

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanja Z. Vujčić

**ISPITIVANJE STEPENA GLOBALNE  
METILACIJE DNK KOD BOLESNIKA SA  
TIPOM 2 DIJABETES MELITUSA:  
POVEZANOST SA BIOMARKERIMA  
OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMACIJE I  
DISLIPIDEMIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026



UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanja Z. Vujčić

**ISPITIVANJE STEPENA GLOBALNE  
METILACIJE DNK KOD BOLESNIKA SA  
TIPOM 2 DIJABETES MELITUSA:  
POVEZANOST SA BIOMARKERIMA  
OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMACIJE I  
DISLIPIDEMIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026



UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Sanja Z. Vujcic

**EXAMINATION OF GLOBAL DNA  
METHYLATION LEVELS IN PATIENTS WITH  
TYPE 2 DIABETES MELLITUS: ASSOCIATION  
WITH BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS,  
INFLAMMATION, AND DYSLIPIDEMIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026



**Mentori:**

---

**Dr sc. Jelena Vekić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Dr sc. Miljanka Vuksanović, docent**  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

**Članovi komisije**

---

**Dr sc. Aleksandra Zeljković, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Dr sc. Ana Ninić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Dr sc. Iva Perović Blagojević, naučni saradnik**  
KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_



## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, pod mentorstvom prof. dr Jelene Vekić i doc. dr Miljanke Vuksanović.*

*Uzorci i podaci potrebni za izradu doktorske disertacije prikupljeni su u saradnji sa Kliničko-bolničkim centrom „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ i Kliničko-bolničkim centrom „Zvezdara“ u Beogradu i Opštom bolnicom u Požarevcu.*

*Posebnu i najsrdajnu zahvalnost dugujem mentorki, prof. dr Jeleni Vekić. Hvala Vam na neiscrpnom strpljenju, savetima i viziji kojom ste usmeravali moj naučni i lični razvoj. Vaša podrška, poverenje i sugestije bili su oslonac tokom svih faza izrade ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentorki, doc. dr Miljanki Vuksanović, na profesionalnoj saradnji, podršci i doprinosu u realizaciji ovog rada.*

*Srdačnu zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Zeljković na konstruktivnim sugestijama, idejama i savetima koji su doprineli kvalitetu ovog rada. Vaša podrška i znanje bili su dragoceni.*

*Iskreno se zahvaljujem prof. dr Ani Ninić na stručnim savetima, poverenju i prijateljskom odnosu. Vaše znanje i sugestije značajno su doprineli kvalitetu ove disertacije.*

*Srdačno se zahvaljujem kolegici dr Ivi Perović Blagojević, čije je zalaganje bilo od presudnog značaja za prikupljanje kliničkih uzoraka. Hvala Vam na svim stručnim savetima i sugestijama.*

*Od srca se zahvaljujem i kolegi Mironu Sopiću, čije znanje i iskustvo su bili nezamenljivi tokom rada u laboratoriji „102“.*

*Iskreno se zahvaljujem prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević na podeljenom znanju, iskustvu i savetima tokom izrade ove disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i svim ostalim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju na kolegijalnosti i podsticajnom radnom okruženju koje su mi pružili tokom godina. Zahvalna sam vam na prijateljskom odnosu, svim savetima i uspomnama tokom godina zajedničkog rada. Posebno se zahvaljujem Azri, Mari i Sanji na pomoći oko sakupljanja uzoraka i rada u laboratoriji.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Sanji Stojanović na izuzetnoj saradnji i zajedničkom radu na Hemijskom fakultetu. Hvala ti na kolegijalnosti, vremenu i pozitivnom duhu koje si unela u eksperimentalni deo ovog rada.*

*Iskreno se zahvaljujem svim kolegama iz Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ i Opšte bolnice Požarevac na nesebičnoj saradnji bez koje sprovođenje ove studije ne bi bilo moguće. Vaša kolegijalnost je bila dragocena.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem mojoj Mileni, mojoj Radišici i mom „Konzilijumu“: Aleksandri, Anđeli, Jeleni, Milici, Tamari i Tijani. Uz vas je sve bilo mnogo lakše na svakom planu i u svakom smislu. Hvala od srca svim prijateljima na razumevanju i podršci tokom ovih godina.*

*Najdublju zahvalnost dugujem svojoj porodici. Mojim roditeljima, Miri i Zoranu: ne postoje reči dovoljno dobre da objasne vašu ljubav, podršku i razumevanje kojima dugujem sve na svetu. Mojoj sestri Nataši, jer komora ne postoji bez pretkomore: beskrajno ti hvala što si oduvek moj uzor i oslonac. Mom zetu Aleksandru: hvala ti na podršci kad je bila najpotrebnija.*

*Na kraju, najslađu i ništa manju zahvalnost dugujem mom Nemanji. Beskrajno ti hvala na svemu, jer bez tvoje ljubavi i podrške ništa ne bi bilo isto. E, sad može da se piše teza!*



## Sažetak

### **Ispitivanje stepena globalne metilacije DNK kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa: povezanost sa biomarkerima oksidativnog stresa, inflamacije i dislipidemije**

Hronične komplikacije tipa 2 dijabetes melitusa (T2DM) nastaju interakcijom oksidativnog stresa, inflamacije i dislipidemije. Globalna metilacija DNK predstavlja rani epigenetski marker ovih promena koji integriše genetske i faktore sredine, čineći molekularnu osnovu metaboličke memorije. Cilj disertacije bio je uvođenje UHPLC-DAD metode za kvantifikaciju 5-metilcitozina (5mC) u DNK izolovanoj iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, ispitivanje udela 5mC, redoks statusa, inflamacije i lipoproteinskog profila kod pacijenata sa T2DM i zdravih ispitanika, te evaluacija njihove povezanosti i utvrđivanje kardiometaboličkih faktora rizika koji utiču na nivo 5mC. U studiju preseka uključeno je 107 pacijenata sa T2DM i 56 zdravih ispitanika. Parametri su određeni standardnim i adaptiranim metodama dok je za integraciju mehanizama primenjena analiza glavnih komponenti. Kod pacijenata je utvrđen niži stepen globalne hipometilacije uz izražen redoks disbalans, proinflamatorno stanje i specifičan aterogeni lipoproteinski profil. Utvrđene su značajne korelacije između 5mC i inflamatornih, redoks i lipidnih parametara, koje su varirale zavisno od prisutne komplikacije. Potvrđeno je da je prooksidativno mikrokruženje nezavisni prediktor hipometilacije DNK, pri čemu se prooksidativno-antioksidativni balans izdvojio kao najznačajniji redoks marker. Iako globalna metilacija samostalno pokazuje ograničenu dijagnostičku tačnost u predviđanju komplikacija (izuzev kod identifikacije dijabetesnog stopala), integracija u panel sa redoks markerima poboljšava prediktivnu vrednost. Rezultati ukazuju da je globalna hipometilacija DNK rana stabilna karakteristika T2DM, primarno uslovljena sistemskim oksidativnim stresom čije određivanje doprinosi preciznijoj evaluaciji kardiometaboličkog rizika.

**Ključne reči:** stepen globalne metilacije DNK, tip 2 dijabetes melitusa, oksidativni stress, inflamacija, dislipidemija, UHPLC-DAD metoda

**Naučna oblast:** Medicinske nauke – Farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija



## Abstract

### **Examination of global DNA methylation levels in patients with type 2 diabetes mellitus: association with biomarkers of oxidative stress, inflammation, and dyslipidemia**

Chronic complications of type 2 diabetes mellitus (T2DM) arise from the interplay of oxidative stress, inflammation, and dyslipidemia. Global DNA methylation is an early epigenetic marker of these changes and the molecular basis of metabolic memory. This dissertation aimed to introduce a UHPLC-DAD method for quantifying 5-methylcytosine (5mC) in DNA from peripheral blood mononuclear cells, investigate 5mC levels, redox status, inflammation, and lipoprotein profiles in T2DM patients and healthy controls, and identify cardiometabolic factors affecting 5mC. The cross-sectional study included 107 T2DM patients and 56 healthy subjects. Parameters were determined using standard methods; principal component analysis integrated the pathophysiological mechanisms. T2DM patients exhibited significant global DNA hypomethylation, alongside a pronounced redox imbalance, a proinflammatory state, and an atherogenic lipoprotein profile. Significant correlations between 5mC and clinical parameters varied depending on the complication. A pro-oxidative microenvironment is an independent predictor of DNA hypomethylation, with prooxidant-antioxidant balance as the most significant redox marker. Although global methylation alone shows modest diagnostic accuracy (except for diabetic foot syndrome) for prediction of complications, its integration into a panel with redox markers significantly improves predictive value. The results indicate that global DNA hypomethylation is an early, stable hallmark of T2DM primarily driven by systemic oxidative stress, whose assessment contributes to a more precise cardiometabolic risk evaluation.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, global DNA methylation, oxidative stress, inflammation, dyslipidemia, UHPLC-DAD method

**Scientific field:** Medical Sciences – Pharmacy

**Specific scientific field:** Medical Biochemistry

## Lista skraćenica

**5hmC** – 5-hidroksimetilcitozin

**5mC** – 5-metilcitozin

**ABCA1** – ATP-vezujući kasetni transporter A1 (engl. *ATP-binding cassette transporter A1*)

**ABCC3** – ATP-vezujući kasetni član 3 subfamilije C (engl. *ATP-binding cassette subfamily C member 3*)

**ABI** – pedobrahijalni indeks (engl. *ankle-brachial index*)

**ACEI** – inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*)

**AGE** – krajnji produkti uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation end-products*)

**Akt** – protein kinaza B (engl. *Ak strain transforming*)

**AMPK** – AMP-aktivirana protein-kinaza (engl. *AMP-activated protein kinase*)

**ANOVA** – jednofaktorska analiza varijanse (engl. *analysis of variance*)

**AOPP** – produkti uznapredovale oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*)

**apoA-I** – apolipoprotein A-I (engl. *apolipoprotein A-I*)

**ARB** – blokatori angiotenzinskih receptora (engl. *angiotensin receptor blockers*)

**ASC** – engl. *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

**ATP** – adenzin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

**AUC** – površina ispod krive (engl. *area under the curve*)

**BAH** – engl. *bromo-adjacent homology domain*

**BER** – reparacija isecanjem baza (engl. *base excision repair*)

**bp** – bazni parovi (engl. *base pairs*)

**CD14** – diferencijacijski klaster 14 (engl. *cluster of differentiation 14*)

**ChREBP** – engl. *carbohydrate response element-binding protein*

**CETP** – holesterol estar transferni protein (engl. *cholesteryl ester transfer protein*)

**cGAMP** – ciklični guanozin-monofosfat-adenozin-monofosfat (engl. *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*)

**cGAS** – ciklična GMP-AMP sintaza (engl. *cyclic GMP-AMP synthase*)

**COL4A1** – engl. *collagen type IV alpha 1 chain*

**CpG** – citozin-fosfat-guanin (engl. *cytosine-phosphate-guanine*)

**CRD** – domen bogat cisteinom (engl. *cysteine-rich domain*)

**CXXC** – motiv cistein-X-X-cistein (engl. *cysteine-X-X-cysteine motif*)

**DAD** – detektor sa nizom dioda (engl. *diode array detector*)

**DAG** – diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*)

**DAPK3** – protein-kinaza 3 povezana sa smrću (engl. *death-associated protein kinase 3*)

**dC** – dezoksicitidin (engl. *deoxycytidine*)

**DCCT** – Studija o kontroli dijabetesa i komplikacijama (engl. *Diabetes Control and Complications Trial*)

**DMAP1** – protein 1 koji interaguje sa DNK-metiltransferazom (engl. *DNA methyltransferase-associated protein 1*)

**DN** – dijabetesna neuropatija

**DNF** – dijabetesna nefropatija

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**DNMT** – DNK metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferases*)

**DR** – dijabetesna retinopatija

**DS** – dijabetesno stopalo

**DSBH** – dvolančani beta-heliks (engl. *double-stranded beta-helix*)

**eGFR** – procenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

**EDIC** – Epidemiologija intervencija i komplikacija dijabetesa (engl. *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*)

**ELISA** – enzimski imunoadsorpcioni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**ERK** – ekstracelularno regulisana kinaza (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)

**FC** – slobodan holesterol (engl. *free cholesterol*)

**FG2** – FlexiGene 2 pufer (engl. *FlexiGene 2*)

**GADA** – antitela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase antibodies*)

**GFR** – brzina glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*)

**GLP-1** – glukagonu sličan peptid-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*)

**GLUT4** – glukozni transporter 4 (engl. *glucose transporter type 4*)

**GPx** – glutation-peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

**GRB10** – protein 10 vezan za receptor faktora rasta (engl. *growth factor receptor-bound protein 10*)

**GSTT1** – glutation S-transferaza teta 1 (engl. *glutathione S-transferase theta 1*)

**GWAS** – studije asocijacije na nivou celog genoma (engl. *genome-wide association studies*)

**H3K36me3** – trimetilacija lizina 36 na histonu H3 (engl. *trimethylation of histone H3 lysine 36*)

**HbA<sub>1c</sub>** – glikohemoglobin (engl. *glycated hemoglobin*)

**HDAC4** – histonska deacetilaza 4 (engl. *histone deacetylase 4*)

**HDL** – lipoproteini visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein*)

**HDL-h** – holesterol u lipoproteinima visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*)

**HGB** – hemoglobin (engl. *hemoglobin*)

**HIF-1 $\alpha$**  – faktor indukovan hipoksijom 1-alfa (engl. *hypoxia-inducible factor-1 alpha*)

**HMGB1** – engl. *high mobility group box 1*

**hsCRP** – C-reaktivni protein visoke osetljivosti (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*)

**IDF** – Međunarodna federacija za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation*)

**IKB** – inhibitor nuklearnog faktora *kappa* B (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa B*)

**IKKβ** – inhibitor nuklearnog faktora *kappa* B kinaza beta (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase beta*)

**IL-1β** – interleukin-1β (engl. *interleukin-1β*)

**IL-6** – interleukin-6 (engl. *interleukin-6*)

**IL-10** – interleukin-10 (engl. *interleukin-10*)

**IL-18** – interleukin-18 (engl. *interleukin-18*)

**IMA** – ishemijom modifikovan albumin (engl. *ischemia-modified albumin*)

**IRF3** – regulatorni faktor interferona 3 (engl. *interferon regulatory factor 3*)

**iRNK** – informaciona ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)

**ITM** – indeks telesne mase

**JAK** – Janus kinaza (engl. *Janus kinase*)

**K2EDTA** – dikalijum-etilendiamintetraacetat (engl. *dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid*)

**KMO** – Kaiser-Meyer-Olkin-ov indeks (engl. *Kaiser-Meyer-Olkin index*)

**KVB** – kardiovaskularne bolesti

**LCAT** – lecitin-holesterol aciltransferaza (engl. *lecithin-cholesterol acyltransferase*)

**LC-MS/MS** – tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)

**LDL** – lipoproteini niske gustine (engl. *low-density lipoprotein*)

**LDL-h** – holesterol u lipoproteinima niske gustine (engl. *low-density lipoprotein cholesterol*)

**LPS** – lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)

**LUMA** – test metilacije zasnovan na luminometriji (engl. *luminometric methylation assay*)

**LWR** – odnos broja limfocita i leukocita (engl. *lymphocyte-to-white blood cell ratio*)

**MAFA** – homolog A onkogeni mišićno-aponeurotične fibrosarkome (engl. *musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*)

**MAPK** – mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

**MASLD** – metabolička disfunkcija udružena sa steatoznom bolešću jetre (engl. *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*)

**MBD** – domen koji vezuje metil-CpG (engl. *methyl-CpG-binding domain*)

**MBD1** – protein 1 koji sadrži domen za vezivanje metil-CpG (engl. *methyl-CpG-binding domain protein 1*)

**MBD2** – protein 2 koji sadrži domen za vezivanje metil-CpG (engl. *methyl-CpG-binding domain protein 2*)

**MDA** – malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

**MDRD** – modifikacija ishrane kod bubrežnih bolesti (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*)

**MeCP2** – protein 2 koji vezuje metil-CpG (engl. *methyl-CpG-binding protein 2*)

**MLR** – odnos broja monocita i limfocita (engl. *monocyte-to-lymphocyte Ratio*)

**MOGAT1** – monoacilglicerol O-aciltransferaza 1 (engl. *monoacylglycerol O-acyltransferase 1*)

**mtDNK** – mitohondrijalna DNK (engl. *mitochondrial DNA*)

**MWR** – odnos broja monocita i leukocita (engl. *monocyte-to-white blood cell ratio*)

**NADH** – nikotinamid-adenin-dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NADPH** – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

**NF- $\kappa$ B** – nuklearni faktor *kappa* B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**NLR** – odnos broja neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil-to-lymphocyte ratio*)

**NLRP3** – engl. *NLR family pyrin domain containing 3*

**non-HDL-h** – holesterol koji nije HDL tipa (engl. *non-high-density lipoprotein cholesterol*)

**NWR** – odnos broja neutrofila i leukocita (engl. *neutrophil-to-white blood cell ratio*)

**oxLDL** – oksidovani lipoproteini niske gustine (engl. *oxidized low-density lipoprotein*)

**PAB** – prooksidativno-antioksidativni balans (engl. *prooxidant-antioxidant balance*)

**PAF-AH** – acetilhidrolaza faktora aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor acetylhydrolase*)

**PAI-1** – inhibitor aktivatora plazminogena-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*)

**PARP-1** – poli-ADP-riboza polimeraza-1 (engl. *poly[ADP-ribose] polymerase 1*)

**PBMC** – mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

**PBS** – fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

**PCA** – analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

**PCNA** – nuklearni antigen proliferišućih ćelija (engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

**PDX1** – pankreasni i duodenalni homeoboks 1 (engl. *pancreatic and duodenal homeobox 1*)

**PGC** – koaktivator receptorski aktivisan proliferatorom peroksizoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor coactivator*)

**PI3K** – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

**PITX2** – engl. *paired-like homeodomain transcription factor 2*

**PIV** – pan-imuno-inflamatorna vrednost (engl. *pan-immune-inflammation value*)

**PKC** – protein kinaza C (engl. *protein kinase C*)

**PLAU** – plazminogen aktivator, urokinazni tip (engl. *plasminogen activator, urokinase*)

**PLR** – odnos broja trombocita i limfocita (engl. *platelet-to-lymphocyte ratio*)

**PON1** – paraoksonaza 1 (engl. *paraoxonase 1*)

**PPAR $\gamma$**  – gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

**PPARGC1A** – engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

**PWWP** – domen prolin-triptofan-triptofan-prolin (engl. *Pro-Trp-Trp-Pro domain*)

**PRDM16** – engl. *PR domain containing 16*

**qMSP**– kvantitativan PCR specifičan za metilaciju (engl. *quantitative methylation-specific PCR*)

**RAGE** – receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (engl. *receptor for advanced glycation end-products*)

**RFTS** – sekvenca za ciljanje replikacionog žarišta (engl. *replication focus targeting sequence*)

**ROC** – engl. *Receiver operating characteristic*

**RNS** – reaktivna azotova jedinjenja (engl. *reactive nitrogen species*)

**ROS** – reaktivna kiseonikova jedinjenja (engl. *reactive oxygen species*)

**SAM** – S-adenozil-L-metionin (engl. *S-adenosyl-L-methionine*)

**sdLDL** – male, guste LDL čestice (engl. *small dense LDL*)

**SGLT2** – natrijum-glukoza kotransporter 2 (engl. *sodium-glucose cotransporter 2*)

**SH-grupe** – sulfhidrilne grupe (engl. *sulfhydryl groups*)

**SII** – sistemski imuno-inflamatorni indeks (engl. *systemic immune-inflammation index*)(engl. *systemic immune-inflammation index*)

**SIRI** – indeks sistemskog inflamatornog odgovora (engl. *systemic inflammatory response index*)

**SIRT2** – sirtuin 2 (engl. *sirtuin 2*)

**SLS** – natrijum-lauril-sulfat (engl. *sodium lauryl sulfate*)

**SMK** – slobodne masne kiseline

**SOD** – superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

**STAT** – transduktor signala i aktivator transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

**STING** – stimulator gena interferona (engl. *stimulator of interferon genes*)

**T1DM/T2DM** – tip 1/tip 2 dijabetes melitusa

**TAS** – totalni antioksidativni status (engl. *total antioxidant status*)

**TBA** – tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

**TBK1** – TANK-vezujuća kinaza 1 (engl. *TANK-binding kinase 1*)

**TC** – ukupni holesterol (engl. *total cholesterol*)

**TDG** – timin-DNK-glikozilaza (engl. *thymine DNA glycosylase*)

**TET** – enzimi 10-11 translokacije (engl. *ten-eleven translocation*)

**TG** – trigliceridi (engl. *triglycerides*)

**TGF-β** – transformišući faktor rasta-β (engl. *transforming growth factor-beta*)

**TLR-4** – engl. *Toll-like receptor 4*

**TNF-α** – faktor nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor-alpha*)

**TOS** – totalni oksidativni status (engl. *total oxidant status*)

**TXNIP** – tioredoksin-interagujući protein (engl. *thioredoxin-interacting protein*)

**tPA** – tkivni aktivator plazminogena (engl. *tissue plasminogen activator*)

**UBASH3B** – engl. *ubiquitin-associated and SH3 domain-containing B*

**UHPLC** – tečna hromatografija ultra visokih performansi (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*)

**UHRF1** – ubikvitin-slični protein koji sadrži PHD i *RING finger* domene 1 (engl. *ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1*)

**UKPDS** – Prospektivna studija dijabetesa u Ujedinjenom Kraljevstvu (engl. *United Kingdom Prospective Diabetes Study*)

