماران دیابتی، به ویژه آن‌هایی که نسبت آلبومین/کراتینین ادراری بالایی دارند، مرتبط بوده است، که نشان‌دهنده پتانسیل آن به عنوان یک بیومارکر اولیه برای پیشرفت DN است (۱۲). در این مطالعه نیز به نتایج مشابهی با نتایج مطالعات گذشته داشته است و مشاهده گردید که میزان بیان PVT1 در بیماران DN و T2DM نسبت به گروه pre-diabetes و سالم افزایش یافت، اما تفاوت معنی‌داری بین بیماران DN و T2DM مشاهده نشد ( $P=0/056$ ). این موضوع نشان می‌دهد که PVT1 ممکن است در مراحل اولیه دیابت نقش مهمی داشته باشد، اما در مراحل پیشرفته‌تر به یک سطح ثابت برسد.

یکی دیگر از lncRNA هایی که در این مطالعه بررسی شد، HOTAIR (HOXtranscript antisense RNA) یک RNA طولانی غیر کد کننده (lncRNA) است که نقش مهمی در بیماری‌های غیر واگیر نظیر سرطان و دیابت



تصویر شماره ۴: منحنی راک که عملکرد تشخیصی lncRNA HOTAIR (A, B, C) و lncRNA PVT1 (D, E, F) را در متمایز کردن بیماران مبتلا به DN از T2DM، pre-diabetes و سالم را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۳: آنالیز منحنی راک برای lncRNA PVT1 و lncRNA HOTAIR در تشخیص زودرس DN از T2DM، pre-diabetes و افراد سالم

| Target gene       | ROC statics               |               | Cut off | Sensitivity (درصد) | Specificity (درصد) |
|-------------------|---------------------------|---------------|---------|--------------------|--------------------|
|                   | AUC (95% CI)              | سطح معنی داری |         |                    |                    |
| Normal vs DN      |                           |               |         |                    |                    |
| lncRNA HOTAIR     | 0/6288 (0/5133 to 0/7443) | 0/0264        | >0/256  | 64                 | 68                 |
| lncRNA PVT1       | 0/8748 (0/8055 to 0/9441) | <0/0001       | >0/457  | 90                 | 80                 |
| Prediabetes vs DN |                           |               |         |                    |                    |
| lncRNA HOTAIR     | 0/6086 (0/4952 to 0/7221) | 0/013         | >1/453  | 60                 | 68                 |
| lncRNA PVT1       | 0/8544 (0/7762 to 0/9326) | <0/0001       | >0/508  | 88                 | 80                 |
| T2DM vs DN        |                           |               |         |                    |                    |
| lncRNA HOTAIR     | 0/6104 (0/4962 to 0/7246) | 0/021         | >1/375  | 62                 | 66                 |
| lncRNA PVT1       | 0/6708 (0/564 to 0/7776)  | 0/0032        | >1/831  | 66                 | 60                 |

## بحث

عوارض میکروواسکولار نظیر DN در بین بیماران مبتلا به دیابت نوع یک و دو شیوع بالایی دارد، که این نشان می‌دهد هایلر گلاسمی نقش بسیار مهمی در پاتوژنز DN بازی می‌کند (۲۰). یکی از ابزارهای مورد استفاده برای بررسی آسیب‌های کلیوی در DN، آنالیز هیستولوژیکی نمونه‌های بافتی است. به همین دلیل پیوسته کلیه یکی از روش‌های رایج برای تشخیص و نیز دسته بندی آسیب‌های کلیوی در DN مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال این روش با خطر قابل توجه خونریزی یا تشکیل فیستول شریانی وریدی همراه است و قابلیت