**VCAM-1** – vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*)

**VEGF** – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

**VLDL** – lipoproteini vrlo niske gustine (engl. *very low-density lipoprotein*)

**ZBTB4** – protein 4 koji sadrži cinkove prste i BTB domen (engl. *zinc finger and BTB domain-containing 4*)

**ZBTB33** – protein 33 koji sadrži cinkove prste i BTB domen (engl. *zinc finger and BTB domain-containing 33*)

**ZFHX3** – homeoboks 3 sa cinkovim prstima (engl. *zinc finger homeobox 3*)



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiološki podaci i faktori rizika za razvoj tipa 2 dijabetes melitusa .....	3
1.2. Etiopatogeneza tipa 2 dijabetes melitusa .....	5
1.3. Mikrovaskularne komplikacije tipa 2 dijabetes melitusa .....	8
1.3.1. Klinički profili mikrovaskularnih komplikacija .....	8
1.3.2. Mehanizmi ćelijskog oštećenja.....	9
1.4. Makrovaskularne komplikacije tipa 2 dijabetes melitusa .....	15
1.4.1. Klinički profil makrovaskularnih komplikacija .....	15
1.4.2. Dislipidemija u tipu 2 dijabetes melitusa .....	16
1.5. Metilacija DNK .....	18
1.5.1. Epigenetske modifikacije u tipu 2 dijabetes melitusa .....	18
1.5.2. Mehanizam metilacije DNK .....	19
1.5.3. Mehanizam demetilacije DNK .....	21
1.5.4. Promena obrazaca metilacije DNK u tipu 2 dijabetes melitusa .....	24
1.5.5. Molekularni mehanizmi metaboličke memorije.....	25
1.5.6. Savremeni metodološki pristupi u ispitivanju metilacije DNK .....	27
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	29
3. MATERIJAL I METODE .....	30
3.1. Učesnici u studiji.....	30
3.2. Biološki materijal .....	31
3.3. Biomarkeri metaboličke kontrole.....	32
3.3.1. Određivanje koncentracije krajnjih produkata uznapredovale glikacije .....	32
3.4. Biomarkeri redoks statusa.....	33
3.4.1. Određivanje prooksidativnih biomarkera .....	33
3.4.2. Određivanje antioksidativnih biomarkera.....	34
3.5. Biomarkeri inflamacije.....	35
3.6. Biomarkeri dislipidemije.....	36
3.7. Određivanje stepena globalne metilacije DNK.....	38
3.7.1. Izolovanje PBMC iz leukocitnog sloja.....	38
3.7.2. Ekstrakcija genomske DNK .....	39
3.7.3. Provera integriteta i kvantifikacija DNK.....	39
3.7.4. Enzimaska hidroliza DNK.....	40
3.7.5. UHPLC-DAD metoda.....	41
3.8. Određivanje biohemijskih parametara .....	42
3.9. Statistička obrada podataka .....	43

4. REZULTATI .....	44
4.1. Optimizacija UHPLC-DAD metode za određivanje stepena globalne metilacije DNK.....	44
4.1.1. Evaluacija integriteta i čistoće izolovane genomske DNK.....	44
4.1.2. Optimizacija uslova enzimske hidrolize genomske DNK.....	45
4.1.3. Analitička validacija metode.....	49
4.1.4. Analiza stepena globalne metilacije DNK u realnom uzorku .....	51
4.2. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika .....	52
4.2.1. Terapijski modaliteti i hronične komplikacije .....	54
4.3. Parametari metaboličke kontrole .....	56
4.4. Lipidni profil ispitanika.....	57
4.4.1. Lipidni status i aktivnost LCAT i CETP .....	57
4.4.2. Analiza LDL i HDL subrakcija .....	58
4.5. Parametri redoks statusa .....	59
4.6. Parametri sistemske inflamacije .....	60
4.7. Stepen globalne metilacije DNK u ispitivanim grupama.....	61
4.8. Varijabilnost globalne metilacije DNK u ispitivanim grupama.....	64
4.9. Korelaciona analiza stepena globalne metilacije DNK.....	68
4.10. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo kardiovaskularnih bolesti	74
4.10.1. Parametri metaboličke kontrole.....	74
4.10.2. Parametri redoks statusa .....	75
4.10.3. Parametri inflamacije.....	76
4.10.4. Parametri dislipidemije.....	77
4.10.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa KVB .....	79
4.11. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne nefropatije....	81
4.11.1. Parametri metaboličke kontrole.....	81
4.11.2. Parametri redoks statusa .....	82
4.11.3. Parametri inflamacije.....	83
4.11.4. Parametri dislipidemije.....	84
4.11.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DNF .....	86
4.12. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne retinopatije ...	88
4.12.1. Parametri metaboličke kontrole.....	88
4.12.2 Parametri redoks statusa .....	89
4.12.3 Parametri inflamacije.....	90
4.12.4. Parametri dislipidemije.....	91
4.12.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DR.....	93
4.13. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne neuropatije ...	94
4.13.1. Parametri metaboličke kontrole.....	94
4.13.2. Parametri redoks statusa .....	95

4.13.3. Parametri inflamacije.....	96
4.13.4. Parametri dislipidemije.....	97
4.13.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DN.....	99
4.14. Analiza parametara u odnosu na prisustvo dijabetesnog stopala.....	101
4.14.1. Parametri metaboličke kontrole.....	101
4.14.2. Parametri redoks statusa .....	102
4.14.3. Parametri inflamacije.....	103
4.14.4. Parametri dislipidemije.....	104
4.14.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DS.....	106
4.14.6. Poređenje pacijenata bez hroničnih komplikacija i pacijenata sa DS .....	108
4.15. Step globalne metilacije DNK u zavisnosti od prisustva komplikacija.....	112
4.16. Uticaj kardiometaboličkih faktora rizika na step globalne metilacije DNK .....	121
5. DISKUSIJA.....	123
6. ZAKLJUČCI.....	138
7. REFERENCE .....	139
8. BIOGRAFIJA .....	164



## 1. UVOD

Tip 2 dijabetes melitusa (T2DM) predstavlja kompleksan, heterogen metabolički poremećaj, čija je osnovna karakteristika perzistentna hiperglikemija, nastala kao rezultat dinamičkog preplitanja insulinske rezistencije i progresivnog deficita sekretorne funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa (1). U inicijalnoj fazi patogeneze periferna tkiva, prvenstveno skeletni mišići i jetra, pokazuju smanjenu osjetljivost na dejstvo insulina što ima za posledicu kompenzatornu hiperinsulinemiju. Međutim, insulinska rezistencija uz hroničnu izloženost hiperglikemiji vodi ka progresivnom iscrpljivanju funkcionalnog kapaciteta pankreasa, pretvarajući reverzibilni metabolički disbalans u progresivno oboljenje sa ozbiljnim vaskularnim posledicama (2).

Tradicionalna kategorizacija dijabetesa na tip 1 (T1DM) i T2DM pokazala se nedovoljnom za objašnjenje izražene fenotipske varijabilnosti unutar populacije pacijenata. Na primer, latentni autoimunski dijabetes kod odraslih (engl. *latent autoimmune diabetes in adults*, LADA) često ostaje neprepoznat i pogrešno se klasifikuje kao T2DM. U nastojanju da se personalizuje dijagnostički pristup, Ahlqvist i saradnici predložili su novu klasifikaciju zasnovanu na klaster analizi šest ključnih varijabli: starosti u trenutku postavljanja dijagnoze dijabetesa, indeksa telesne mase (ITM), udela glikohemoglobina ( $HbA_{1c}$ ), prisustva antitela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase antibodies*, GADA), kao i upotrebu savremenih indeksa HOMA2-B (engl. *homeostasis model assessment 2 - beta-cell function*) i HOMA2-IR (engl. *homeostasis model assessment 2 of insulin resistance*) za procenu funkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa i stepena insulinske rezistencije (3). Prema ovom modelu, teški autoimunski dijabetes (engl. *severe autoimmune diabetes*, SAID) karakteriše se prisustvom GADA antitela i ranim gubitkom insulinske sekrecije. Slično njemu, teški insulin-deficitni dijabetes (engl. *severe insulin-deficient diabetes*, SIDD) ima profil izražene insuficijencije  $\beta$ -ćelija i visokih vrednosti  $HbA_{1c}$ , ali nema autoimunsku osnovu i nosi izrazito povišen rizik od rane dijabetesne retinopatije (DR). Pored ova dva fenotipa dijabetesa, postoji teški insulin-rezistentni dijabetes (engl. *severe insulin-resistant diabetes*, SIRD), u kojem dominiraju izrazita tkivna rezistencija na insulin i gojaznost, a koji je u snažnoj korelaciji sa najvišom incidencijom dijabetesne nefropatije (DNF) i nealkoholne masne bolesti jetre (engl. *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, MASLD). Preostala dva klastera odlikuju se blažim kliničkim tokom: blagi dijabetes povezan sa gojaznošću (engl. *mild obesity-related diabetes*, MOD) predstavlja metabolički poremećaj udružen sa povišenim ITM, ali bez prisustva ekstremne insulinske rezistencije, dok je blagi dijabetes povezan sa starenjem (engl. *mild age-related diabetes*, MARD) najučestaliji fenotip, koji se tipično dijagnostikuje u starijem životnom dobu, a odlikuje se relativno sporom progresijom i blažom kliničkom slikom (4).

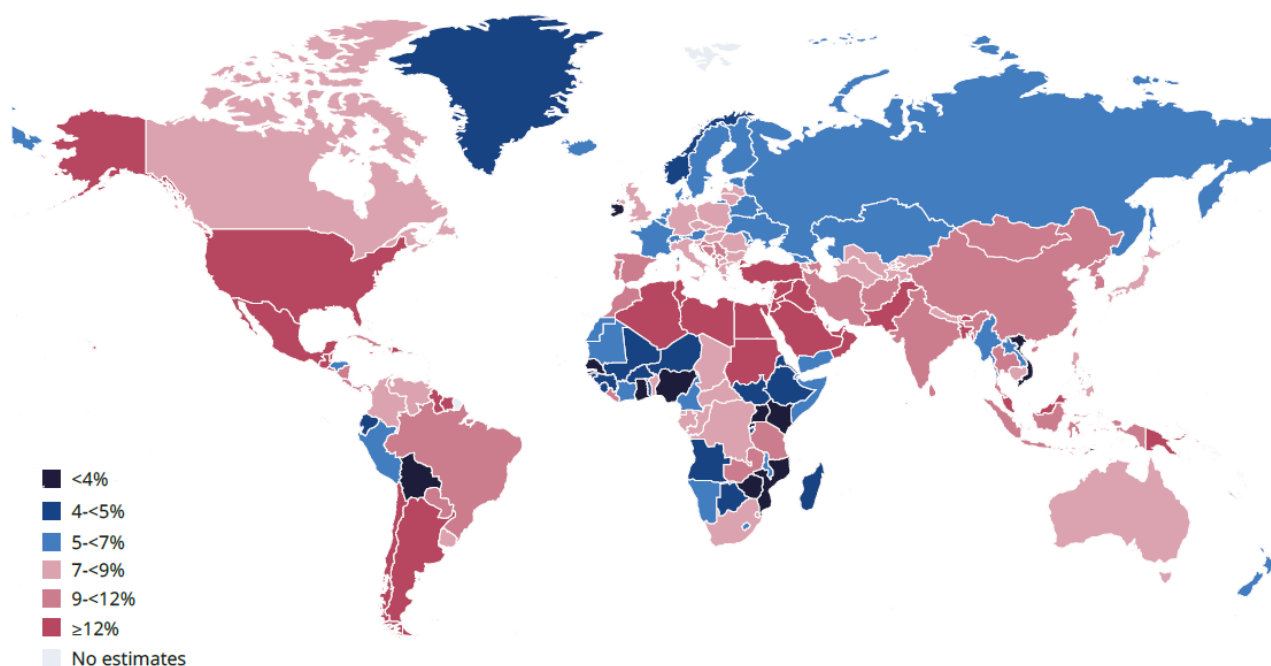
Iako ovaj model klasifikacije olakšava predviđanje toka bolesti, još uvek nije dobio širu primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Glavni razlog leži u činjenici da se klinička slika pacijenata menja tokom vremena. Kako parametri poput telesne mase i glikemijske kontrole variraju pod uticajem terapije i stila života, pacijenti u toku lečenja mogu prelaziti iz jednog klastera u drugi (5). Pored ograničenja u smislu varijabilnosti kliničke slike, modelu je potrebna i dodatna potvrda kroz istraživanja na različitim etničkim grupama, s obzirom na to da je model razvijen na specifičnoj severnoevropskoj populaciji (3). Međutim, danas je dobro potvrđeno da je sagledavanje T2DM isključivo kao glikemijskog poremećaja nedovoljno za objašnjenje njegove kompleksne patogeneze. Ova metabolička bolest je sada prepoznata kao stanje hronične, sistemske inflamacije niskog stepena i trajno narušene redoks ravnoteže, često praćene poremećajem u metabolizmu lipoproteina, čiji sinergistički efekti stvaraju začarani krug patoloških procesa koji vremenom uzrokuju endotelnu disfunkciju (6).

Posebno mesto u razumevanju razvoja i progresije T2DM zauzimaju epigenetske modifikacije, prvenstveno metilacija dezoksiribonukleinske kieseline (DNK). Ovi procesi funkcionišu kao molekularni most koji povezuje genetsku predispoziciju sa uticajima spoljašnje sredine (ishrana, stil života, stres) i daju objašnjenje za fenomen tzv. nedostajuće heritabilnosti dijabetesa. Naime, poznate genetske varijacije objašnjavaju samo manji deo ukupnog naslednog rizika za razvoj T2DM, dok se preostali deo rizika koji nedostaje ostvaruje upravo kroz ove stečene, epigenetske uticaje sredine na ekspresiju gena (7). Za razliku od stabilnog genoma, epigenom je podložan promenama pod uticajem metaboličkog stresa. Te promene rezultuju molekularnim reprogramiranjem ekspresije gena, čime se tkiva održavaju u stanju hronične inflamacije i podstiče se progresivna fibroza (8).

Dodatan klinički izazov leži u tome što je rani tok T2DM uglavnom subklinički i asimptomatski, zbog čega se kod značajnog broja pacijenata dijagnoza postavlja tek u fazi kada su mikrovaskularna i makrovaskularna oštećenja već uznapredovala (9,10). Iako su tradicionalni parametri poput glikemije našte i HbA<sub>1c</sub> nezamenljivi u rutinskoj praksi, oni ne poseduju dovoljnu osetljivost za detekciju ranog oštećenja tkiva (11). Iz tog razloga nameće se potreba za prelaskom na multimarkerski pristup, koji bi integrisao praćenje epigenetskog statusa, redoks ravnoteže i profila inflamacije. U ovoj disertaciji primenjen je takav sveobuhvatni pristup, koji pruža potencijalno bolji uvid u „molekularni potpis“ kumulativnih metaboličkih oštećenja, otvarajući put ka ranoj stratifikaciji rizika i proaktivnoj prevenciji ireverzibilnih komplikacija bolesti.

## 1.1. Epidemiološki podaci i faktori rizika za razvoj tipa 2 dijabetes melitusa

Dominantna forma dijabetesa je T2DM, koji obuhvata 90-95% svih kliničkih slučajeva i pozicionira se kao jedan od najznačajnijih uzroka prevremene smrtnosti na globalnom nivou (2). Usled kontinuiranog porasta incidencije, Međunarodna federacija za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation, IDF*) i Svetska zdravstvena organizacija (SZO) klasifikovale su T2DM kao pandemiju nezaraznog tipa (2,12). Globalna rasprostranjenost ove pandemije pokazuje izraženu geografsku i socio-ekonomsku heterogenost (Slika 1). Najbrži porast prevalencije beleži se u zemljama u razvoju i zonama brze urbanizacije, gde je stanovništvo izloženo udruženom uticaju gojaznosti, sedentarnog načina života i zagađenja vazduha (13). Podaci Nacionalne ankete o zdravlju i ishrani Sjedinjenih Američkih Država (engl. *National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES*) iz 2024. godine ilustruju razmere ovih problema. Naime, 11,3% odrasle populacije ima dijagnostikovani dijabetes, dok čak 46,5% ima stanje predijabetesa (14). Pored toga, učestalost obolevanja značajno varira u zavisnosti od etničke pripadnosti, pola i statusa obrazovanja. Najviše stope beleže se kod muškaraca hispanskog porekla i u populacijama sa nižim stepenom obrazovanja, što ukazuje na to da socijalne determinante značajno modulišu zdravstveni rizik (14).



**Slika 1. Prevalencija T2DM u svetu, standardizovana prema uzrastu stanovništva**

Preuzeto iz: Duncan BB, Magliano DJ, Boyko EJ. *IDF Diabetes Atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. Nephrol Dial Transplant. 2025;41(1):7-9.*

Iako se dijagnoza T2DM tradicionalno vezuje za srednje i starije životno doba, sa pikom obolevanja između 40. i 59. godine, savremeni epidemiološki podaci ukazuju na zabrinjavajuće pomeranje starosne granice ka mlađim odraslim osobama, pa čak i deci (15). Ova promena kliničke demografije prvenstveno je posledica sve ranije pojave gojaznosti u opštoj populaciji (15,16). Dodatan klinički izazov predstavlja procena da je približno 45% obolelih nedijagnostikovano, što ukazuje na to da oboljenje biva i godinama neprepoznato, ostavljajući

pacijente izložene tihom, ali progresivnom oštećenju tkiva usled hiperglikemije mnogo pre formalnog postavljanja dijagnoze (17). U tom kontekstu, predijabetes, koji globalno pogađa oko 352 miliona ljudi, predstavlja kritičnu tačku za preventivne intervencije, s obzirom na to da kod 5 do 10% ovih pacijenata godišnje progredira u manifestni T2DM (4,5). Prema najnovijim projekcijama IDF-a, do 2050. broj obolelih dostići će 853 miliona (18).

U skladu sa globalnim epidemiološkim tokovima, Republika Srbija beleži visoku prevalenciju T2DM, od koga boluje oko 8,1% opšte populacije (19). U poslednjoj deceniji ukupna stopa mortaliteta u zemlji porasla je za 3,2%, a dijabetes je prepoznat kao jedan od ključnih pokretača ovog trenda, zauzimajući četvrto mesto na listi vodećih uzroka smrti (19,20). Ovako visok mortalitet primarno je posledica makrovaskularnih komplikacija, pre svega kardiovaskularnih bolesti (KVB). Procenjuje se da pacijenti sa T2DM imaju 60% veći rizik za razvoj KVB, 73% za akutni infarkt miokarda i čak 84% veći rizik za nastanak srčane insuficijencije u poređenju sa opštom populacijom (18).

Etiologija T2DM je izrazito poligenetska i zasniva se na kompleksnoj interakciji genoma i faktora sredine, pri čemu genetska osnova objašnjava između 30% i 70% varijabilnosti rizika za nastanak bolesti (21). Dosadašnje studije asocijacije na nivou celog genoma (engl. *genome-wide associations study*, GWAS) identifikovale su preko 100 rizičnih lokusa, uključujući gene poput *TCF7L2* (engl. *transcription factor 7-like 2*), *GCK* (engl. *glucokinase*), *KCNJ11* (engl. *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*) i *PPARG* (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), od kojih je većina povezana sa funkcijom  $\beta$ -ćelija ili sekrecijom insulina (22–24). Ipak, s obzirom na to da identifikovani genetski polimorfizmi ne mogu u potpunosti da objasne pandemijske razmere T2DM, definisan je koncept nedostajuće heritabilnosti. Kao što je ranije napomenuto, ovaj fenomen objašnjen je efektima faktora sredine poput ishrane, nivoa fizičke aktivnosti i izloženosti toksinima na genom, koji modulišu genetski rizik uticajem na ekspresiju gena. U tom procesu, ključnu ulogu imaju epigenetske modifikacije, čije delovanje omogućava da isti genotip rezultuje različitim fenotipskim ishodima, budući da one deluju kao molekularni posrednici koji prevode uticaje faktora sredine i načina života u trajne promene genske ekspresije (13). Dokaz za ovaj fenomen pružaju studije na monozigotnim blizancima koje su pokazale da, uprkos identičnoj genetskoj osnovi, jedan bliznac može razviti T2DM, dok drugi ostaje zdrav, što se pripisuje razlikama u epigenetskom profilu koje nastaju kao posledica različitog kumulativnog uticaja faktora sredine i životnog stila (25).

U kliničkoj praksi faktori rizika za razvoj T2DM tradicionalno se dele na nepromenljive (genetska predispozicija, starost, etnička pripadnost) i promenljive (gojaznost, stil života, pušenje). Gojaznost, definisana kao  $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , predstavlja najvažniji promenljivi faktor rizika (26). Kohortna studija koju su sprovedi Narayan i saradnici pokazala je da rizik od razvoja dijabetesa drastično raste sa povećanjem telesne mase: od 7,6% kod pothranjenih do čak 70,3% kod ekstremno gojaznih muškaraca, odnosno od 12,2% do 74,4% kod ekstremno gojaznih žena, pri čemu su naročito ugrožene mlađe starosne grupe (27). Visok rizik koji nosi gojaznost objašnjava se metaboličkom aktivnošću visceralnog masnog tkiva. Adipozno tkivo abdomena danas se posmatra kao aktivan endokrini organ, koji pojačano sekretuje proinflamatorne citokine i adipokine, čime direktno indukuje insulinsku rezistenciju i održava stanje sistemske inflamacije (26). U skladu sa tim, prema kriterijumima IDF-a, obim struka veći od 94 cm kod muškaraca i 80 cm kod žena predstavlja centralnu komponentu metaboličkog sindroma, koja višestruko uvećava rizik od endotelnog oštećenja i fatalnih kardiovaskularnih događaja (28). Sam metabolički sindrom definiše se kao konstelacija međusobno povezanih kardiometaboličkih poremećaja, primarno centralne gojaznosti, aterogene dislipidemije, hipertenzije i insulinske rezistencije (29). Istovremeno prisustvo ovih faktora značajno povećava rizik od razvoja manifestnog T2DM, zbog čega se pravovremeno prepoznavanje i tretman metaboličkog sindroma smatraju ključnim merama prevencije (29).