ایفا می‌کند (۲۶-۲۴). تحقیقات نشان می‌دهد که *HOTAIR* در پاسخ به سطوح بالای گلوکز تنظیم می‌شود که منجر به اثرات مضر روی سلول‌های لوله‌ای کلیوی و مزانژیال می‌شود. *HOTAIR* با اسپونج کردن miR-126-5p (sponge) باعث مهار miR-126-5p می‌شود. هم‌چنین مشخص شده است که miR-126-5p با مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt نقش کلیدی در پیشرفت DN بازی می‌کند. بنابراین، *HOTAIR* با مهار miR-126-5p باعث فعالسازی مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt می‌گردد و بدین‌صورت به عنوان مولکول پیش-آپتوزی عمل کرده و در شرایط هیپرگلیسمی آسیب سلولی را در سلول‌های اپیتلیال لوله‌های کلیوی تشدید می‌کند (۱، ۲۷). یکی دیگر از مسیرهایی که *HOTAIR* می‌تواند در پاتوژنز DN شرکت کند، miR-147a است. مشخص شده است که *HOTAIR* با مهار miR-147a باعث فعالسازی ژن هدف miR-147a یعنی *WNT2B* می‌گردد، که همراه با اکسیداتیو استرس و پیشرفت DN است (۲۸). از این رو *HOTAIR* از عناصر کلیدی در DN است. در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید که میزان بیان *HOTAIR* در بیماران DN در مقایسه با بیماران مبتلا به T2DM، pre-diabetes و گروه سالم به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد. هرچند در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معنی‌داری در گروه‌های pre-diabetes، T2DM مشاهده نگردید. این نتایج نشان می‌دهد که *HOTAIR* عمدتاً در مراحل نهایی DN نقش دارد.

علاوه بر این، در این مطالعه به منظور شبیه‌سازی شرایط DN در محیط آزمایشگاهی، سلول‌های HEK-293 به مدت ۷۲ ساعت با گلوکز بالا تیمار شدند و سپس میزان بیان *HOTAIR* و *PVT1* در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت، که یافته‌های آن می‌تواند به درک بهتر نقش این دو *lncRNA* در پاتوژنز DN کمک کند. یافته‌های مطالعه نشان داد که میزان بیان *lncRNA PVT1* در شرایط گلوکز بالا به میزان قابل

توجهی نسبت به گلوکز طبیعی افزایش می‌یابد. برخلاف *lncRNA PVT1*، بیان *HOTAIR* در تیمار سلولی با گلوکز تغییر معنی‌داری نشان نداد. در نتیجه در مقایسه با *lncRNA PVT1*، *HOTAIR* به تغییرات گلوکز حساس‌تر است و احتمالاً نقش مستقیم‌تری در بروز آسیب‌های کلیوی در DN ایفا می‌کند.

علاوه بر این در این مطالعه به بررسی ویژگی‌های بیومارکری *HOTAIR* و *PVT1* در شناسایی بیماری DN پرداخته شد و نشان داده شد که *lncRNA PVT1* از حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به *HOTAIR* در شناسایی افراد مبتلا به DN از افراد سالم (حساسیت: ۹۰ درصد، اختصاصیت: ۸۸ درصد) و افراد pre-diabetes (حساسیت: ۸۰ درصد، اختصاصیت: ۸۰ درصد) دارد. از این رو می‌توان از *PVT1* در تشخیص زودرس DN استفاده کرد.

هر پژوهشی، با وجود یافته‌های ارزشمند خود، دارای محدودیت‌هایی است که می‌تواند بر تفسیر نتایج و تعمیم‌پذیری آن‌ها تأثیر بگذارد. از لحاظ تکنیکی، در حالی که روش Real-Time qPCR دقت بالایی دارد، اما ممکن است تحت تأثیر خطاهای استخراج RNA، کیفیت پرایمرها و نرمال‌سازی داده‌ها قرار گیرد. روش‌هایی مانند RNA-Seq یا microarray می‌توانند طیف گسترده‌تری از تغییرات مولکولی را بررسی کرده و دیدگاه دقیق‌تری ارائه دهند. یکی دیگر از چالش‌های این تحقیق، استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی محدود است. داده‌های مولکولی از نمونه‌های انسانی و رده سلولی HEK293 استخراج شده‌اند که اگر چه اطلاعات ارزشمندی ارائه می‌دهند، اما کاملاً منعکس‌کننده شرایط فیزیولوژیک کلیه در بیماران دیابتی نیستند. استفاده از مدل‌های حیوانی و مطالعات *in vivo* می‌تواند تأیید بیش‌تری بر یافته‌های این تحقیق فراهم کند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، انجام آزمایش‌هایی مانند مهار بیان ژن (siRNA، CRISPR-Cas9) یا بیش‌بیان (Overexpression) برای