## 1.2. Etiopatogeneza tipa 2 dijabetes melitusa

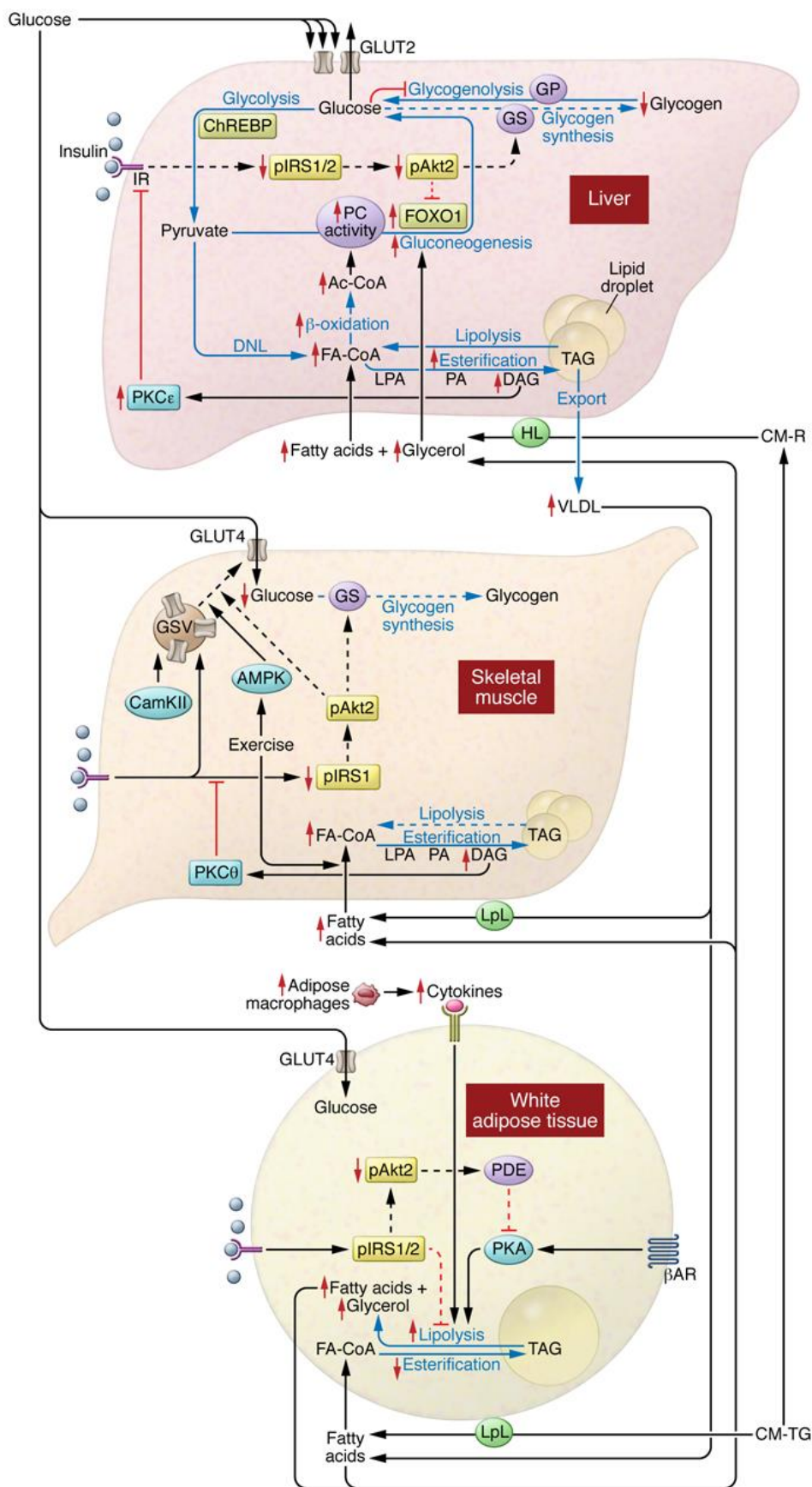
Patogeneza T2DM zasniva se na kompleksnom poremećaju homeostaze glukoze, koji je primarno determinisan insulinskom rezistencijom i progresivnim gubitkom funkcije  $\beta$ -ćelija. Insulinska rezistencija se definiše kao neadekvatan biološki odgovor ciljnih tkiva na fiziološke koncentracije insulina, što je poremećaj koji godinama, pa čak i decenijama prethodi kliničkoj manifestaciji bolesti (30). Genetska osnova insulinske rezistencije obuhvata i polimorfizme gena koji kodiraju sintezu GLUT4 transportera (engl. *glucose transporter type 4*), čime se stvara predispozicija za neadekvatan transport glukoze u ćeliju (31).

U fiziološkim uslovima glikemiju u uskim granicama održava antagonističko delovanje insulina i glukagona. Insulin snižava koncentraciju glukoze u krvi, tako što stimuliše njeno preuzimanje u tkiva i podstiče proces glikogeneze, dok istovremeno inhibira endogenu produkciju glukoze supresijom glikogenolize i glukoneogeneze. Nasuprot tome, glukagon povećava koncentraciju glukoze u krvi stimulisanjem procesa glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, uz istovremenu inhibiciju glikogeneze (32). U održavanju ove hormonske ravnoteže između insulina i glukagona učestvuju drugi hormoni kao što su hormon rasta, glukagonu sličan peptid-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1), kortizol i kateholamini (32).

Insulin ostvaruje svoje efekte vezivanjem za ekstracelularnu  $\alpha$ -subjedinicu insulinskog receptora, što dovodi do aktivacije domena sa aktivnošću tirozin-kinaze i autofosforilacije intracelularne  $\beta$ -subjedinice. Autofosforilacija insulinskog receptora regrutuje supstrate insulinskog receptora IRS-1 (engl. *insulin receptor substrate 1*) i IRS-2 (engl. *insulin receptor substrate 2*), što aktivira PI3K/Akt (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) i MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) signalne puteve. Aktivacija PI3K/Akt signalnog puta uzrokuje translokaciju vezikula sa GLUT4 transporterima iz citoplazme na ćelijsku membranu, čime se omogućava preuzimanje glukoze u mišićne ćelije i adipocite (33). Sa druge strane, aktivacija MAPK/ERK signalnog puta reguliše transkripciju gena, rast i diferencijaciju ćelija (34). Međutim, u uslovima hronične hiperglikemije i hiperprodukcije reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (engl. *reactive oxygen species*, ROS) aktiviraju se proinflamatorne kinaze JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i IKK- $\beta$  (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*), koje fosforilišu IRS-1 na serinskim ostacima. Ova aberantna fosforilacija blokira nishodnu insulinsku signalizaciju, što dodatno produbljuje insulinsku rezistenciju (22).

Smanjen fiziološki odgovor na insulin manifestuje se kroz specifične, blisko povezane defekte u skeletnim mišićima, jetri i adipoznom tkivu (Slika 2). Skeletni mišići, kao primarno mesto postprandijalnog preuzimanja približno 70% ukupne količine glukoze, izuzetno su osetljivi na rani razvoj insulinske rezistencije. U uslovima kontinuiranog kalorijskog suficita, unutar mišićnih ćelija se akumulira diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*, DAG), koji aktivira protein kinazu C- $\theta$  (engl. *protein kinase C-theta*, PKC- $\theta$ ). Ova kinaza inhibira tirozin-kinaznu aktivnost insulinskog receptora, sprečavajući translokaciju GLUT4 transportera na membranu. Zbog toga se smanjuje preuzimanje glukoze i kompromituje kapacitet za stvaranje glikogenskih depoa (35). Usled ovih promena i smanjenog preuzimanja glukoze u periferna tkiva, jetra je izložena prekomernom metaboličkom opterećenju glukozom i slobodnim masnim kiselinama (SMK). Iako hepatociti postaju rezistentni na insulinsku supresiju glukoneogeneze, što vodi ka hiperglikemiji našte, oni paradoksalno zadržavaju sposobnost *de novo* lipogeneze pod uticajem kompenzatorne hiperinsulinemije. Ovakav patološki disbalans dovodi do akumulacije triglicerida u jetri i posledičnog razvoja MASLD (36). Patološku sliku dodatno pogoršava disfunkcija adipoznog tkiva. Kada adipociti postanu rezistentni na antilipolitičko dejstvo insulina usled izostanka inhibicije hormon-senzitivne lipaze, oni gube sposobnost da zadrže deponovane masti i počinju nekontrolisano da oslobađaju SMK u sistemsku cirkulaciju. Ovaj

proces, poznat kao lipotoksičnost ometa insulinsku signalizaciju u mišićima i jetri, dodatno produbljujući insulinsku rezistenciju u ovim tkivima. Pored toga, hipertrofični adipociti postaju infiltrirani makrofagama (proinflamatorni M1 fenotip) i počinju da luče proinflamatorne citokine, kao što su TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor-alpha*) i interleukin-6 (engl. *interleukin-6*, IL-6). Ovi medijatori deluju i parakrino i endokrino, sistemski produbljujući stanje hronične inflamacije niskog stepena koje predstavlja osnovu progresije T2DM (30,37).



**Slika 2. Patofiziološki mehanizmi insulinske rezistencije**

Preuzeto iz: Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 2016;126(1):12-22.

### 1.3. Mikrovaskularne komplikacije tipa 2 dijabetes melitusa

#### 1.3.1. Klinički profili mikrovaskularnih komplikacija

Hronična hiperglikemija je primarni pokretač mikrovaskularnih oštećenja, koja predominantno zahvataju krvne sudove u tkivima koja nisu zavisna od delovanja insulina. Ova oštećenja se manifestuju kao DR, DNF i dijabetesna neuropatija (DN), koje umnogome narušavaju kvalitet života pacijenata i značajno doprinose visokoj stopi morbiditeta i mortaliteta (38).

Najčešći uzrok gubitka vida kod radno sposobnog stanovništva je DR, koju karakteriše selektivni gubitak pericita i zadebljanje bazalne membrane kapilara retine (39). U ranim stadijumima neproliferativne faze dolazi do povećane vaskularne permeabilnosti i formiranja mikroaneurizmi, bez primetnih simptoma. Daljom progresijom DR razvija se okluzija kapilara i ishemija retine, a osnovu daljeg oštećenja čini odgovor tkiva na nastalu hipoksiju, u vidu poremećaja u regulaciji faktora indukovanog hipoksijom (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha subunit*, HIF-1 $\alpha$ ). U fiziološkim uslovima, HIF-1 $\alpha$  se veoma brzo razgrađuje, međutim u uslovima tkivne hipoksije, ovaj transkripcioni faktor se stabilizuje i akumulira u ćeliji, gde se vezuje za HRE (engl. *hypoxia-response element*) regione promotora gena za vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i indukuje njegovu prekomernu ekspresiju (40). Ovaj proces inicira proliferativnu fazu, koju odlikuje patološko formiranje novih fragilnih krvnih sudova, koji su skloni rupturama, što uzrokuje krvarenja u staklastom telu i trakcionu ablaciju retine (41). Terapija rane DR usmerena je na striktnu metaboličku kontrolu, kako bi se usporila progresija oštećenja, dok se u proliferativnoj fazi terapijski fokus pomera ka uklanjanju abnormalne vaskularizacije farmakološkom primenom VEGF inhibitora ili laserskom fotokoagulacijom, dok je u najtežim slučajevima neophodna vitrektomija (42). S obzirom na to da su nastala oštećenja ireverzibilna, a terapija najefikasnija u ranoj fazi, prevencija i redovni oftalmološki pregledi, najpre u trenutku postavljanja dijagnoze T2DM, a zatim na 1 do 2 godine u odsustvu simptoma DR, odnosno češće ukoliko se ustanove abnormalnosti, predstavljaju imperativ kliničke prakse (43).

Kod pacijenata sa T2DM može se razviti progresivno oštećenje bubrežnih krvnih sudova, koje vodi ka postepenom smanjenju brzine glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) i terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji (44). Procenjuje se da između 20% i 50% pacijenata razvije DNF tokom života (45). U ranoj fazi dolazi do asimptomatskog zadebljanja bazalne membrane i hipertrofije bubrega. Oštećenje glomerularne membrane najpre se manifestuje kao mikroalbuminurija, koja nije samo marker bubrežne disfunkcije, već i nezavisni prediktor kardiovaskularnog rizika (46). Progresija DNF praćena je prekomernom aktivacijom renin-angiotenzin-aldosteron sistema, što povećava intraglomerularni pritisak, dok akumulacija krajnjih produkata uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation end-products*, AGE) i aktivacija citokina, prvenstveno transformišućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor-beta*, TGF- $\beta$ ), indukuju transformaciju mezangijalnih ćelija u miofibroblaste. To rezultira ekspanzijom mezangijalnog matriksa i progresivnom glomerulosklerozom (47). Shodno tome, rutinska terapija DNF pored glikemijske regulacije obavezno uključuje inhibitore angiotenzin-konvertujućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*, ACEI) ili blokatore angiotenzinskih receptora (engl. *angiotensin II receptor blocker*, ARB) radi očuvanja bubrežne funkcije (44). Uvođenje SGLT2 (engl. *sodium-glucose transport protein 2*) inhibitora i agonista GLP-1 receptora značajno je unapredilo terapiju dijabetesa kod pacijenata sa DNF, jer primena ovih lekova usporava pad GFR i usporava gubitak bubrežne funkcije (48,49).

Najučestalija mikrovaskularna komplikacija je DN, koja se detektuje kod više od polovine pacijenata sa dijabetesom (50). Ovaj heterogeni entitet obuhvata periferno-senzornu neuropatiju, praćenu parestezijama i neuropatskim bolom, kao i autonomnu neuropatiju koja kompromituje funkciju kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sistema kroz ortostatsku hipotenziju i gastroparezu (51,52). U osnovi ove komplikacije nalaze se progresivna degeneracija nerava, gubitak aksona i mikroangiopatija (53). U ranoj fazi se povremeno javljaju simptomi poput osećaja blagog trnjenja, bola ili žarenja u ekstremitetima, koji vremenom sa razvojem oštećenja napreduju, češće se javljaju i duže traju i prelaze u intenzivan, onesposobljavajući bol. U krajnjem stadijumu DN bol biva zamenjen potpunim gubitkom senzibiliteta i osećajem utrnulosti (50). Terapijski fokus usmeren je na postizanje optimalne metaboličke kontrole i simptomatsku kontrolu bola, uz preporuke za skrining kod pacijenata bez potvrđene DN jednom godišnje (54). Kulminaciju ovog mikrovaskularnog i neurološkog poremećaja predstavlja sindrom dijabetesnog stopala (DS), koji najčešće nastaje udruženim delovanjem neuropatije i periferne arterijske bolesti. Gubitak zaštitnog senzibiliteta, uz autonomnu disfunkciju i perifernu ishemiju, stvara pogodne uslove za infekcije i nastanak hroničnih ulkusa i gangrene, čineći dijabetes vodećim uzrokom netraumatskih amputacija (55,56). Studije pokazuju da se DS dijagnostikuje kod više od 4 miliona osoba godišnje, a da oko 25% pacijenata sa T2DM razvije najmanje jedan ulcer u poređenju sa opštom populacijom (57). Petogodišnja stopa preživljavanja nakon inicijalne dijagnoze ulceracija iznosi 56%, a najozbiljnije komplikacije obuhvataju sepsu, gangrenu, osteomijelitis i posledičnu amputaciju (58). Terapija je usmerena na uklanjanje nekrotičnog tkiva, antibiotsku terapiju infekcije i povećanje perfuzije primenom hiperbarične komore, koja ima za cilj da poveća snabdevanje rane kiseonikom i istovremeno stimuliše imunski odgovor posredovan leukocitima, angiogenezu, zarastanje rane i smanjivanje edema (59).

### **1.3.2. Mehanizmi ćelijskog oštećenja**

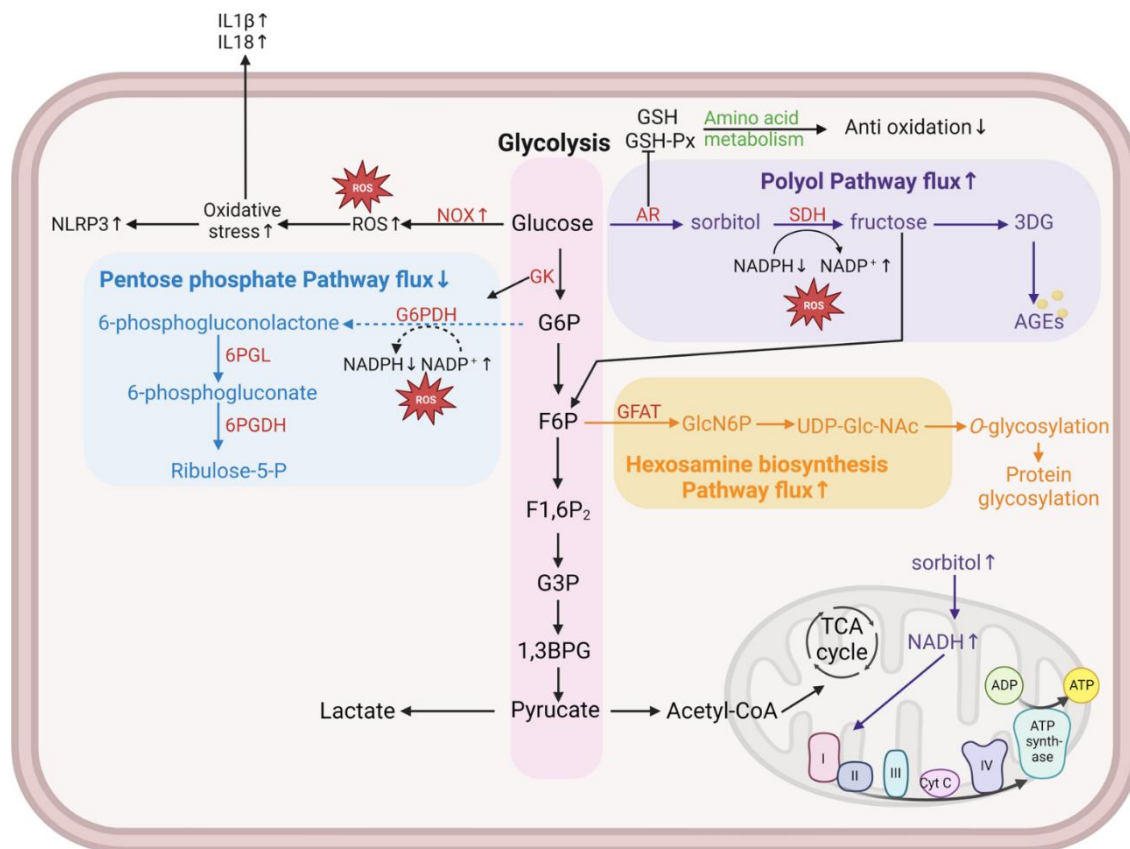
Razvoj mikrovaskularnih komplikacija u T2DM na molekularnom nivou predstavlja kompleksan proces koji proističe iz hroničnog narušavanja homeostaze glukoze i pratećeg sistemskog inflamatornog odgovora. Za razliku od tkiva koja poseduju insulin-zavisne mehanizme regulacije, ćelije retinalnog endotela, mezangijalne ćelije bubrega i Švanove ćelije perifernih nerava preuzimaju glukozu putem transportera niskog afiniteta – GLUT1 (engl. *glucose transporter type 1*) i GLUT3 (engl. *glucose transporter type 3*), što ih čini direktno izloženim fluktuacijama glikemije u ekstracelularnom prostoru. U uslovima perzistentne hiperglikemije ove ćelije su izložene stalnom influksu glukoze, što dovodi do zasićenja glikolitičkog puta i aktivacije alternativnih, citotoksičnih puteva: poliolskog puta, heksozaminskog puta, puta PKC i puta stvaranja AGE produkata (60).

#### **1.3.2.1. Oksidativni stres: molekularni inicijator ćelijskog oštećenja**

Oksidativni stres se definiše kao stanje narušene homeostaze, koje nastaje kada produkcija ROS i reaktivnih azotovih jedinjenja (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) nadmaši kapacitete antioksidativnih odbrambenih sistema (61). Iako ROS u fiziološkim koncentracijama služe kao signalni molekuli, njihova nekontrolisana produkcija predstavlja centralni mehanizam oštećenja koji povezuje hroničnu hiperglikemiju sa svim mikrovaskularnim komplikacijama (62).

Molekularni mehanizam nastanka oksidativnog stresa u T2DM primarno je diktiran intenzivnim metabolizmom glukoze. U fiziološkim uslovima, piruvat nastao u procesu glikolize metaboliše se u acetil-koenzim A, koji se dalje oksiduje u ciklusu limunske kiseline, pri čemu se u ovom procesu generišu redukovane forme donora elektrona: nikotinamid-adenin-dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) i flavin-adenin-dinukleotid (engl. *flavoprotein adenine dinucleotide*, FADH<sub>2</sub>), koji su potrebni za dalji proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (63). Tokom stvaranja adenosin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP), respiratorni lanac generiše manje količine ROS, koje uspešno neutrališu enzimi poput superoksid-dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD), katalaze i glutation-peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GPx) (64,65).

U uslovima hronične hiperglikemije nekontrolisani influks glukoze u endotelne, mezangijalne i Švanove ćelije dovodi do prekomernog opterećenja mitohondrija i porasta produkcije superoksidnog anjona. Ovaj inicijalni slobodni radikal oštećuje mitohondrijalnu i jedarnu DNK, usled čega se aktivira nuklearni reparatorni enzim PARP-1 (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase 1*), koji zatim inhibira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, ključni enzim glikolize (62). Usled zastoja u glikolizi akumuliraju se rani intermedijeri glikolitičkog puta, gliceraldehid-3-fosfat i fruktoza-6-fosfat, koji se preusmeravaju u četiri citotoksična puta (Slika 3). Prvi od njih je poliolski put, u kojem se višak glukoze, katalitičkim dejstvom aldoza-reduktaze, konvertuje u sorbitol. Ova reakcija troši velike količine redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH), kofaktora koji je neophodan za obnavljanje najvažnijeg ćelijskog antioksidansa – redukovanog glutaciona (66). Time se narušava antioksidativna odbrana ćelije. Paralelno sa ovim procesom, preusmeravanje fruktoza-6-fosfata u heksozaminski put vodi ka akumulaciji UDP-N-acetilglukozamina (engl. *uridine diphosphate N-acetylglucosamine*), čije vezivanje za transkripcione faktore pojačava ekspresiju TGF-β i inhibitora aktivatora plazminogena-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), što promovise fibrozu i doprinosi disfunkciji endotela (67,68). Treći štetni mehanizam pokreće se akumulacijom gliceraldehid-3-fosfata, koji indukuje *de novo* sintezu DAG. Ovaj intermedijer aktivira različite izoforme PKC, što rezultuje prekomernom ekspresijom VEGF i endotelina-1 i narušavanjem vaskularnog integriteta (69,70). Konačno, preusmeravanje ovih intermedijera podstiče i ubrzano formiranje AGE produkata, koji čine četvrti ključni put ćelijskog oštećenja (71).