بررسی ویژگی های بیومارکری نیز حاکی از حساسیت و اختصاصیت بالای *PVT1* نسبت به *lncRNA HOTAIR* در تمایز بیماران مبتلا به DN از افراد سالم و pre-diabetes است.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت ها و همکاری های ارزشمند تمامی افرادی که در انجام این پژوهش مشارکت داشتند، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

تعیین نقش دقیق *HOTAIR* و *PVT1* در تنظیم مسیرهای آپوپتوزی در سلول های کلیوی مورد مطالعه قرار گیرد، که می تواند دیدگاه جامع تری از نقش این *lncRNA* ها در DN ایجاد کند.

یافته های این مطالعه نشان داد که *lncRNA HOTAIR* و *lncRNA PVT1* می توانند در پاتوژنز و پیشرفت DN نقش داشته باشند. در حالی که بیان *HOTAIR* عمدتاً در مراحل پیشرفته بیماری افزایش می یابد، *PVT1* در مراحل اولیه دیابت نیز افزایش یافته و به تغییرات گلاسیسمی حساس تر است. علاوه بر این

## References

- Ahlqvist E, Van Zuydam NR, Groop LC, McCarthy MI. The genetics of diabetic complications. *Nature Reviews Nephrology* 2015; 11(5): 277. PMID: 41189469.
- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 2013; 93(1): 137-88. PMID: 41208460.
- Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World journal of diabetes* 2014; 5(6): 809. PMID: 41111589.
- Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 2017; 12(12): 2032-45. PMID: 28522654.
- Lin C-H, Chang Y-C, Chuang L-M. Early detection of diabetic kidney disease: Present limitations and future perspectives. *World journal of diabetes* 2016; 7(14): 290. PMID: 27525056.
- Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. *Nature reviews Disease primers* 2015; 1(1): 1-20. PMID: 41220025
- Wang Y, Sun X. The functions of LncRNA in the heart. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2020; 168: 108249. PMID: 41161640.
- Wang J, Su Z, Lu S, Fu W, Liu Z, Jiang X, et al. LncRNA HOXA-AS2 and its molecular mechanisms in human cancer. *Clinica chimica acta* 2018; 485: 229-33. PMID: 31235746.
- Yang Y, Lv X, Fan Q, Wang X, Xu L, Lu X, et al. Analysis of circulating lncRNA expression profiles in patients with diabetes mellitus and diabetic nephropathy: Differential expression profile of circulating lncRNA. *Clinical Nephrology* 2019; 92(1): 25. PMID: 31079598.
- Li Y, Xu K, Xu K, Chen S, Cao Y, Zhan H. Roles of identified long noncoding RNA in diabetic nephropathy. *Journal of diabetes research* 2019; 2019(1): 5383010. PMID: 39069497.
- Wang J, Pan J, Li H, Long J, Fang F, Chen J, et al. lncRNA ZEB1-AS1 was suppressed by p53 for renal fibrosis in diabetic nephropathy. *Molecular therapy Nucleic acids* 2018; 12: 741-50. PMID: 30121551