**Slika 3. Metabolički putevi razgradnje glukoze**

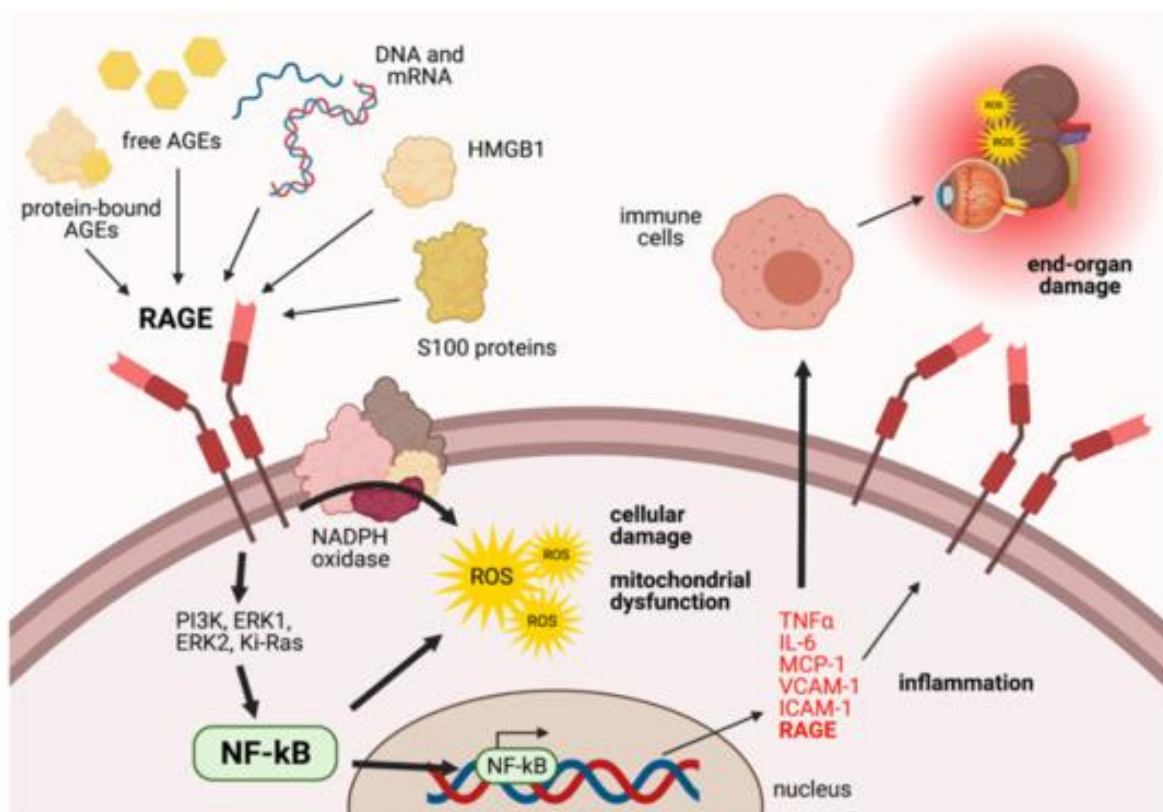
Preuzeto iz Li Y, Liu Y, Liu S, et al. *Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. Signal Transduct Target Ther.* 2023;8:152.

### 1.3.2.2. Krajnji produkti uznapredovale glikacije

Kao posledica preusmeravanja glikolitičkog na alternativne metaboličke puteve akumuliraju se AGE jedinjenja, koja predstavljaju centralne medijatore vaskularnog oštećenja. Ova izuzetno heterogena grupa molekula nastaje neenzimskom reakcijom između karbonilnih grupa redukujućih šećera (glukoze, fruktoze, galaktoze) i slobodnih amino-grupa proteina, lipida ili nukleinskih kiselina (72). Proces, poznat kao Majarova reakcija, započinje formiranjem nestabilnih Šifovih baza, koje kroz Amadorijevo premeštanje prelaze u stabilnije ketoamine, a dalja kaskada oksidacije, dehidracije i polimerizacije vodi ka nastanku ireverzibilnih AGE jedinjenja (72). U zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, AGE se klasifikuju na fluorescirajuće, poput metilgliksal-lizin dimera i pentozidina i nefluorescirajuće, u koje se ubrajaju karboksietil-lizin, karboksimetil-lizin i pirolin (72). Iako je formiranje AGE u osnovi fiziološki proces koji prati biološko starenje organizma, u T2DM njihova endogena sinteza je znatno intenzivnija (73). Pored endogenog porekla, značajan udeo u ukupnom cirkulišućem pulu čine egzogeni izvori, prvenstveno duvanski dim i unos termički obrađene hrane bogate lipidima i proteinima (74,75). Dosadašnja istraživanja potvrdila su da je akumulacija AGE produkata usko povezana sa većim rizikom od progresije T2DM i razvoja komplikacija (76,77).

Patološki efekti ovih produkata ostvaruju se na dva načina: putem direktne strukturne modifikacije proteina i kao posledica aktivacije specifičnih receptora (Slika 4). Prvi mehanizam

podrazumeva strukturnu modifikaciju ekstracelularnog matriksa, gde AGE formiraju ukrštene veze između kolagena i laminina, izuzetno otporne na proteolitičku digestiju (78). Ovaj proces vremenom dovodi do zadebljanja bazalne membrane u vaskularnim endotelnim ćelijama, smanjujući elastičnost vaskularnog zida, što je osnovni mehanizam vaskularne disfunkcije u mikrovaskularnim komplikacijama (78). Pored strukturnih proteina, AGE mogu da modifikuju i funkcionalne cirkulišuće proteine, čime se produbljuje protrombogeni status pacijenata sa T2DM (79). Naime, glikacija fibrinogena rezultuje pojačanom sklonošću ka stvaranju tromba. Dodatni protrombogeni efekti proizilaze iz činjenice da glikozilovane čestice lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) drastično smanjuju produkciju tkivnog aktivatora plazminogena (engl. *tissue plasminogen activator*, tPA) u endotelu, čime se inhibira fibrinoliza (79,80). Glikacija  $\alpha$ -kristalina u oku dovodi do progresivnog gubitka prozirnosti sočiva i povećane disperzije svetlosti, što predstavlja primarni mehanizam u patogenezi dijabetesne katarakte (81). Istovremeno, modifikacija intracelularnih proteina uzrokuje njihovo nepravilno savijanje u endoplazmatskom retikulumu, što može indukovati apoptozu vaskularnih ćelija i neurona, dok vezivanje AGE za komplekse respiratornog lanca direktno redukuje sintezu ATP-a i doprinosi disfunkciji mitohondrija (82–84). Mitohondrijalna disfunkcija praćena je hiperprodukcijom superoksidnog anjona, što iscrpljuje antioksidativne enzime SOD i katalazu i pogoduje daljem razvoju oksidativnog stresa, ali i produkciji AGE jedinjenja, čineći ova dva procesa usko povezanim (82,85,86).



**Slika 4. Patofiziološki mehanizmi citotoksičnog dejstva AGE na vaskularni endotel**

Preuzeto iz: Snelson, M.; Lucut, E.; Coughlan, M.T. The Role of AGE-RAGE Signalling as a Modulator of Gut Permeability in Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1766.

Drugi mehanizam kojim AGE produkti ostvaruju prokoagulantne i proinflamatorne efekte na ćelijskom nivou posredovan je vezivanjem za specifični receptor RAGE (engl. *receptors for advanced glycation end products*) (73). Ovaj transmembranski receptor pripada superfamiliji imunoglobulina i može da prepozna različite ligande; pored AGE produkata, RAGE može da veže širok spektar molekula povezanih sa ćelijskim oštećenjem i inflamacijom, poput amiloida  $\beta$ , S100 proteina, kao i HMGB1 proteina šaperona (engl. *high-mobility group box 1*). Interakcija između AGE i RAGE na površini endotelnih ćelija i makrofaga predstavlja okidač za aktivaciju niza inflamatornih kinaznih puteva – MAPK/ERK, AMPK (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) i JAK/STAT (engl. *janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (87). Ipak, centralni događaj u ovoj signalnoj transdukciji je oslobađanje i translokacija nuklearnog faktora  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B) u jedro, gde stimuliše ekspresiju gena koji kodiraju sintezu proinflamatornih citokina (IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) i adhezionih molekula poput VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*), koji čine okosnicu vaskularnog inflamatornog procesa. Ovaj proces funkcioniše po principu pozitivne povratne sprege. S obzirom na to da se u okviru promotorskog regiona gena za RAGE nalazi vezujuće mesto za NF- $\kappa$ B, inicijalni inflamatorni odgovor direktno stimuliše *de novo* sintezu i ugrađivanje novih RAGE receptora u ćelijsku membranu, čime akutni metabolički stres prelazi u hroničnu inflamaciju (88). Pored toga, RAGE signalizacija potencira aktivnost NADPH-oksidge, dodatno produbljujući stanje oksidativnog stresa (89).

Osim membranski vezanog oblika, RAGE receptor postoji i u solubilnim izoformama u cirkulaciji. Ovaj cirkulišući pul obuhvata endogeno sekretovani RAGE, nastao alternativnim splajsovanjem informacione ribonukleinske kiseline (iRNC), kao i proteolitički otcepljen, solubilni RAGE, koji nastaje dejstvom specifičnih metaloproteinaza na membranski receptor (90). Solubilne izoforme RAGE receptora imaju svojstvo „receptora mamaca“ (engl. *decoy receptors*), koji deluju kao kompetitivni inhibitori AGE, tj. vezuju cirkulišuće AGE produkte i na taj način sprečavaju njihovu interakciju sa receptorima na površini ćelije (91). Upravo zbog ove protektivne uloge, savremena istraživanja ukazuju da se sniženi nivoi solubilnih formi RAGE, kao i narušen odnos koncentracija ukupnih AGE i solubilnih RAGE u plazmi, mogu smatrati osetljivim markerom i nezavisnim faktorom rizika za razvoj vaskularnog oštećenja (92,93).

Svi ovi procesi ostavljaju „metabolički potpis“ na nivou epigenoma, koji može da perzistira i nakon normalizacije glikemije, što predstavlja osnovu fenomena metaboličke memorije, po kome prolazne epizode hiperglikemije mogu imati štetne posledice i godinama nakon normalizacije koncentracije glukoze u krvi (94). Da bi se ovi patološki procesi detektovali u subkliničkoj fazi, od velikog značaja može biti određivanje biomarkera u krvi koji reflektuju efekte na nivou tkiva. U tom smislu, određivanje AGE produkata i parametara redoks statusa može omogućiti ranu identifikaciju i sprovođenje preventivnih mera u cilju sprečavanja daljeg oštećenja i progresije T2DM.

### **1.3.2.3. Hronična inflamacija niskog stepena**

Kod gojaznih osoba, posebno sa visceralnim tipom gojaznosti, insulinskom rezistencijom i T2DM, disfunkcija adipoznog tkiva je u osnovi hronične inflamacije niskog stepena. Hipertrofija adipocita indukuje lokalnu hipoksiju, što dovodi do infiltracije makrofaga, B i T limfocita i posledične aktivacije inflamatornih signalnih puteva (95). Ovim procesom se narušava ravnoteža između sekrecije proinflamatornih i antiinflamatornih adipokina, u korist leptina i citokina poput TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (engl. *interleukin-1 $\beta$* ), IL-6, dok se sekrecija protektivnog adiponektina i antiinflamatornog IL-10 (engl. *interleukin-10*) značajno smanjuje (96,97). Nastalo mikrookruženje uzrokuje polarizaciju makrofaga iz antiinflamatornog M2 u

proinflamatorni M1 fenotip. Ove makrofage postaju predominantni izvor proinflamatornih citokina i hemokina i regrutuju nove monocite iz cirkulacije, čime se održava inflamatorno stanje. Sekretovani citokini remete insulinsku signalizaciju i promovišu apoptozu kroz aktivaciju ključnih inflamatornih puteva. Naime, TNF- $\alpha$  aktivira JNK, koja vrši aberantnu fosforilaciju IRS-1 i IRS-2, čime se blokira normalna transmisija signala sa insulinskog receptora (37). Istovremeno, aktivacija IKK $\beta$  (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\beta$* )/NF- $\kappa$ B signalnog puta dovodi do degradacije I $\kappa$ B inhibitora (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B*) i translokacije NF- $\kappa$ B u jedro, gde se indukuje dalja ekspresija gena za TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-18 (engl. *interleukin-18*), čime se formira pozitivna povratna sprega (98). Osim toga, NF- $\kappa$ B indukuje i ekspresiju gena za inducibilnu azot-monoksid sintazu i sledstvenu produkciju azot-monoksida. Azot-monoksid u reakciji sa superoksidnim anjonom formira izrazito reaktivni peroksinitritni radikal, koji nitracijom tirozinskih ostataka vrši posttranslacionu inhibiciju IRS-1 i dodatno pogoršava insulinsku rezistenciju (99).

Kritični mehanizam koji povezuje inflamaciju sa oštećenjem  $\beta$ -ćelija pankreasa je aktivacija NLRP3 inflamazoma (engl. *NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3*). Ovaj multiproteinski kompleks, sastavljen od NLRP3 senzora, ASC (engl. *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) adaptera i prokaspaze 1, aktivira se pod uticajem različitih faktora kao što su efluks jona kalijuma, lipopolisaharidi (LPS) preko TLR-4 (engl. *toll-like receptor 4*) receptora, kao i ROS posredstvom TXNIP (engl. *thioredoxin-interacting protein*) (100). U uslovima hiperglikemije i oksidativnog stresa ROS uzrokuju oslobađanje TXNIP proteina iz kompleksa sa redoks proteinom tioredoksinom. Slobodan TXNIP može direktno da se veže za NLRP3 senzor i inicira formiranje i aktivaciju inflamazoma (101). Pored uloge u aktivaciji inflamazoma, novije studije su pokazale da je hipometilacija *TXNIP* gena povezana sa T2DM nezavisno od koncentracije proinflamatornih citokina i udružena sa većim koncentracijama glukoze našte i udelom HbA<sub>1c</sub> (102,103).

Aktivacija NLRP3 kompleksa rezultuje proteolitičkim sazrevanjem prekursora IL-1 $\beta$  i IL-18. Aktivna forma IL-18 promoviše apoptozu, što vodi ka ireverzibilnom gubitku funkcionalne mase  $\beta$ -ćelija (104). Inflamatorni odgovor se amplifikuje i aktivacijom JAK/STAT signalnog puta, nakon vezivanja citokina za odgovarajuće receptore (87). Svi ovi putevi igraju suštinsku ulogu u razvoju mikrovaskularnih komplikacija. Aktivacija NF- $\kappa$ B signalnog puta i NLRP3 inflamazoma podstiče akumulaciju fibronektina i kolagena u glomerulima, što dovodi do zadebljanja bazalne membrane i razvoja glomeruloskleroze (95). Aktivnost kaspaze-3 u koži, posredovana aktivacijom NF- $\kappa$ B puta, odgovorna je za otežano zarastanje ulceracija kod DS (105), dok u retini ovaj put zajedno sa hiperprodukcijom ROS održava proapoptotsku signalizaciju u pericitima već u ranim fazama retinopatije (106).

Novije studije naglašavaju da izmenjen sastav mikrobioma kod gojaznih osoba indukuje stanje metaboličke endotoksemije (107). Povećana intestinalna permeabilnost izazvana ishranom bogatom mastima omogućava prodor LPS-a u cirkulaciju, gde se on vezuje za TLR4 i CD14 (engl. *cluster of differentiation 14*) receptore, iznova aktivirajući inflamatorne kaskade koje doprinose održavanju hronične inflamacije (108).

S obzirom na to da cirkulišući citokini imaju primenu kao biomarkeri hronične inflamacije, a da njihovi povišeni nivoi uz snižen adiponektin koreliraju sa izrazito visokim rizikom za razvoj bolesti, dijagnostička evaluacija biomarkera inflamatornog miljea je od izuzetnog značaja (109,110). U fokusu ovog istraživanja su C-reaktivni protein visoke osetljivosti (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP) i kompozitni inflamatorni indeksi. Budući da njihova primena i prognostički kapacitet još uvek nisu dovoljno istraženi u specifičnom kontekstu mikrovaskularnih komplikacija T2DM, to pruža čvrsto naučno opravdanje za njihovu detaljnu evaluaciju u okviru ove disertacije.

## 1.4. Makrovaskularne komplikacije tipa 2 dijabetes melitusa

### 1.4.1. Klinički profil makrovaskularnih komplikacija

Dok mikrovaskularna oštećenja utiču na funkciju specifičnih organa, makrovaskularne komplikacije dijabetesa zahvataju velike krvne sudove i manifestuju se primarno kao koronarna bolest srca, cerebrovaskularne bolesti i periferna arterijska bolest (51). U osnovi ovih komplikacija je ubrzan proces ateroskleroze koji dovodi do sužavanja i okluzije krvnih sudova (51). U poređenju sa opštom populacijom, pacijenti sa T2DM izloženi su 2 do 4 puta većem riziku od KVB, pri čemu je taj rizik posebno naglašen kod žena (111,112). Upravo KVB predstavljaju vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u populaciji pacijenata sa T2DM, obuhvatajući preko 70% smrtnih ishoda koji su direktna posledica koronarnih ili cerebrovaskularnih događaja (54,113). Savremena naučna saznanja ukazuju da, pored tradicionalnih faktora rizika, specifične genetske varijante i epigenetske modifikacije značajno doprinose ukupnom kardiovaskularnom riziku (114).

Težina kardiovaskularnog rizika u T2DM jasno se ogleda u aktuelnim kliničkim smernicama koje T2DM klasifikuju kao ekvivalent koronarne bolesti srca, imajući u vidu da pacijenti sa dijabetesom, čak i bez prethodno dokumentovane istorije koronarne ishemije, imaju identičan rizik od infarkta miokarda i srčanog zastoja kao i pacijenti bez dijabetesa, a koji su doživeli infarkt miokarda (115). Primena kompjuterizovane tomografije pokazala je da subklinička koronarna bolest postoji kod 77% asimptomatskih pacijenata sa T2DM, što naglašava potrebu za ranim skriningom (116). Sa druge strane, cerebrovaskularne bolesti u ishemijskoj i hemoragijskoj formi, uzrokuju moždani udar i fatalne ishode kod preko sedam miliona ljudi godišnje na globalnom nivou (117). Dijabetes trostruko uvećava rizik od moždanog udara, uz ponovo izraženiju osetljivost ženske populacije (114). Iako dugoročne epidemiološke studije beleže porast apsolutnog broja cerebrovaskularnih smrtnih ishoda, primetan je pad starosno standardizovane stope mortaliteta, zahvaljujući značajnom napretku u prevenciji i terapijskim protokolima (118). Genetska osnova ovog rizika rasvetljena je u GWAS studijama, koje su identifikovale 32 genska lokusa povezana sa moždanim udarom, pri čemu stopa heritabilnosti varira u zavisnosti od tipa moždanog udara (119). U tom kontekstu, posebno se izdvajaju geni povezani sa atrijalnom fibrilacijom, poput *PITX2* (engl. *paired-like homeodomain 2*) i *ZFHX3* (engl. *zinc finger homeobox 3*), koji su identifikovani kao nezavisni faktori rizika za ishemijski moždani udar kod belaca (120,121).

Treća manifestacija makrovaskularnih komplikacija – periferna arterijska bolest prisutna je kod približno 30% pacijenata sa T2DM starijih od 65 godina, a najčešće se javlja kod starijih od 50 godina (122). Pravovremena dijagnoza često je otežana prisustvom pridružene neuropatije i gubitka senzibiliteta u donjim ekstremitetima, najčešće prstima stopala, što maskira tipične simptome poput intermitentnih klaudikacija (123). Neotkrivena periferna arterijska bolest nosi izuzetno visok rizik od nastanka ishemijskih ulceracija i posledičnih netraumatskih amputacija donjih ekstremiteta. Zbog toga se preporučuje obavezan skrining merenjem pedobrahijalnog indeksa (engl. *ankle-brachial index*, ABI) kod svih pacijenata starijih od 50 godina, uz reevaluaciju na svakih 5 godina ukoliko su inicijalni nalazi u fiziološkim granicama (124).

Prevenција i terapija makrovaskularnih oštećenja podrazumeva striktnu glikemijsku kontrolu, tretman aterogene dislipidemije, terapiju arterijske hipertenzije i modifikaciju životnog stila (115). Ciljne vrednosti krvnog pritiska su precizno definisane: < 140/90 mmHg za umeren, odnosno < 130/80 mmHg za visoki kardiovaskularni rizik, uz preferencijalnu upotrebu ACEI ili ARB kod pacijenata sa proteinurijom (115). U cilju stabilizacije

aterosklerotskog plaka i redukcije rizika od kardiovaskularnih događaja, preporučena je rana primena statina kod pacijenata starijih od 40 godina (54).

#### **1.4.2. Dislipidemija u tipu 2 dijabetes melitusa**

Dijabetesna dislipidemija je najznačajniji faktor rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa T2DM (125). Razlog leži u proaterogenoj trijadi, koju obrazuju specifične kvantitativne i kvalitativne promene u lipoproteinskom profilu: hipertrigliceridemija, snižena koncentracija HDL-holesterola (engl. *high-density lipoprotein-cholesterol*, HDL-h) i prisustvo malih, gustih LDL čestica (engl. *small dense low-density lipoprotein*, sdLDL) (126). Patogeneza ovog poremećaja započinje u adipoznom tkivu, gde usled insulinske rezistencije izostaje inhibicija hormon-senzitivne lipaze, zbog čega se intenzivira lipoliza i dolazi do nekontrolisanog oslobađanja SMK u cirkulaciju (127). Ovaj patološki priliv SMK u jetru stimuliše prekomernu sintezu VLDL čestica (engl. *very low-density lipoproteins*, VLDL), prvenstveno VLDL1 subfrakcija bogatih trigliceridima (127). Produkcija VLDL čestica je amplifikovana sinergističkim delovanjem hiperinsulinemije, koja preko SREBP1c (engl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*) transkripcionog faktora stimuliše lipogenezu i hiperglikemiju, koja putem ChREBP (engl. *carbohydrate response element-binding protein*) faktora dodatno podstiče biosintezu triglicerida u jetri (36). Istovremeno, defektna insulinska signalizacija onemogućava supresiju sekrecije VLDL čestica, dok kompromitovana aktivnost insulin-zavisne lipoproteinske lipaze drastično usporava njihov klirens iz cirkulacije, što se manifestuje kao hipertrigliceridemija (128,129). Prekomeran broj VLDL čestica u cirkulaciji pokreće kaskadu proaterogenih promena, primarno kroz indukciju aktivnosti holesterol-estar transfernog proteina (engl. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP). Ovaj enzim redistribuirala lipide, prebacujući trigliceride iz VLDL u HDL i LDL čestice, dok istovremeno iz njih preuzima holesterol-estre, pri čemu se stvaraju visoko aterogeni VLDL remnanti bogati holesterolom (130). Iako koncentracija LDL-holesterola (engl. *LDL-cholesterol*, LDL-h) kod pacijenata sa T2DM može ostati u granicama preporučenih vrednosti, kvalitativni sastav ovih čestica je izrazito proaterogen (131). Pod kombinovanim delovanjem CETP-a i hepatične lipaze nastaju male, guste LDL čestice osiromašene holesterolom, koje su prepoznate kao ključni prediktor koronarne bolesti srca (132). Zbog smanjenog afiniteta za LDL receptore, sdLDL se produženo zadržavaju u plazmi i lako penetriraju u subendotelni prostor, gde podležu oksidativnoj modifikaciji pod dejstvom ROS. Makrofage zatim nekontrolisano fagocituju oksidativno modifikovane LDL čestice (engl. *oxidized low-density lipoprotein*, oxLDL) putem receptora hvatača (engl. *scavenger receptors*) (133). Neregulisana akumulacija holesterola transformiše makrofage u penaste ćelije, što predstavlja inicijalnu fazu u formiranju aterosklerotskog plaka. Pored toga, oxLDL ispoljavaju proinflamatorne, imunogene i citotoksične efekte, stimulišući dalju infiltraciju monocita u subendotelni prostor i inhibirajući njihovu pokretljivost, čime se ubrzava progresija vaskularne lezije (134).

Treća komponenta dijabetesne dislipidemije je pad koncentracije HDL-h i gubitak ateroprotektivnih svojstava HDL čestica, pri čemu nastaje tzv. disfunkcionalni HDL. Koncentracija HDL-h obrnuto je srazmerna riziku za razvoj T2DM, s obzirom na to da ove čestice fiziološki pospešuju sekreciju insulina i preuzimanje glukoze u skeletne mišiće (135,136). Ipak, glavni kardioprotektivni mehanizam HDL čestica je reverzni transport holesterola, u kojem nascentne HDL čestice putem interakcije apolipoproteina A-I (apoA-I) sa ABCA1 transporterom (engl. *ATP-binding cassette subfamily A member 1*), preuzimaju holesterol iz perifernih ćelija. Mutacije u genu za ABCA1 narušavaju ovaj proces i značajno povećavaju rizik od T2DM (137). Preuzeti holesterol se zatim esterifikuje posredstvom lecitin-holesterol aciltransferaze (engl. *lecithin-cholesterol acyltransferase*, LCAT), što omogućava

remodelovanje i sazrevanje HDL čestica, iz manjih HDL3 u veće HDL2 subfrakcije. Zrele HDL čestice direktnim ili indirektnim putem transportuju holesterol u jetru radi bilijarne ekskrecije (138). Pored toga, HDL ima važna antioksidativna, antiinflamatorna i antitrombotska svojstva, koja su posredovana apoA-I i protektivnim enzimima poput paraoksonaze-1 (engl. *paraoxonase-1*, PON1), GPx i acetilhidrolaze faktora aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor acetylhydrolase*, PAF-AH), koji efikasno uklanjaju oksidovane fosfolipide iz LDL čestica i štite endotelnu funkciju (139,140). Međutim, pod sinergističkim efektima hiperglikemije, hronične inflamacije i oksidativnog stresa u uslovima T2DM, fiziološki pul HDL subfrakcija (HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b i HDL3c) podleže značajnim strukturnim promenama, što se posledično odražava i na njihovu smanjenu funkcionalnost (141). Kao što je prethodno objašnjeno, povećana aktivnost CETP-a obogaćuje HDL čestice trigliceridima, uz istovremeno smanjenje sadržaja holesterol-estara, čineći ih idealnim supstratom za hepatičnu lipazu, čija je aktivnost dodatno indukovana insulinskom rezistencijom. Pojačana hidroliza triglicerida ubrzava katabolizam HDL-a i disocijaciju apoA-I, što destabilizuje česticu i ubrzava njeno uklanjanje iz cirkulacije (142–144). Kompleksan patološki lipoproteinski profil dodatno pogoršava smanjena funkcija lipoproteinske lipaze, što ograničava *de novo* sintezu nascentnih HDL čestica i dodatno kompromituje reverzni transport holesterola (145).

Poseban značaj u patološkoj transformaciji HDL-a ima proces neenzimske glikacije. Formiranje AGE produkata glikacijom apoA-I remeti efluks holesterola iz perifernih tkiva i reverzni transport holesterola (146,147). Pored toga, glikacijom apoA-I blokira se njegovo vezivanje za LCAT, čime se onemogućava normalno sazrevanje HDL čestice (148,149).

Iako je regulacija koncentracije glukoze osnova terapije T2DM, kod značajnog broja pacijenata vaskularna oštećenja nastavljaju da progrediraju uprkos postizanju dobre metaboličke kontrole. Ovaj fenomen, u literaturi poznat kao metabolička memorija, ukazuje na to da rane epizode hiperglikemije ostavljaju trajne štetne posledice u ćelijama (150). Danas je poznato da molekularnu osnovu ove dugoročne memorije čine epigenetske modifikacije, koje menjaju obrazac ekspresije gena. Zbog toga je proučavanje epigenetskih mehanizama postalo nezaobilazan korak u potpunom razumevanju patofiziologije T2DM i pronalaženju novih terapijskih rešenja.

## 1.5. Metilacija DNK

### 1.5.1. Epigenetske modifikacije u tipu 2 dijabetes melitusa

Genom eukariotskih ćelija organizovan je u kompleksnu makromolekulsku strukturu – hromatin, čiji je primarni nivo organizacije nukleozom. On se sastoji od segmenta DNK dužine približno 146 baznih parova (engl. *base pair*, bp), namotanog oko proteinskog oktamera, sastavljenog od po dva molekula histona H2A, H2B, H3 i H4. Stabilnost ove strukture dodatno osigurava histon H1, koji fiksira ulazne i izlazne niti DNK, omogućavajući formiranje višeg nivoa hromatinske organizacije, čime se postiže kondenzacija genetskog materijala u nuklearni prostor. Ovakva organizacija istovremeno ima i regulatornu funkciju ograničavanjem pristupa transkripcionim faktorima i RNK polimerazi II (151).

Epigenetske modifikacije predstavljaju mitotički i/ili mejotički nasledne promene u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane izmenama u primarnoj sekvenci nukleotida (152). Ovi procesi su dinamični i reverzibilni, a predstavljaju mehanizam adaptacije genoma na različite stimulse iz okoline, uključujući metaboličke faktore, nutritivne i inflamatorne signale (153). Upravo epigenetske modifikacije, koje obuhvataju modifikacije histona, nekodirajuće RNK i metilaciju DNK, koordinišu diferencijalnu ekspresiju gena, čime se definiše specifičan fenotip ćelije unutar istog organizma (154). Kovalentne modifikacije koje se odvijaju na N-terminalnim krajevima histona, poput acetilacije, fosforilacije, krotonilacije, metilacije i ubikvitinacije direktno menjaju fizičko-hemijska svojstva hromatina (155). Na primer, acetilacija lizinskih ostataka, katalizovana histon-acetiltransferazama, neutrališe pozitivno naelektrisanje histona, smanjujući afinitet prema negativno naelektrisanom molekulu DNK. Ovaj proces uzrokuje tranziciju iz transkripciono neaktivnog heterohromatina u aktivnu euhromatinsku formu (156).

Sa druge strane, nekodirajuće RNK (engl. *non-coding RNAs*, ncRNAs) obuhvataju heterogenu grupu funkcionalnih molekula koji se ne translatuju u proteine, već imaju uglavnom regulatornu ulogu (157). Kratki, nekodirajući RNK molekuli – mikroRNK (miRNK, engl. *miRNA*), dužine 21-23 nukleotida, primarno ostvaruju posttranskripcionu represiju vezivanjem za 3' netranslatovane regione ciljnih iRNK, što rezultuje njihovom degradacijom ili prekidom translacije. Pored njih, u kompleksnim procesima regulacije genske ekspresije važnu ulogu imaju i duge nekodirajuće RNK (engl. *long non-coding RNA*, lncRNK) koje se vezuju za hromatin i regrutuju različite regulatorne proteine, kao i cirkularne RNK (engl. *circular RNA*, circRNK), koje svoje dejstvo ostvaruju uglavnom vezivanjem miRNK, čime sprečavaju njihovu interakciju sa ciljnim iRNK molekulima (157).

### 1.5.2. Mehanizam metilacije DNK

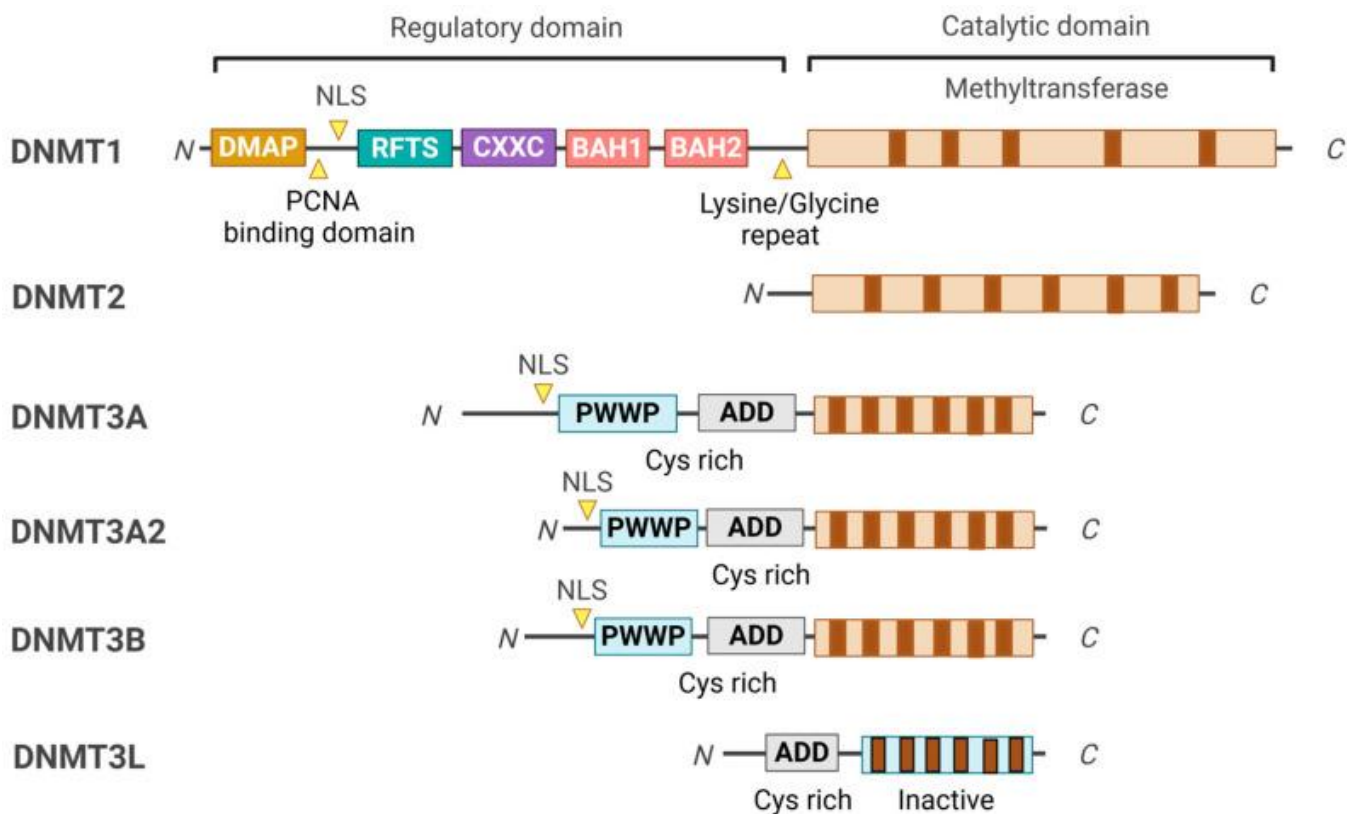
Metilacija DNK je izuzetno stabilna epigenetska modifikacija, ključna za održavanje stabilnosti genoma, inaktivaciju X-hromozoma i genomski imprinting (158). Biohemijski, metilacija DNK predstavlja reakciju kovalentne adicije metil-grupe na peti C-atom citozinskog prstena, čime se formira 5-metilcitozin (5mC) (158). Donor metil-grupe u ovoj reakciji je S-adenozil-L-metionin (SAM), ključni intermedijer u ciklusu metionina. Ova reakcija se kod sisara odigrava primarno u okviru citozin-fosfat-guanin dinukleotida (engl. *cytosine-phosphate-guanine*, CpG) u lancu DNK (159). Iako je 60-80% CpG dinukleotida u genomu metilovano, specifični regioni poznati kao CpG ostrvca, dominantno zastupljeni u promotorskim regionima gena, obično ostaju nemetilovani (160). Hipermetilacija ovih ostrvaca u promotorima gena dovodi do supresije transkripcije na dva načina: metil-grupe sterno ometaju vezivanje transkripcionih faktora za DNK, dok istovremeno privlače proteinske komplekse koji indukuju kondenzaciju hromatina u transkripciono neaktivni heterohromatin (161). Sa druge strane, metilacija CpG u telu gena može imati suprotan efekat, odnosno stimulisati transkripcionu elongaciju i uticati na proces spajanja egzona RNK u primarnom transkriptu, poznat kao splajsovanje gena (159,161). Pretpostavlja se da odsustvo metilacije u regionima CpG ostrvaca može predstavljati mehanizam zaštite od mutacija, kao što je deaminacija 5mC u timin (162).

Metilacija DNK inhibira proces transkripcije gena na dva načina: direktno – inhibicijom vezivanja transkripcionih faktora i indirektno – regrutacijom proteina koji se vezuju za metilovane CpG (engl. *methyl-CpG-binding domain proteins*, MBD), kao što su MeCP2 (engl. *methyl-CpG binding protein 2*), MBD1 (engl. *methyl-CpG-binding domain protein 1*) i MBD2 (engl. *methyl-CpG-binding domain protein 2*) (163). Ovi proteini se specifično vezuju za 5mC i regrutuju histon-deacetilaze i druge proteine sa kojima formiraju transkripciono neaktivan kompleks (164,165). Pored MBD familije proteina, u represiji transkripcije učestvuju i transkripcioni faktori sa strukturom cinkovih prstiju – ZBTB4 (engl. *zinc finger and BTB domain-containing 4*) i ZBTB33 (engl. *zinc finger and BTB domain-containing 33*), koji za razliku od MBD proteina mogu prepoznati i određene nemetilovane sekvence DNK (166). Promene u ekspresiji ovih proteina povezane su sa različitim tipovima kancera, što naglašava njihov značaj u regulaciji ekspresije gena (167).

Proces metilacije DNK koordinišu enzimi DNK metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferases*, DNMT), koji obuhvataju nekoliko izoformi: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L (Slika 5). Ovi enzimi imaju zajednički C-terminalni katalitički domen, sa izuzetkom DNMT3L proteina, koji za razliku od ostalih enzima ne poseduje PWWP (engl. *Proline-Tryptophan-Tryptophan-Proline*) segment i katalitičku aktivnost, već primarnu funkciju ostvaruje kao kofaktor DNMT3A i DNMT3B enzima (168).

Unutar ove familije, DNMT1 ima ključnu ulogu u održavanju već formiranih metilacionih obrazaca tokom replikacije DNK, čime se osigurava prenošenje epigenetskog potpisa tokom mitotičke deobe (169,170). Ovaj enzim ispoljava visok afinitet prema hemimetilovanoj DNK, a regulaciju njegove aktivnosti omogućava interakcija sa E3 ubikvitin ligazom (engl. *ubiquitin-protein ligase*) UHRF1 (engl. *ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*), koja prepoznaje nosivac lanac i regrutuje DNMT1 radi simetričnog uspostavljanja 5mC (171,172). DNMT1 sadrži nekoliko ključnih regulatornih domena (Slika 5): DMAP1-vezujući domen (engl. *DNA methyltransferase-associated protein 1*), PCNA-vezujući domen (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) i domen za ciljanje replikacionih žarišta (engl. *replication foci-targeting sequence*, RFTS), koji usmeravaju enzim ka replikacionom žarištu i olakšavaju njegovo vezivanje; CXXC domen (engl. *zinc finger CXXC domain*) omogućava prepoznavanje ciljnih nemetilovanih CpG mesta, dok BAH domeni (engl. *bromo-adjacent homology domain*, BAH) doprinose strukturnoj stabilnosti i protein-protein interakcijama unutar hromatina (173).

Za razliku od ostalih enzima, DNMT2 nema regulatorni domen, zbog čega iako strukturno pripada DNMT familiji enzima ovaj enzim funkcionalno predstavlja RNK metiltransferazu, koja katalizuje metilaciju transportnih RNK, čime doprinosi stabilnosti i zaštiti od degradacije ovih molekula (174).



**Slika 5. Dominantni strukturni domeni i funkcionalna organizacija DNMT enzima**

Preuzeto iz: Kim, D.J. *The Role of the DNA Methyltransferase Family and the Therapeutic Potential of DNMT Inhibitors in Tumor Treatment*. *Curr. Oncol.* 2025, 32, 88.

Nasuprot funkciji održavanja metilacije, DNMT3A i DNMT3B enzimi su odgovorni za *de novo* metilaciju, kojom se uspostavljaju novi epigenetski obrasci tokom ranog embrionalnog razvoja i ćelijske diferencijacije (175). Ovi enzimi, zahvaljujući PWWP domenu, prepoznaju specifična mesta na histonu, poput H3K36me3 (engl. *histone H3 lysine 36 trimethylation*), čime se njihova aktivnost usmerava ka tačno određenim regionima hromatina (176). Deficijencija ovih enzima dovodi do teških razvojnih defekata i embrionalne smrti, dok se specifične mutacije povezuju sa sindromima imunodeficijencije i malignim oboljenjima (177).

Kod pacijenata sa T2DM promene u ekspresiji ili aktivnosti DNMT enzima predstavljaju važan epigenetski činilac koji doprinosi razvoju hronične inflamacije. Naime, patološka aktivnost ovih enzima dovodi do hipermetilacije i posledičnog utišavanja gena ključnih za održavanje mitohondrijalne funkcije (178). Gubitak ovih protektivnih mehanizama rezultuje teškom mitohondrijalnom disfunkcijom i oslobađanjem mitohondrijalne DNK (engl. *mitochondrial DNA*, mtDNK) u citoplazmu, gde ona biva prepoznata kao signal opasnosti koji aktivira cGAS/STING (engl. *cyclic GMP-AMP synthase/stimulator of interferon genes*) signalni put. Vezivanje citosolne mtDNK za cGAS enzim katalizuje konverziju ATP-a i guanozin trifosfata (engl. *guanosine triphosphate*, GTP) u ciklični guanozin monofosfat-adenozin monofosfat (engl.

*cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*, cGAMP) molekul, koji ima funkciju sekundarnog glasnika i vezuje se za transmembranski STING protein, smešten na endoplazmatskom retikulumu. Aktivacija STING receptora uzrokuje njegove konformacione promene i posreduje u regrutovanju i aktivaciji kinaze TBK1 (engl. *TANK-binding kinase 1*). Aktivirana TBK1 zatim fosforiliše transkripcioni faktor IRF3 (engl. *interferon regulatory factor 3*), koji nakon fosforilacije formira dimere i translocira se u jedro, gde se vezuje za promotorske regione gena i pokreće transkripciju interferona tipa I. Paralelno sa ovim procesom, STING aktivira i NF- $\kappa$ B signalnu kaskadu, što za posledicu ima masivnu produkciju ključnih proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  (179).

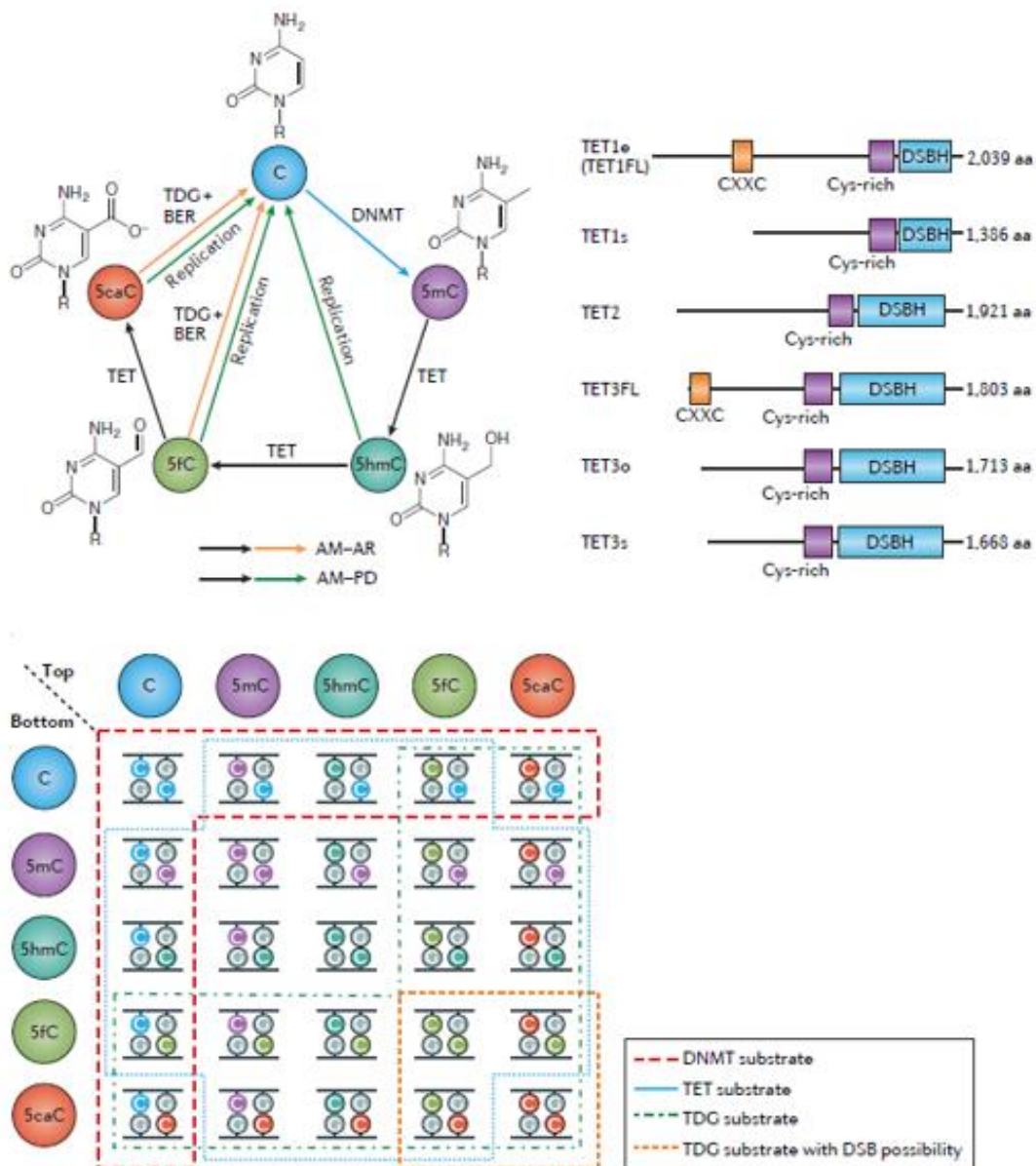
Inhibitori DNMT enzima, poput 5-azacitidina i decitabina su citozinski analozi koji se inkorporiraju u DNK i ireverzibilno inhibiraju DNMT, dovodeći do pasivne demetilacije tokom replikacije. Ovi lekovi su trenutno odobreni za primenu u terapiji mijelodisplastičnog sindroma i akutne mijeloidne leukemije, gde reaktivacijom tumor supresorskih gena suprimiraju malignu proliferaciju (180). U novije vreme, intenzivno se istražuju potencijalni benefiti terapijske primene ovih inhibitora u kontekstu T2DM. Istraživanja su usmerena na ispitivanje mogućnosti reverzije patološke hipermetilacije promotora ključnih gena u insulinskoj signalizaciji, što bi potencijalno poboljšalo funkciju  $\beta$ -ćelija pankreasa i osetljivost na insulin. Pretklinička istraživanja su pokazala da DNMT inhibitori demetilacijom promotorskih regiona omogućavaju ponovnu aktivaciju transkripcionih faktora neophodnih za sekreciju insulina, poput PDX1 (engl. *pancreatic and duodenal homeobox 1*) i MAFA (engl. *MAF BZIP transcription factor A*), čija je ekspresija često suprimirana usled hronične glukotoksičnosti (181). Pored regenerativnog efekta na pankreas, eksperimentalni podaci ukazuju na potencijal DNMT inhibitora u ublažavanju metaboličkog pamćenja, mehanizmom uklanjanja stabilnih epigenetskih markera u vaskularnim i perifernim tkivima, čime bi se smanjila sistemska inflamacija i rizik od hroničnih komplikacija dijabetesa, međutim, ovi efekti se i dalje intenzivno istražuju (182).