12. Liu D-W, Zhang J-H, Liu F-X, Wang X-T, Pan S-K, Jiang D-K, et al. Silencing of long noncoding RNA PVT1 inhibits podocyte damage and apoptosis in diabetic nephropathy by upregulating FOXA1. *Experimental & molecular medicine* 2019; 51(8): 1-15. PMID: 31371698.
13. Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2015; 1856(1): 151-64. PMID: 26208723
14. Majumder S, Hadden MJ, Thieme K, Batchu SN, Niveditha D, Chowdhury S, et al. Dysregulated expression but redundant function of the long non-coding RNA HOTAIR in diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2019; 62(11): 2129-42.
15. Biswas S, Feng B, Chen S, Liu J, Aref-Eshghi E, Gonder J, et al. The long non-coding RNA HOTAIR is a critical epigenetic mediator of angiogenesis in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2021; 62(3): 20-.
16. Qi P, Zhou X-y, Du X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Molecular cancer* 2016; 15(1): 39. PMID: 27189224.
17. Helsmoortel H, Everaert C, Lumen N, Ost P, Vandesompele J. Detecting long non-coding RNA biomarkers in prostate cancer liquid biopsies: Hype or hope? *Non-coding RNA Research*. 2018; 3(2): 64-74 PMID: 30159441.
18. Su X, Huang H, Lai J, Lin S, Huang Y. Long noncoding RNAs as potential diagnostic biomarkers for diabetes mellitus and complications: A systematic review and meta- analysis. *Journal of Diabetes* 2024; 16(2): e13510. PMID: 38140829.
19. Milhem C, Ingelaere C, Mordon S, Moralès O, Delhem N. Beta-2 microglobulin and ubiquitin C identified as two robust housekeeping genes for RNA expression normalization in real time PCR on human leukocytes and regulatory T cells. *Biomed J Sci & Tech Res* 2020: 24425-30.
20. Yokoyama H, Okudaira M, Otani T, Sato A, Miura J, Takaike H, et al. Higher incidence of diabetic nephropathy in type 2 than in type 1 diabetes in early-onset diabetes in Japan. *Kidney international* 2000; 58(1): 302-11. PMID: 11421227.
21. Catanese L, Rupprecht H, Huber TB, Lindenmeyer MT, Hengel FE, Amann K, et al. Non-invasive biomarkers for diagnosis, risk prediction, and therapy guidance of glomerular kidney diseases: a comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25(6): 3519. PMID: 38542491.
22. Lu D, Luo P, Wang Q, Ye Y, Wang B. lncRNA PVT1 in cancer: a review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta* 2017; 474: 1-7.
23. Wang J, Zhang Y, Lian W, Gan M. Long non-coding rna pvt1 facilitates radiation-induced vascular endothelial cell injury through sponging microrna-9-5p. *Radiation Research* 2024; 202(4): 670-6. PMID: 39142655.
24. Gao L, Wang X, Guo S, Xiao L, Liang C, Wang Z, et al. LncRNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to upregulate SIRT1 by sponging miR- 34a in diabetic cardiomyopathy.

- Journal of Cellular Physiology 2019; 234(4): 4944-58. PMID: 30216438.
25. You H, Li H, Gou W. lncRNA HOTAIR promotes ROS generation and NLRP3 inflammasome activation by inhibiting Nrf2 in diabetic retinopathy. *Medicine* 2023; 102(37): e35155. PMID: 37713847.
  26. Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, Shan B. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer. *Journal of hematology & oncology* 2014; 7(1): 90. PMID: 39725668.
  27. Jiang Q, Yang T, Zou Y, He M, Li Q, Chen X, et al. LncRNA HOX transcript antisense RNA mediates hyperglycemic- induced injury in the renal tubular epithelial cell via the miR- 126- 5pAkt axis. *Aging Medicine* 2023; 6(4): 427-34. PMID: 38239710.
  28. Wang X, Wang W, HuangFu W, Liu Z, Zhao F. LncRNA HOTAIR facilitates high glucose-induced mesangial cell proliferation, fibrosis and oxidative stress in diabetic nephropathy via regulating miR-147a/WNT2B axis. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2022; 14(1): 33. PMID: 35193668.