### **1.5.3 Mehanizam demetilacije DNK**

Demetilacija DNK je proces suprotan metilaciji i odvija se pasivnim i aktivnim putem. Pasivna demetilacija nastaje kao posledica smanjene aktivnosti DNMT1/UHRF1 kompleksa tokom replikacije, usled smanjene koncentracije ili aktivnosti DNMT1 (183,184). Ovaj vid gubitka metilacije dovodi se u vezu sa globalnom hipometilacijom genoma tokom starenja, a usko je povezan i sa kancerogenezom (185,186). Nasuprot tome, aktivna demetilacija je enzimski proces katalizovan TET dioksidogenazama (engl. *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases*, TET), koje kod sisara postoje u tri izoforme: TET1, TET2 i TET3. Ovi enzimi sukcesivno oksiduju 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksicitozin (5caC) (Slika 6). Završni korak u ovom procesu je popravka isecanjem baza (engl. *base excision repair*, BER), pri čemu timin DNK glikozilaza (engl. *thymine DNA glycosylase*, TDG) prepoznaje i uklanja modifikovanu bazu i zamenjuje je nemodifikovanim citozinom (187). Aktivna demetilacija se u manjoj meri odvija i kao posledica deaminacije 5mC u timin ili 5hmC u 5-hidroksimetiluracil, što takođe aktivira BER sistem (188,189). Iako se prvobitno smatralo da je 5hmC samo prelazna baza u procesu demetilacije, novije studije su potvrdile njeno postojanje kao stabilne epigenetske modifikacije u genomu (190).

Za katalitičku aktivnost TET enzima neophodno je prisustvo dvovalentnog gvožđa i molekularnog kiseonika kao kofaktora, dok je  $\alpha$ -ketoglutarat kosupstrat u reakciji. Katalitički domen ovih enzima smešten je na C-terminalnom kraju i sastoji se od dvostrukog  $\beta$ -heliksa (engl. *double-stranded  $\beta$ -helix*, DSBH), domena bogatog cisteinom (engl. *cysteine rich domain*, CRD) i mesta za vezivanje kofaktora (191). Enzimi TET1 i TET3 imaju N-terminalni CXXC domen sa strukturom cinkovih prstiju koji direktno vezuje CpG mesta, dok TET2 enzim ne

poseduje ovaj domen. Smatra se da je to posledica evolutivne hromozomske inverzije, kojom je CXXC region izdvojen u poseban gen poznat kao *IDAX* (engl. *inhibition of the Dvl and Axin complex*). Shodno tome, modifikacije posredovane TET2 enzimom pretežno su lokalizovane u telima gena i egzonima, a ne u promotorskim regionima (192). Ekspresija i biološka funkcija TET enzima u velikoj meri zavise od tipa ćelije i njenog razvojnog stadijuma. Dok su TET1 enzimi primarno uključeni u održavanje pluripotentnosti i regulaciju transkripcije u embrionalnim i progenitorskim ćelijama, TET2 enzimi su prevashodno eksprimirani u somatskim ćelijama, gde su ključni za stabilnost epigenoma hematopoetskih i imunskih ćelija. Kod različitih maligniteta krvi, uočene su česte mutacije sa gubitkom funkcije (engl. *loss-of-function*) u genu za TET2, što ukazuje na esencijalnu ulogu TET2 enzima u očuvanju integriteta genoma hematopoetskih ćelija (193). Sa druge strane, TET3 enzimi imaju važnu ulogu u epigenetskom reprogramiranju tokom ranog embrionalnog razvoja, kao i u razvoju nervnog sistema (183).



**Slika 6. Mehanizam aktivne demetilacije DNK posredovan TET enzimima.**

Preuzeto i prilagođeno iz Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 2017;18(9):517-534

Aktuelna istraživanja ukazuju da promene u aktivnosti TET enzima i posledični poremećaj procesa aktivne demetilacije predstavljaju važnu kariku koja doprinosi progresiji T2DM i razvoju komplikacija. S obzirom na to da je za katalitičku aktivnost ovih dioksigenaza neophodno prisustvo molekularnog kiseonika, dvovalentnog gvožđa i  $\alpha$ -ketoglutarata, fluktuacije u koncentraciji ovih metaboličkih intermedijera mogu bitno da utiču na funkciju TET enzima (191). U uslovima hronične hiperglikemije, ROS direktno indukuju oksidaciju katalitičkog  $\text{Fe}^{2+}$  u inaktivni  $\text{Fe}^{3+}$  oblik, čime se kompromituje funkcija TET enzima (194). Istovremeno, metabolički disbalans izazvan insulinskom rezistencijom remeti normalan tok ciklusa limunske kiseline, što dovodi do smanjene raspoloživosti  $\alpha$ -ketoglutarata i patološke akumulacije njegovih kompetitivnih inhibitora, poput sukcinata i fumarata (195).

#### 1.5.4. Promena obrazaca metilacije DNK u tipu 2 dijabetes melitusa

Promene obrazaca metilacije DNK u T2DM predstavljaju proces adaptacije genoma na hronično izmenjeno metaboličko okruženje, pri čemu se ovi poremećaji odražavaju na epigenetski profil različitih tipova ćelija. Analizom epigenoma gojaznih osoba i pacijenata sa T2DM, utvrđeno je postojanje sličnih promena u obrascima metilacije, posebno na nivou imunskih ćelija, što potvrđuje da je hronična inflamacija niskog stepena ključna veza između ovih poremećaja (196). Aktivaciju T-ćelijskog odgovora reguliše gen *UBASH3B* (engl. *ubiquitin associated and SH3 domain containing B*), čija hipermetilacija i posledično utišavanje imaju važnu ulogu u prekomernoj aktivaciji T-limfocita i održavanju inflamacije (197). Dodatno, kod gojaznih osoba postoji poremećaj u regulaciji makrofaga, koji se objašnjava prekomernom ekspresijom DNMT3B enzima i posledičnom dominacijom proinflamatornog M1 fenotipa u adipoznom tkivu (198). Slično tome, pokazano je da je prekomerna ekspresija DNMT3A enzima povezana sa insulinskom rezistencijom u adipocitima, te da su ovi efekti posredovani hipermetilacijom gena *FGF21* (engl. *fibroblast growth factor 21*). Ovo utišavanje inhibira ekspresiju FGF21 proteina koji učestvuje u regulaciji insulinske signalizacije (199).

S obzirom na to da je insulinska rezistencija centralni poremećaj u T2DM, promene u diferencijalnoj metilaciji posebno su izražene u jetri, skeletnim mišićima, adipoznom tkivu, ali i endokrinom delu pankreasa. Smanjena sinteza i sekrecija insulina delom je uzrokovana hipermetilacijom gena za insulin i gena *PDX1*, što zajedno sa hipermetilacijom gena *PPARGC1A* (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) i posledičnom redukcijom ekspresije PGC-1 $\alpha$  proteina (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*), remeti insulinsku signalizaciju i oksidativnu fosforilaciju (200). Uz to, promene u metilaciji gena *GPX7* i *GSTT1* (engl. *glutathione S-transferase theta 1*) koji su odgovorni za sintezu odgovarajućih antioksidativnih enzima usko su povezane sa akumulacijom ROS produkata i progresivnim oštećenjem  $\beta$ -ćelija usled oksidativnog stresa (200,201).

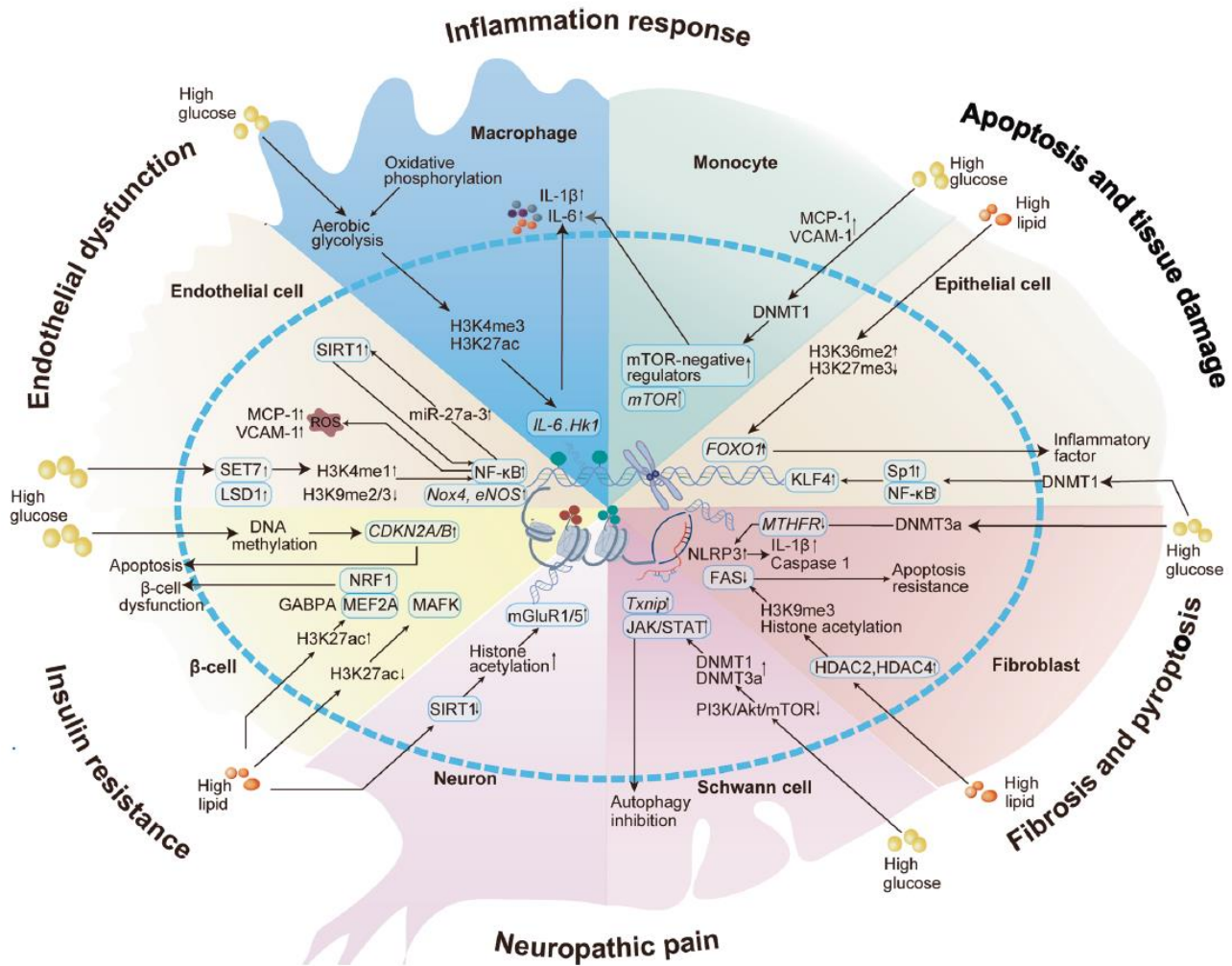
Sa druge strane, kod pacijenata sa T2DM potvrđena je karakteristična hipometilacija gena *MOGAT1* (engl. *monoacylglycerol O-acyltransferase 1*), *GRB10* (engl. *growth factor receptor-bound protein 10*), *ABCC3* (engl. *ATP-binding cassette sub-family C member 3*) i *PRDM16* (engl. *PR domain containing 16*), što se povezuje sa čestim deficitom folata (202). Ovi geni kodiraju sintezu proteina koji sudeluju u regulaciji homeostaze glukoze i metabolizma lipida, insulinskoj signalizaciji i diferencijaciji adipocita, te promene u njihovoj metilaciji utiču na razvoj metaboličke disfunkcije. Hipometilacija gena *MOGAT1* i *PRDM16* u korelaciji je sa povećanim rizikom od nastanka MASLD i steatohepatitisa (203,204). U skeletnim mišićima, hipermetilacija gena *PPARG* i *PPARGC1A*, koji kodiraju PPAR $\gamma$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) i PGC-1 $\alpha$ , povezana je sa mitohondrijalnom disfunkcijom i smanjenom oksidativnom fosforilacijom, što je posebno izraženo kod fizički neaktivnih osoba (205). Dodatno, hipometilacija *DAPK3* gena (engl. *death-associated protein kinase 3*) u T2DM dovodi do povećane ekspresije ovog proteina, koji kao kalcijum/kalmodulin-zavisna kinaza fosforiliše ključne komponente MAPK signalnog puta, što rezultuje njegovom aberantnom aktivacijom i posledičnom inhibicijom insulinske signalizacije (206). Konačno, analiza CpG mesta izolovanih iz adipoznog tkiva otkrila je širok spektar diferencijalno metilovanih CpG mesta u genima kao što su *IL18*, *SIRT2* (engl. *sirtuin 2*) i *HDAC4* (engl. *histone deacetylase 4*), koji su povezani sa insulinskom rezistencijom i disregulacijom adipokina (207–210).

### 1.5.5. Molekularni mehanizmi metaboličke memorije

U patofiziološkoj osnovi T2DM nalaze se međusobno povezani procesi oksidativnog stresa, hronične inflamacije i aterogene dislipidemije, koje pokreće hronična hiperglikemija, a koji vremenom vode ka metaboličkom kolapsu, prema prethodno detaljno opisanim mehanizmima. Ova interaktivna kaskada procesa, u kojoj jedan poremećaj utiče na amplifikaciju ostalih, na molekularnom nivou manifestuje se kroz stabilne modifikacije hromatina koje čine osnovu koncepta metaboličke memorije. Fenomen metaboličke memorije opisuje perzistentnost štetnih efekata nastalih tokom značajnih fluktuacija glikemije, koji opstaju i napreduju i nakon naknadne normalizacije koncentracije glukoze u krvi (94). Ovaj koncept je inicijalno formulisan na osnovu dugogodišnjeg praćenja pacijenata sa T1DM u okviru studije DCCT (engl. *Diabetes Control and Complications Trial*), kao i kroz njenu ekstenziju – EDIC studiju (engl. *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*). Glavni nalaz ovih studija ukazao je na postojanje tzv. efekta nasleđa, a proizilazi iz činjenice da je grupa pacijenata koja je u inicijalnoj fazi bila podvrgnuta intenzivnoj glikemijskoj kontroli zadržala značajno niži rizik od razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija decenijama kasnije, čak i nakon što se udeo HbA<sub>1c</sub> kod pacijenata izjednačio sa kontrolnom grupom (211,212). Slični rezultati dobijeni su i kod pacijenata sa T2DM u okviru studije UKPDS (engl. *United Kingdom Prospective Diabetes Study*), u kojoj je potvrđeno da rana intervencija i striktna glikemijska kontrola u početnim fazama bolesti imaju dugoročan protektivni efekat na kardiovaskularni sistem (213). Savremena interpretacija ovog koncepta prevazilazi okvir hiperglikemije i obuhvata kumulativna tkivna oštećenja indukovana i drugim hroničnim poremećajima u metabolizmu, poput hiperlipidemije i oksidativnog stresa (94).

Aktuelna istraživanja identifikuju epigenetske modifikacije kao fundamentalni mehanizam odgovoran za održavanje metaboličke memorije. Prolazne epizode hiperglikemije generišu stabilne epigenetske otiske na genomu, koji održavaju hronično proinflamatorno stanje, nezavisno od trenutne koncentracije glukoze u krvi (214,215). Jedan od primarnih pokretača ovog procesa je povećana produkcija ROS u mitohondrijama, koja dovodi do trajne aktivacije proinflamatornih signalnih puteva, prvenstveno putem transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B. Hiperglikemija indukuje specifične modifikacije na histonima, kao što je povećana metilacija histona H3 na četvrtom lizinskom ostatku (H3K4me1), što je direktno povezano sa trajnom aktivacijom promotora gena za p65 subjedinicu NF- $\kappa$ B. Ovu modifikaciju katalizuje histon-metiltransferaza Set7, čija povišena aktivnost perzistira i nakon normalizacije nivoa glukoze, čime se obezbeđuje neprekidna transkripcija inflamatornih medijatora (214).

Pored histonskih modifikacija, metilacija DNK predstavlja ključnu komponentu dugoročnog epigenetskog pamćenja. Hiperglikemijski stres izaziva specifične promene u obrascima metilacije na promotorima gena uključenih u antioksidativnu zaštitu i vaskularnu homeostazu, što dovodi do njihovog trajnog utišavanja. Slični efekti primećeni su i kod izloženosti visokim koncentracijama SMK, gde lipidni stres dugoročno menja ekspresiju regulatora metabolizma holesterola kroz stabilno epigenetsko programiranje (216). Poseban značaj ima intrauterina izloženost metaboličkim poremećajima, pri čemu ishrana bogata mastima tokom trudnoće ili gestacijski dijabetes rezultuju stabilnim alteracijama u metilaciji DNK fetusa. Ove promene predisponiraju potomstvo za razvoj MASLD, metaboličkog sindroma i insulinske rezistencije u kasnijem životu, što ukazuje na to da se metabolička memorija može prenositi i intergeneracijski (217).



**Slika 7. Reprogramiranje različitih ćelija pod uticajem hronične hiperglikemije i inflamacije**

Preuzeto iz Dong H, Sun Y, Nie L, Cui A, Zhao P, Leung WK, Wang Q. Metabolic memory: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):38.

U osnovi perzistentnosti metaboličke memorije leži metaboličko reprogramiranje ćelije, gde fluktuacije u nivou intracelularnih metabolita direktno modulišu aktivnost enzima koji održavaju epigenom (Slika 7). Metaboliti kao što su SAM, acetil-koenzim A i  $\alpha$ -ketoglutarat služe kao supstrati ili kofaktori u reakcijama koje katalizuju DNMT, histon-acetiltransferaza i TET enzimi (218). Promena koncentracije ovih intermedijera u uslovima hiperglikemije direktno menja kinetiku epigenetskih modifikacija, transformišući kratkotrajni metabolički stimulus u dugoročni biološki signal. Ovakav mehanizam omogućava ćelijama ne samo brz adaptivni odgovor na stres, već i trajno očuvanje tog odgovora, što objašnjava zašto kasno uvođenje intenzivne terapije često ne može u potpunosti da zaustavi progresiju komplikacija dijabetesa, ukoliko su patološki epigenetski obrasci već uspostavljeni (219).

### **1.5.6. Savremeni metodološki pristupi u ispitivanju metilacije DNK**

Razvoj analitičkih tehnika omogućio je bolje razumevanje značaja epigenetskih modifikacija u razvoju i progresiji T2DM. U zavisnosti od nivoa rezolucije i primarnog cilja istraživanja, ovi pristupi se klasifikuju na tehnike za određivanje stepena globalne metilacije genoma i metode za identifikaciju diferencijalne metilacije unutar specifičnih genskih regiona ili pojedinačnih nukleotida (162). Dok globalna metilacija pruža kumulativni uvid u epigenetski status pojedinca, diferencijalna analiza omogućava precizno mapiranje promena koje direktno modifikuju transkripcionu aktivnost specifičnih gena (208).

#### **1.5.6.1. Određivanje stepena globalne metilacije DNK**

Kvantifikacija globalne metilacije zasniva se na određivanju procentualnog udela 5mC u odnosu na ukupni sadržaj citozina u genomu. Tečna hromatografija visokih performansi (engl. *high-performance liquid chromatography*) sa UV detekcijom (HPLC-UV) predstavlja referentnu metodu koja podrazumeva potpunu enzimsku ili hemijsku hidrolizu DNK do slobodnih nukleotida, nukleozida ili baza pre hromatografskog razdvajanja dezoksicitidina (dC) i 5mC (220). U okviru ove disertacije uvedena je UHPLC-DAD metoda (engl. *ultra-high performance liquid chromatography – diode array detector*) za analizu metilacije DNK izolovane iz mononuklearnih ćelija periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Izbor PBMC kao biološkog materijala opravdan je njihovom dostupnošću putem minimalno invazivnih procedura i visokim stepenom korelacije njihovog epigenetskog statusa sa promenama u teže dostupnim ciljnim tkivima (221).

Iako tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) ima vrhunsku preciznost i zahteva minimalnu količinu polaznog materijala, što je naročito važno za detekciju 5hmC koji je prisutan u tragovima, njenu širu rutinsku primenu ograničavaju visoki troškovi specijalizovane laboratorijske opreme i potreba za visoko obučanim kadrom (222). Sa druge strane, komercijalni ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) testovi predstavljaju bržu alternativu zasnovanu na imunodetekciji, ali se zbog izražene varijabilnosti češće koriste za preliminarna istraživanja nego za apsolutnu kvantifikaciju (223). Alternativni pristupi uključuju LUMA (engl. *luminometric methylation assay*) metodu koja koristi izoizomere – restrikcione enzime koji prepoznaju istu ciljnu DNK sekvencu, ali se razlikuju po osetljivosti na metilaciju. Oba šizoizomera – HpaII (engl. *Haemophilus parainfluenzae II*) i MspI (engl. *Moraxella species I*) prepoznaju citozin-citozin-guanin-guanin (CCGG) motiv, međutim, dok HpaII seče isključivo nemetilovanu DNK, MspI seče navedenu sekvencu nezavisno od njenog statusa metilacije. Kvantifikacijom i poređenjem njihove enzimске aktivnosti omogućava se indirektna procena metilacije unutar CCGG motiva (224). Pored toga, primenjuju se i testovi zasnovani na određivanju metilacije repetitivnih elemenata poput LINE-1 (engl. *long interspersed nuclear element-1*), koji služe kao surogat marker za procenu globalnog statusa metilacije genoma (225).

#### **1.5.6.2. Metode za analizu diferencijalne metilacije**

Većina protokola za ispitivanje specifičnih genskih regiona oslanja se na prethodnu bisulfitnu konverziju, koja predstavlja zlatni standard za pripremu uzorka za određivanje metilacionog statusa na nivou pojedinačne baze (226). Ovaj hemijski tretman dovodi do

deaminacije nemetilovanog citozina u uracil, koji se tokom amplifikacije PCR (engl. *polymerase chain reaction*) tehnikom očitava kao timin, dok metilovani citozin ostaje intaktan (227).

U domenu sekvenciranja, WGBS (engl. *whole-genome bisulfite sequencing*) omogućava uvid u kompletan epigenom, dok se RRBS (engl. *reduced representation bisulfite sequencing*) tehnika fokusira na regione bogate CpG ostrvcima, čime se optimizuju troškovi i vreme analize (228). Za analizu specifičnih lokusa primenjuju se tehnike poput kvantitativnog metilaciono-specifičnog PCR-a (engl. *quantitative methylation-specific PCR*, qMSP) (229). Kao ključna metoda za analizu metilacije pojedinačnih CpG mesta ističe se pirosekvenciranje, metoda sekvenciranja DNK u realnom vremenu zasnovana na detekciji svetlosnog signala koji nastaje kao posledica enzimske reakcije indukovane oslobađanjem pirofosfata u trenutku inkorporacije nukleotida u rastući lanac. Zahvaljujući visokoj rezoluciji i reproducibilnosti, pirosekvenciranje se smatra zlatnim standardom za analizu metilacije ciljanih genomskih regiona. Primenjuje se nakon bisulfitne konverzije DNK, kojom se nemetilovani citozini prevode u uracil i očitavaju kao timini, dok metilovani ostaju nepromenjeni, omogućavajući tako preciznu kvantifikaciju stepena metilacije na nivou svakog pojedinačnog CpG mesta, izraženu kao procenat metilovanog citozina u odnosu na ukupan citozin detektovan na datoj poziciji (230).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sveobuhvatno sagledavanje razvoja i progresije T2DM ukazuje na to da vaskularne komplikacije nisu samo proizvod trenutnih metaboličkih poremećaja, već rezultat akumuliranog i epigenetski memorisanog stresa. U tom kontekstu, globalna metilacija DNK u cirkulišućim imunskim ćelijama nameće se kao potencijalno najrelevantniji biomarker, koji integriše efekte dugotrajne hiperglikemije, proaterogene dislipidemije i narušenog redoks balansa. Iako su pojedinačni faktori rizika detaljno izučeni, nedostaju jasni dokazi o tome kako njihova sinergija modifikuje ukupni epigenetski status i doprinosi perzistenciji metaboličke memorije kod pacijenata sa različitim stepenom vaskularnih oštećenja. Upravo ta potreba za detaljnim uvidom u povezanost između biomarkera redoks statusa, markera inflamacije, dislipidemije i epigenetskih markera čini osnovu istraživačkog pristupa ove disertacije.

Na temelju izloženih naučnih saznanja i uočenih nedostataka u literaturi, definisani su ciljevi ovog istraživanja:

- Uvođenje i optimizacija UHPLC-DAD metode za određivanje stepena globalne metilacije DNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi;
- Ispitati razliku u stepenu globalne metilacije DNK kod pacijenata sa T2DM i kontrolne grupe;
- Ispitati razlike u koncentraciji biomarkera redoks statusa, dislipidemije i inflamacije kod pacijenata sa T2DM i kontrolne grupe;
- Ispitati razlike u stepenu globalne metilacije DNK i koncentraciji biomarkera redoks statusa, dislipidemije i inflamacije u odnosu na prisustvo hroničnih komplikacija;
- Ispitati vezu između biomarkera redoks statusa, dislipidemije i inflamacije sa stepenom globalne metilacije DNK;
- Utvrditi kardiometaboličke faktore rizika koji utiču na stepen globalne metilacije DNK kod pacijenata sa T2DM.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Učesnici u studiji

Ova studija preseka dizajnirana je kao multicentrično istraživanje, realizovano kroz saradnju sa tri zdravstvene ustanove: Kliničko-bolničkim centrom „Zvezdara“, Kliničko-bolničkim centrom „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ i Opštom bolnicom u Požarevcu. Osnovni kriterijum za uključivanje ispitanika bila je prethodno potvrđena dijagnoza T2DM, postavljena u skladu sa smernicama Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje dijabetes melitusa (20). U cilju formiranja homogene kohorte i eliminacije faktora koji bi mogli značajno uticati na ispitivane biomarkere, kriterijumi za isključivanje iz studije bili su prisustvo autoimunskih, malignih ili hematoloških oboljenja, teške bubrežne insuficijencije ( $GFR < 30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ), akutnih ili hroničnih oboljenja jetre, kao i prisustvo bilo kakve akutne inflamatorne bolesti u periodu od četiri nedelje pre uzorkovanja krvi. U istraživanje su uključeni isključivo pacijenti bez dokumentovane anamneze ili aktuelne potvrde COVID-19 infekcije. Ovakav rigorozan pristup bio je neophodan kako bi se eliminisali potencijalni efekti post-kovid sindroma na sistemsku inflamaciju, oksidativni stres i mikrovaskularni integritet, s obzirom na to da su pacijenti sa dijabetesom prepoznati kao posebno osetljivi na perzistentne komplikacije nakon virusne infekcije (231). Finalnom analizom obuhvaćeno je 107 pacijenata, prosečne starosti  $62,0 \pm 11,3$  godina. Kontrolna grupa (KG) formirana je od 56 zdravih dobrovoljaca koji su regrutovani na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu. Demografski podaci su prikupljeni putem upitnika, dok su podaci o kliničkim parametrima obezbeđeni od strane nadležnih lekara. Demografski parametri obuhvatili su: starost, pol, trajanje T2DM, telesnu visinu, navike u konzumiranju cigareta i alkohola, nivo fizičke aktivnosti i režim ishrane. Od kliničkih parametara ubeleženi su: vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, obim struka, lična i porodična anamneza, podaci o propisanoj terapiji, kao i prisustvo specifičnih hroničnih komplikacija dijabetesa. Kliničke definicije primenjene u studiji podrazumevale su definisanje hipertenzije na osnovu vrednosti sistolnog pritiska  $\geq 130 \text{ mmHg}$  i/ili dijastolnog pritiska  $\geq 80 \text{ mmHg}$ , izmerenih u najmanje dva navrata ili na osnovu dokumentovane primene antihipertenzivne terapije. Nutritivni status i gojaznost procenjeni su izračunavanjem ITM, kao odnosa telesne mase izražene u kilogramima i kvadrata telesne visine izražene u metrima. U skladu sa važećim preporukama SZO, vrednost ITM  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  korišćena je kao kriterijum za gojaznost. Prisustvo anemije definisano je na osnovu koncentracije hemoglobina  $< 120 \text{ g/L}$ .

Istraživanje je planirano i sprovedeno u saglasnosti sa etičkim principima Helsinške deklaracije. Svi učesnici u istraživanju, kako pacijenti sa T2DM tako i zdravi dobrovoljci, bili su detaljno upoznati sa ciljevima i protokolom studije, a svaki ispitanik je potpisao obrazac informisanog pristanka za učešće i odobrio korišćenje biološkog materijala u istraživačke svrhe. Istraživanje je odobreno od strane nadležnih Etičkih odbora svih uključenih zdravstvenih ustanova: Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ (odluka od 15.10.2020), Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ (odluka br. 01-5656/24 od 24.04.2019) i Opšte bolnice u Požarevcu (odluka br. 7190/2020 od 30.12.2020), kao i Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta (odluka br. 2566/3 od 19.11.2024.).

### 3.2. Biološki materijal

Uzorkovanje venske krvi obavljeno je u jutarnjim časovima, nakon noćnog gladovanja od najmanje 8 do 12 sati. Za prikupljanje uzoraka korišćeni su standardizovani komercijalni vakutejneri bez antikoagulansa za dobijanje seruma, kao i vakutejneri sa K<sub>2</sub>EDTA (engl. *dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid*) antikoagulansom, koji su namenski korišćeni za analizu krvne slike, određivanje nivoa HbA<sub>1c</sub>, izolovanje plazme i ekstrakciju PBMC.

Nakon primarne obrade uzoraka koja je podrazumevala centrifugiranje prema standardnim laboratorijskim protokolima, izdvojeni serum i plazma su alikvotirani u epruvete manjih zapremina. Ovaj postupak je sproveden kako bi se izbegli ponavljani ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja koji bi mogli narušiti stabilnost osetljivih biomarkera. Izolovanje PBMC frakcije sprovedeno je neposredno nakon uzorkovanja krvi radi maksimalnog očuvanja ćelijskog integriteta i epigenetskog profila. Pripremljeni alikvoti seruma, plazme i PBMC peleta uskladišteni su u zamrzivačima na temperaturi od -80 °C do momenta izvođenja analiza. Određivanje rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara izvršeno je u biohemijskim laboratorijama zdravstvenih ustanova, dok su specijalizovane analize redoks statusa, lipoproteinskog profila i epigenetskih modifikacija realizovane u istraživačkim laboratorijama Katedre za medicinsku biohemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i Katedre za biohemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta.

### 3.3. Biomarkeri metaboličke kontrole

Određivanje koncentracije glukoze i udela HbA<sub>1c</sub> predstavljalo je osnovu za procenu metaboličke kontrole ispitanika. Koncentracija glukoze u serumu određena je standardizovanim enzimskom metodom sa heksokinazom na automatskom biohemijском analizatoru Dimension RxL Max (Siemens, Erlangen, Nemačka). Za kvantifikaciju udela HbA<sub>1c</sub> primenjena je imunoturbidimetrijska metoda na analizatoru Innova Star istog proizvođača. Sva navedena biohemijсka određivanja sprovedena su uz strogo poštovanje laboratorijskih protokola i principa dobre laboratorijske prakse.

#### 3.3.1. *Određivanje koncentracije krajnjih produkata uznapredovale glikacije*

Nivo AGE jedinjenja u serumu kvantifikovan je optimizovanim spektrofluorimetrijskom metodom, na osnovu protokola koji su prvobitno opisali Kalousova i saradnici (232). Analitički princip ove metode zasniva se na intrinzičnom svojstvu specifičnih cirkulišućih AGE molekula, poput pentozidina i kroslina, da emituju karakterističnu fluorescenciju pri određenim talasnim dužinama, što omogućava njihovu direktnu i brzu detekciju u kompleksnom biološkom matriksu seruma bez potrebe za obeležavanjem specifičnim fluoroforama.

Procedura pripreme uzoraka obuhvatala je razblaživanje 20 µL seruma sa 980 µL fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) pH 7,4 čime je postignut faktor razblaženja od 1:50. Nakon temeljne homogenizacije uzoraka na vorteks mešalici, 300 µL pripremljenog radnog rastvora preneto je u mikrotitarske ploče sa 96 bunara, sa crnim zidovima i ravnim prozirnim dnom, koje su specifično dizajnirane za fluorimetrijska merenja kako bi se minimizovalo rasipanje svetlosti i interferencija između susednih uzoraka. Intenzitet emitovane fluorescencije meren je korišćenjem mikrotitarskog spektrofluorimetra Appliskan (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija) sa softverskim paketom SkanIt Software 2.3 RE. Merenja su izvedena pri ekscitacionoj talasnoj dužini od 355 nm i emisionoj talasnoj dužini od 460 nm. Radi kontrole osnovnog signala i oduzimanja pozadinske fluorescencije, kao slepa proba korišćen je čist PBS. Svi biološki uzorci analizirani su u triplikatu, a prosečna vrednost uzeta je kao konačan rezultat za svakog pacijenta radi osiguravanja visoke reproducibilnosti metode. Dobijeni rezultati su izraženi u arbitrarnim jedinicama fluorescencije po mililitru seruma (AU/mL). Kako bi se eliminisao potencijalni uticaj individualnih varijacija u proteinskom sastavu seruma na ukupnu količinu vezanih AGE produkata, rezultati su dodatno korigovani u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina u serumu i prikazani kao AU/g proteina.

### 3.4. Biomarkeri redoks statusa

Parametri redoks statusa određeni su primenom spektrofotometrijskih metoda na automatskom biohemijskom analizatoru ILAB 300 Plus (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija) ili na mikrotitarskom spektrofotometru SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka), uz korišćenje standardizovanih i optimizovanih protokola. Analizirani su biomarkeri oksidativnog oštećenja: produkti uznapredovale oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP), totalni oksidativni status (engl. *total oxidant status*, TOS), prooksidativno-antioksidativni balans (engl. *prooxidant-antioxidant balance*, PAB), ishemijom modifikovani albumin (engl. *ischemia-modified albumin*, IMA) i malondialdehid (engl. *malondialdehyde*, MDA), kao i biomarkeri antioksidativne zaštite: PON1, SOD, totalni antioksidativni status (engl. *total antioxidant status*, TAS) i ukupne sulfhidrilne grupe (engl. *sulfhydryl groups*, SH-grupe).

#### 3.4.1. Određivanje prooksidativnih biomarkera

Za kvantifikaciju koncentracije AOPP, kao osetljivog biomarkera hroničnog oksidativnog stresa, primenjena je adaptirana spektrofotometrijska metoda prema Witko-Sarsatu i saradnicima (233). Biohemijski princip metode zasniva se na sposobnosti cirkulišućih AOPP da u prisustvu glacijalne sirćetne kiseline indukuju oksidaciju kalijum-jodida, što dovodi do generisanja stabilnog obojenog kompleksa, čija se apsorbcija meri na talasnoj dužini od 340 nm. Kao slepa proba korišćen je PBS. Finalna koncentracija izračunata je uz pomoć regresione jednačine kalibracione krive formirane serijskim razblaženjima hloramina T, a rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol/L}$ , što se odnosi na ekvivalent hloramina T.

Ukupni nivo oksidativnog opterećenja seruma procenjen je određivanjem TOS vrednosti prema metodi koju je razvio Erel (234). Metoda se zasniva na sposobnosti prisutnih oksidanasa (prvenstveno vodonik-peroksida i lipidnih hidroperoksida) da u kiseloj sredini oksiduju fero jon iz *o*-dianizidnog kompleksa u feri jon. Feri jon zatim sa ksilenil-oranžom gradi obojeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 560 nm. Kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracione krive konstruisane merenjem apsorbcije vodenih rastvora vodonik-peroksida poznatih koncentracija (opseg 10 do 200  $\mu\text{mol/L}$ ).

Integrativna procena redoks ravnoteže izvršena je određivanjem PAB vrednosti. Ova metoda omogućava simultano merenje prooksidativnog kapaciteta, koji reprezentuje vodonik-peroksid, i antioksidativnog kapaciteta, koji reprezentuje mokraćna kiselina, u istom uzorku (235). U prisustvu vodonik-peroksida i peroksidaze, hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) oksiduje se u plavo obojeni kompleks, dok u reakciji sa mokraćnom kiselinom, ili drugim donorima elektrona, formira bezbojni proizvod. Intenzitet obojenja korelira sa odnosom prooksidanasa i antioksidanasa u uzorku. Rezultati su izračunati pomoću kalibracione krive, formirane na osnovu merenja serije standardnih rastvora sa različitim, unapred definisanim odnosima vodonik-peroksida i mokraćne kiseline. S obzirom da PAB ne meri koncentraciju specifičnog molekula, već ukupnu reaktivnost seruma u odnosu na standard, ovaj integrativni kapacitet izražava se u arbitrarnim jedinicama (U/L).

Vrednosti IMA određene su kolorimetrijskom metodom prema Bar-Oru i saradnicima (236). Metoda se zasniva na činjenici da albumin nakon izlaganja oksidativnom stresu i ishemiji gubi sposobnost vezivanja jona prelaznih metala na svom N-terminalnom kraju. Nakon inkubacije seruma sa rastvorom kobalt-(II)-hlorida dodaje se ditiotreitol, koji sa preostalim, nevezanim jonima kobalta formira obojeni kompleks. Apsorbancija se meri na talasnoj dužini

od 470 nm, a rezultati se izražavaju u AU, pri čemu veća vrednost apsorbanije ukazuje na viši nivo IMA, odnosno manje vezanog kobalta.

Stepen lipidne peroksidacije procenjen je merenjem koncentracije MDA spektrofotometrijskom metodom po Esterbaueru (237). Reakcija se zasniva na zagrevanju uzorka u kiseloj sredini u prisustvu tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid*, TBA), pri čemu nastaje ružičasto obojeni kompleks, čija se apsorbanija meri na talasnoj dužini od 535 nm. Kao standard je korišćen rastvor MDA u TBA-reagensu, koji je dobijen rastvaranjem TBA i hlorovodonične kiseline u destilovanoj vodi. Koncentracija MDA je izračunata upotrebom kalibracione krive dobijene serijskim razblaženjima standarda u opsegu od 1 do 10 mmol/L.

### **3.4.2. Određivanje antioksidativnih biomarkera**

Aktivnost enzima PON1 određena je modifikovanom metodom koju su opisali Richter i saradnici (238). Ovaj enzim katalizuje hidrolizu supstrata paraoksiona do *p*-nitrofenola u alkalnoj sredini. Brzina formiranja produkta praćena je kontinuiranim merenjem promene apsorbanije na talasnoj dužini od 405 nm. Reakcija je izvođena uz dodatak natrijum-hlorida kao aktivatora enzima, a aktivnost je izražena u internacionalnim jedinicama po litru (IU/L).

Procena antioksidativne zaštite obuhvatala je određivanje TAS, čija je vrednost dobijena primenom modifikovane metode po Erelu (239). Antioksidansi prisutni u serumu redukuju i obezbojavaju stabilni, smaragdnazeleni katjonski radikal ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)). Step en obezbojavanja, meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 660 nm, srazmeran je ukupnom antioksidativnom kapacitetu uzorka. Kalibraciona kriva je konstruisana korišćenjem serijskih razblaženja sintetskog analoga vitamina E, Trolox-a u opsegu od 0,125 do 2 mmol/L), a rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol/L}$  Trolox ekvivalenata.

Sadržaj ukupnih SH-grupa određen je primenom Ellmanove metode (240). U alkalnoj sredini (pH 9,0), Elmanov reagens – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB) reaguje sa slobodnim tiolnim grupama iz uzorka, pri čemu nastaje žuto obojeni 5-tio-2-nitrobenzoat. Intenzitet apsorbanije na talasnoj dužini od 412 nm direktno je proporcionalan koncentraciji SH-grupa, koja se izračunava pomoću prethodno konstruisane kalibracione krive.

Aktivnost enzima SOD u serumu određena je adaptiranom metodom koju su inicijalno opisali Misra i Fridovich (241). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu, autooksidaciju adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od superoksidnog anjona na pH 10,2. Oksidacijom adrenalina nastaje adrenohrom sa maksimumom apsorbanije na 480 nm. Prisustvo SOD u uzorku ubrzava dismutaciju superoksida, uklanjajući ga iz reakcione smeše i time usporavajući formiranje adrenohroma. Promena apsorbanije praćena je kontinuirano tokom 3 minuta. Jedna internacionalna jedinica definisana je kao količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u definisanim uslovima. U cilju optimizacije testa, korišćena je koncentracija adrenalina koja u kontrolnoj probi, bez SOD, daje promenu apsorbanije od 0,025/min. Aktivnost enzima u uzorku (X) izračunata je primenom sledeće proporcije:

$$0,0125 : 1\text{IU} = [0,025 - (\Delta A_{\text{analize}}/\text{min})] : X$$

Konačna aktivnost SOD, izražena u IU/L, dobijena je množenjem vrednosti X sa faktorom razblaženja uzorka i prevođenjem na zapreminu od jednog litra.

### 3.5. Biomarkeri inflamacije

Kvantifikacija hsCRP, kao indikatora hronične inflamacije niskog stepena, sprovedena je primenom standardne imunoturbidimetrijske metode visoke osetljivosti na automatskom biohemijском analizatoru Dimension RxL Max (Siemens, Erlangen, Nemačka). Parametri kompletne krvne slike određeni su na automatskom hematološkom analizatoru Sysmex XN-1000 (Sysmex, Kobe, Japan). Za diferencijalnu analizu leukocita i brojanje retikulocita primenjena je fluorescentna protočna citometrija dok je broj eritrocita i trombocita određen metodom impedance sa hidrodinamičkim fokusiranjem. Koncentracija hemoglobina izmerena je primenom metode sa natrijum lauril-sulfatom.

Na osnovu dobijenih vrednosti apsolutnog broja leukocita, specifičnih leukocitarnih subpopulacija i ukupnog broja trombocita, izračunat je panel kompozitnih inflamatornih indeksa koji zavise od ravnoteže između urođenog i adaptivnog imunskog odgovora, čime se obezbeđuje sveobuhvatnija procena sistemskog inflamatornog statusa. Ovi izvedeni parametri obuhvataju: odnos broja neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR), odnos broja neutrofila i ukupnog broja leukocita (engl. *neutrophil-to-white blood cell ratio*, NWR), kao i odnos broja monocita i limfocita (engl. *monocyte-to-lymphocyte ratio*, MLR). Dodatno, izračunati su i odnos broja monocita i ukupnog broja leukocita (engl. *monocyte-to-white blood cell ratio*, MWR), odnos broja limfocita i ukupnog broja leukocita (engl. *lymphocyte-to-white blood cell ratio*, LWR), te odnos broja trombocita i limfocita (engl. *platelet-to-lymphocyte ratio*, PLR). Pored ovih odnosa, u analizu su uključeni i složeniji kompozitni indeksi: indeks sistemskog inflamatornog odgovora (engl. *systemic inflammation response index*, SIRI), sistemski imuno-inflamatorni indeks (engl. *systemic immune-inflammation index*, SII) i sveobuhvatna imuno-inflamatorna vrednost (engl. *pan-immune-inflammation value*, PIV). Vrednosti ovih složenih indeksa izračunate su primenom sledećih formula, pri čemu parametri predstavljaju apsolutni broj odgovarajućih krvnih ćelija:

$$SIRI = \frac{\text{broj neutrofila} \cdot \text{broj monocita}}{\text{broj limfocita}}$$

$$SII = \frac{\text{broj trombocita} \cdot \text{broj neutrofila}}{\text{broj limfocita}}$$

$$PIV = \frac{\text{broj neutrofila} \cdot \text{broj trombocita} \cdot \text{broj monocita}}{\text{broj limfocita}}$$

### 3.6. Biomarkeri dislipidemije

Koncentracije parametara lipidnog statusa u serumu koje obuhvataju ukupni holesterol (engl. *total cholesterol*, TC), trigliceride (engl. *triglycerides*, TG) i HDL-h, određene su rutinskim enzimskim metodama na automatskom biohemijijskom analizatoru AU480 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija). Za određivanje koncentracije TC korišćena je metoda sa holesterol-oksidadom, za određivanje koncentracije TG metoda sa glicerol-3-fosfat-oksidadom dok je HDL-h određen direktnom enzimskom metodom bez prethodnog taloženja. Koncentracija LDL-h izračunata je primenom Friedewald-ove jednačine, u slučajevima kada koncentracija TG nije prelazila 4,52 mmol/L:  $LDL-h = TC - HDL-h - TG/2,2$ . Koncentracija non-HDL-holesterola (engl. *non-high-density lipoprotein cholesterol*, non-HDL-h) izračunata je iz razlike ukupnog i HDL-h (242).

#### 3.6.1. Određivanje aktivnosti LCAT i CETP enzima

Aktivnost LCAT i CETP određena je primenom modifikovane metode, prema protokolu koji su opisali Asztalos i saradnici (243). Metoda se zasniva na praćenju kinetike esterifikacije holesterola i njegovog transfera između lipoproteinskih čestica tokom kontrolisane inkubacije.

Aktivnost LCAT procenjena je na osnovu brzine esterifikacije slobodnog holesterola (engl. *free cholesterol*, FC) u uzorcima plazme. Princip se zasniva na kvantifikaciji razlike u koncentraciji FC pre i nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 37 °C, tokom 2 sata. S obzirom na to da LCAT katalizuje prenos masne kiseline sa lecitina na FC, smanjenje koncentracije FC u plazmi korelira sa porastom koncentracije holesterol-estara (engl. *cholesteryl esters*, CE), što predstavlja meru enzimске aktivnosti. Koncentracija FC određena je na automatskom analizatoru Mindray BS200E (Mindray Bio-Medical Electronics Co., Šenžen, Kina) uz upotrebu komercijalnih reagenasa (Bioanalytica, Beograd, Srbija).

Za evaluaciju aktivnosti CETP, koji posreduje u transferu CE od HDL čestica ka lipoproteinskim česticama bogatim apolipoprotein B (apoB) proteinom (VLDL i LDL), bilo je neophodno najpre izdvojiti HDL frakciju tehnikom precipitacije. Postupak je obuhvatio sledeće korake: u 200  $\mu$ L plazme dodato je 400  $\mu$ L precipitirajućeg reagensa (BioSystems, Barcelona, Spain), nakon čega je smeša homogenizovana na vorteks mešalici i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 10 000 g u trajanju od 5 minuta, čime je postignuto taloženje čestica koje sadrže apoB, dok se HDL frakcija izdvojila u supernatantu. U izolovanom supernatantu merene su koncentracije FC i TC pre i posle dvočasovne inkubacije. Stepenn transporta CE, posredstvom CETP, definisan je kao razlika između ukupne stope smanjenja FC i porasta CE unutar HDL frakcije u jedinici vremena. Sve izmerene koncentracije FC i TC u HDL frakciji korigovane su faktorom razblaženja od 3,5.

Finalne aktivnosti LCAT i CETP izračunate su primenom sledećih jednačina:

Aktivnost LCAT ( $\mu$ mol/L/h)

$$LCAT = (FC_{pre\ inkubacije} - FC_{posle\ inkubacije}) \times 500$$

Aktivnost CETP ( $\mu$ mol/L/h)

$$CETP = LCAT - \left[ \frac{(TC\ u\ HDL_{posle\ ink.} - FC\ u\ HDL_{posle\ ink.}) - (TC\ u\ HDL_{pre\ ink.} - FC\ u\ HDL_{pre\ ink.})}{2} \right] \times 1000$$

### 3.6.2. Određivanje raspodele HDL i LDL subfrakcija

Lipoproteinske LDL i HDL subfrakcije su analizirane primenom vertikalne elektroforeze na nedenedurirajućem poliakrilamidnom gradijent gelu, sa opsegom koncentracije akrilamida od 3% do 31%. Metoda se zasniva na modifikaciji protokola koji su postavili Rainwater i saradnici (244,245). Razdvajanje lipoproteinskih subfrakcija na gradijentnom gelu zasniva se na razlikama u veličini, obliku i površinskom naelektrisanju čestica. Primenom jednosmerne struje pod konstantnim naponom čestice migriraju kroz pore gela, čija se veličina progresivno smanjuje, sve dok ne dostignu tačku u kojoj veličina pore gela onemogućava dalju migraciju čestice na osnovu njenog prečnika.

Za formiranje gradijenta korišćen je sistem za izlivanje Hoefer SE 675 i dve peristaltičke pumpe Masterflex L/S (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills, SAD). Gradijent je formiran kontrolisanim mešanjem dva rastvora monomera u TRIS puferu (tris(hidroksimetil)aminometan, pH 8,3). Prvi rastvor je sadržao 3% akrilamida (28,8 g/L akrilamida i 1,2 g/L bis-akrilamida), dok je drugi rastvor sadržao 31% akrilamida (292,5 g/L akrilamida i 17,05 g/L bis-akrilamida). Polimerizacija je inicirana *ex tempore*, dodatkom amonijum-persulfata i tetrametilen-diamina. Specifičnost protokola ogleda se u formiranju 13 segmenata gradijenta, nakon čega se u dno nosača kasetnih ploča (dimenzija 16 x 18 cm, debljina 1,5 mm) upumpava 70% glicerol. Polimerizacija gelova odvijala se tokom 12 do 16 časova na sobnoj temperaturi.

Elektroforeza je izvođena u kadi *Hoefer SE 600 Ruby* (Amersham Pharmacia Biotech, Beč, Austrija) na konstantnoj temperaturi od 8 °C, kako bi se sprečila termička denaturacija lipoproteina. Korišćen je elektroodni TRIS-boratni pufer (90 mmol/L TRIS, 80 mmol/L borna kiselina, 2,7 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,35). Režim rada obuhvatio je početnu fazu aktivacije gela na 290 V, u trajanju od 50 minuta, nakon čega je usledila višestepena separacija koja je završena razdvajanjem na 300 V u trajanju od 20 časova. Pre nanošenja, uzorci su obojeni bromfenol plavim, a uporedo je analiziran i standard humane plazme. Nakon završetka elektroforeze, gelovi su fiksirani u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline. Lipoproteinske frakcije su selektivno obojene Sudan Black B bojom (Merck, Darmštat, Nemačka), dok su proteinski standardi obojeni Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom (Sigma, Sent Luis, SAD). Za određivanje dijametara čestica korišćena je kalibraciona smeša proteina velike molekulske mase (GE Healthcare, Čikago, SAD), koja obuhvata tireoglobulin (17 nm), feritin (12,2 nm), laktat dehidrogenazu (8,4 nm) i albumin (7,1 nm), kao i karboksilovane polistirenske čestice prečnika od 40 nm.

Digitalna obrada gelova izvršena je skeniranjem na uređaju Image Scanner III (Amersham Pharmacia Biotech, Beč, Austrija) i denzitometrijskom analizom elektroforegrama u softveru Image Quant, verzija 5.2 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornija, SAD). Ova analiza omogućila je određivanje dijametara lipoproteinskih čestica i relativnih udela četiri LDL subfrakcije: LDL I (27,2-28,5 nm), LDL II (25,5-27,2 nm), LDL III (24,2-25,5 nm) i LDL IV (22,0-24,2 nm) i pet HDL subfrakcija: HDL2b (9,7-12,0 nm), HDL2a (8,8-9,7 nm), HDL3a (8,2-8,8 nm), HDL3b (7,8-8,2 nm) i HDL3c (7,2-7,8 nm). Veličina čestica je izračunata na osnovu regresione jednačine prirodnog logaritma dijametara standardnih proteina u funkciji njihove relativne migracione udaljenosti u odnosu na albumin. Relativni udeo svake analizirane subfrakcije izražen je kao procenat ukupne površine ispod krive (engl. *area under the curve*, AUC) odgovarajuće lipoproteinske klase na denzitogramu. Udeo sdLDL čestica izračunat je kao zbir relativnih udela LDL III i LDL IV subfrakcija.

### 3.7. Određivanje stepena globalne metilacije DNK

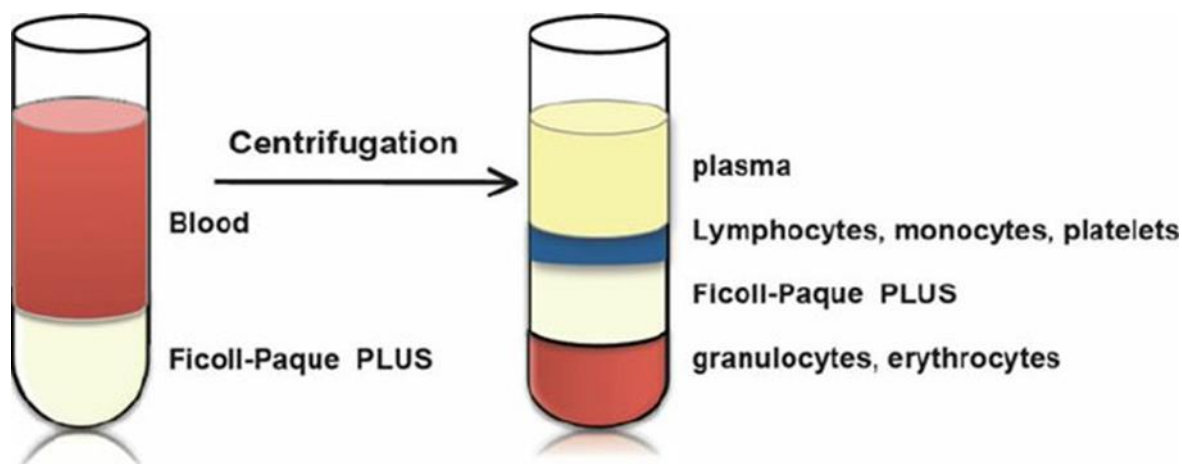
Određivanje stepena globalne metilacije DNK (udela 5mC) predstavljalo je značajan analitički izazov, usled ograničene količine genetskog materijala izolovanog iz PBMC-a, otežane rastvorljivosti precipitirane genomske DNK i uticaja integriteta uzorka na samu hromatografsku analizu. Svi enzimski hidrolizati su pripremani neposredno pred hromatografsko analiziranje kako bi se minimizovala degradacija slobodnih nukleozida. Za hromatografiju je korišćen UHPLC sistem UltiMate™ 3000 Basic Automated System spregnut sa DAD detektorom (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD). Hromatografski uslovi su optimizovani u laboratoriji Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, a metoda je bazirana na radu Crescentija i saradnika (246). Celokupan analitički proces obuhvatao je 5 sukcesivnih faza: izolovanje PBMC frakcije, ekstrakciju genomske DNK, proveru integriteta i kvantifikaciju DNK, enzimsku hidrolizu DNK do slobodnih nukleozida, korišćenjem komercijalnog enzimskog kompleksa *DNA Degradase Plus™* (Zymo Research, Irvajn, SAD) i finalnu UHPLC-DAD analizu.

Iako se enzimskom hidrolizom DNK genetski materijal razlaže do nivoa slobodnih dezoksinukleozida, te se hromatografski zapravo kvantifikuju 2'-deoksicitidin i 5-metil-2'-dezoksicitidin, u daljem tekstu ove disertacije koristiće se opšteprihvaćeni termin 5-metilcitozin (5mC), radi doslednosti i usklađenosti sa standardnom nomenklaturom.

#### 3.7.1. Izolovanje PBMC iz leukocitnog sloja

Frakcija PBMC izolovana je iz leukocitnog sloja (engl. *buffy coat*), metodom centrifugiranja na gradijentu gustine, korišćenjem Ficoll-Paque™ PLUS rastvora (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Prvobitno je puna venska krv centrifugirana 10 minuta na 1800 g, čime je postignuto razdvajanje krvi na tri sloja: gornji sloj plazme, srednji beličasti sloj koji sadrži leukocite i trombocite i donji sloj eritrocita. Nakon pažljivog uklanjanja plazme, leukocitni sloj je Pasterovom pipetom pažljivo prebačen u epruvetu sa 2 mL PBS pufera. Dobijena suspenzija je, uz maksimalnu pažnju radi očuvanja integriteta gradijenta, naneta na Ficoll-Paque™ PLUS rastvor i centrifugirana 30 min na 700 g, korišćenjem rotora sa pokretnim uglovima bez kočenja centrifuge Eppendorf 5804R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Mononuklearne ćelije se nakon centrifugiranja pozicioniraju u srednjem sloju, u vidu tankog, beličastog prstena na interfazi između plazme i fikola (Slika 8). Ove ćelije pažljivo su sakupljene, prenete u manje epruvete i podvrgnute seriji ispiranja. Svaki ciklus ispiranja sastojao se od resuspendovanja ćelijskog taloga u PBS puferu, centrifugiranja u trajanju od 8 min na 800 g na Mini Spin centrifugi (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i naknadnog pažljivog odlivanja supernatanta. Ovi ciklusi su ponavljani sve do dobijanja vizuelno čisto belog taloga. U slučajevima gde je uočeno prisustvo rezidualnih eritrocita, uveden je dodatni korak lize pomoću amonijačnog pufera (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, EDTA). Dobijeni prečišćeni pelet PBMC je potom zamrznut i čuvan na temperaturi od -80 °C do momenta ekstrakcije DNK.



**Slika 8 - Šematski prikaz izolovanja PBMC na gustinskom gradijentu Ficoll-Paque PLUS**

Preuzeto iz: Bharadwaj M, Mifsud NA, McCluskey J. Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods Mol Biol.* 2012;882:309-37

### 3.7.2. Ekstrakcija genomske DNK

Genomska DNK je ekstrahovana upotrebom komercijalnog seta FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka), uz primenu uputstva optimizovanog za 500  $\mu$ L leukocitnog sloja. Pre samog procesa lize, pelet PBMC je odmrznut inkubacijom na 37 °C uz blago mešanje u termomešaču, nakon čega je pripremljen radni rastvor proteaze K u FG2 (engl. *FlexiGene 2*) puferu. Liza ćelijskih membrana postignuta je dodavanjem 1250  $\mu$ L FG1 pufera i centrifugiranjem u trajanju od 20 sekundi na 10 000 g. Dobijeni pelet jedara je resuspendovan u 500  $\mu$ L smeše FG2 pufera i proteaze K (10  $\mu$ L rekonstituisane proteaze na 1 mL uzorka) i odmah homogenizovan na vorteks mešalici, kako bi se osigurala kompletna denaturacija proteina. U slučajevima nepotpune vizuelne homogenizacije, dodavano je dodatnih 30  $\mu$ L FG2 pufera, u skladu sa uputstvom proizvođača. Nakon inkubacije uzorka u trajanju od 10 minuta na 65 °C, genomska DNK je precipitirana dodatkom 500  $\mu$ L 100% izopropanola sve do pojave karakterističnih beličastih niti. Precipitirana DNK je zatim isprana 70% etanolom i sušena na vazduhu radi potpunog uklanjanja rezidualnog alkohola, koji bi mogao interferirati sa daljim analizama. U poslednjem koraku ekstrakcije genomska DNK je rastvorena u 200  $\mu$ L FG3 pufera uz sporu hidraciju i inkubaciju od 2 sata na 65 °C.

### 3.7.3. Provera integriteta i kvantifikacija DNK

Za preciznu kvantifikaciju genomske DNK korišćen je spektrofotometar SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Nemačka) u kombinaciji sa LVis pločom koja je posebno dizajnirana za kvantifikaciju nukleinskih kiselina u minimalnim zapreminama uzorka. Kao slepa proba korišćen je FG3 pufer, a svi uzorci su analizirani u duplikatu. Kvantifikacija i procena čistoće izolovane DNK postignuta je merenjem apsorbanције na četiri ključne talasne dužine. Apsorbanција na 260 nm korišćena je za procenu koncentracije DNK, dok je merenje apsorbancije na 230 nm služilo za detekciju kontaminanata, organskih rastvarača i soli, a na 280 nm za detekciju kontaminacije proteinima i aminokiselinama. Kako bi se eliminisao uticaj nespecifičnog rasipanja svetlosti usled eventualnog prisustva čestica i zamućenja uzorka, od svih izmerenih vrednosti oduzimana je pozadinska apsorbanција očitana na 340 nm.

Stepen čistoće izolovane DNK procenjivan je na osnovu specifičnih odnosa ovih apsorbanacija. Odnos  $A_{260}/A_{280}$  korišćen je kao indikator proteinske kontaminacije, pri čemu su kao optimalne prihvatane vrednosti od približno 1,8. Istovremeno, odnos  $A_{260}/A_{230}$  služio je za procenu kontaminacije reagensima za izolovanje DNK, sa ciljnom vrednošću od oko 2,2. Za dalju enzimsku hidrolizu i hromatografsku analizu selektovani su isključivo uzorci koji su pokazali adekvatan stepen čistoće i sadržali minimalnu ukupnu količinu od 6 µg DNK.

#### **3.7.4. Enzimaska hidroliza DNK**

Imajući u vidu da se podaci i preporuke u literaturi o optimalnom odnosu enzima za hidrolizu DNK i supstrata značajno razlikuju u zavisnosti od biološkog matriksa i željenog stepena digestije, deo eksperimentalne faze bio je posvećen standardizaciji ovog analitičkog koraka (247). Svi hidrolizati su pripremani *ex tempore*, neposredno pre hromatografskog razdvajanja, kako bi se maksimalno očuvao integritet nukleozida. Standardna reakciona smeša ukupne zapremine 25 µL sastojala se od 12 µL rastvora DNK (koncentracije 500 ng/µL), 2,5 µL desetostruko koncentrovanog reakcionog pufera, 1 µL enzimske smeše i 9,5 µL duplo destilovane vode (ddH<sub>2</sub>O). Ova reakciona smeša je inkubirana u trajanju od 2 sata na temperaturi od 37 °C, nakon čega je usledila obavezna termička inaktivacija enzima na 70 °C tokom 20 minuta, čime je zaustavljena dalja katalitička aktivnost.

Uspešnost enzimske degradacije genomske DNK i optimizacija uslova hidrolize kontinuirano su proveravani metodom elektroforeze na 1% agaroznom gelu u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-acetat, 1 mmol/L EDTA, pH 8,24). U svrhu detaljne procene kvaliteta uzorka i efikasnosti hidrolize u zavisnosti od koncentracije enzima, temperature i vremena inkubacije, na gel su paralelno nanošeni kontrolni uzorci (netretirana genomska DNK), tretirani uzorci (enzimski hidrolizati dobijeni preparatom DNA Degradase Plus) i referentni molekularni marker GeneRuler™ (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD). Pre samog nanošenja, uzorcima je dodat odgovarajući pufer za otežavanje i praćenje migracije, koji sadrži 0,25% bromfenol-plavog, 0,25% ksilen-cijanola i 30% glicerola.

Elektroforetsko razdvajanje je izvođeno u sistemu Submarine Mini-gel Electrophoresis Unit (Hoeffer, Voltam, SAD), uz upotrebu ispravljača EPS 300 pri konstantnom naponu od 80 V. Proces elektroforeze je prekidano u trenutku kada je boja bromfenol-plavo migrirala do približno dve trećine ukupne dužine gela. Vizualizacija razdvojenih DNK fragmenata postignuta je inkubacijom gela u rastvoru etidijum-bromida (0,5 µg/mL) u trajanju od 20 minuta, nakon čega je sprovedeno obezbojavanje gela u puferu tokom narednih 20 minuta, radi smanjenja pozadinskog zračenja. Gelovi su analizirani na UV transiluminatoru (Vilber-Lourmat, Koležjen, Fransuska) pri talasnoj dužini od 312 nm, a digitalno dokumentovanje rezultata obavljeno je kamerom Nikon Coolpix P340, uz primenu specijalizovanog filtera Deep yellow 15.

Relativna kvantifikacija stepena degradacije genomske DNK sprovedena je preciznom denzitometrijskom analizom digitalizovanih slika gela, korišćenjem skenera visoke rezolucije Image Scanner III (Amersham Pharmacia Biotech, Beč, Austrija). Obrada podataka i ekstrakcija denzitometrijskih parametara postignuta je korišćenjem softverskog paketa Image Quant, verzija 5.2 (Molecular Dynamics, Sanivejl, SAD). Odsustvo traka visoke molekulske mase na denzitogramu predstavljalo je potvrdu potpune i uspešne enzimske hidrolize genomske DNK, što je bio preduslov za prelazak na UHPLC-DAD analizu.

### 3.7.5. UHPLC-DAD metoda

Nukleozidi 5mC i dC kvantifikovani su metodom reverzno-fazne hromatografije na UHPLC-DAD sistemu. Separacija je zasnovana na njihovoj različitoj hidrofobnosti i afinitetu prema stacionarnoj fazi. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je analitička kolona ZORBAX Eclipse Plus C18 (95 Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm) sa odgovarajućom zaštitnom pretkolonom ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 x 12,5 mm; Agilent Technologies, Santa Klara, SAD), čija primena je osigurala produžen vek trajanja analitičke kolone i dodatnu zaštitu od nakupljanja nečistoća iz biološkog matriksa. Kao mobilna faza korišćena je smeša metanola i vode. Separacija je izvedena primenom razvijenog programa gradijentne elucije pri konstantnom protoku od 1 mL/min, dok je temperatura kolone održavana na 30 °C. Režim elucije započeo je izokratskom fazom sa 5% metanola tokom prvih 10 minuta analize, nakon čega je usledio linearan gradijent do 100% metanola u periodu od 10. do 15. minuta. Ispiranje kolone 100% metanolom trajalo je narednih 10 minuta (do 25. minuta analize). Povratak na inicijalni sastav mobilne faze od 5% metanola postignut je između 25. i 30. minuta, dok je preostalo vreme do isteka ukupnog trajanja analize od 60 minuta iskorišćeno za reekvilibraciju kolone.

Koncentracije analita određene su na osnovu kalibracionih krivih konstruisanih korišćenjem komercijalnih standarda u opsegu od 0,078 do 5 ng/µL za 5mC i od 0,313 do 20 ng/µL za dC. Obrada podataka i integracija dobijenih pikova sprovedeni su upotrebom softvera Chromeleon™ Chromatography Data System, verzija 7.2.4.8179 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD). Step globalne metilacije DNK izražen je kao procentualni udeo 5mC u ukupnom sadržaju citozina prema sledećoj jednačini:

$$5mC, \% = \frac{c(5mC)}{c(5mC)+c(dC)} \times 100$$

### 3.8. Određivanje biohemijskih parametara

Serumske koncentracije parametara bubrežne funkcije određene su na automatskom biohemijskom analizatoru Dimension RxL Max (Siemens, Erlangen, Nemačka), uz upotrebu komercijalnih reagenasa. Koncentracija uree određena je enzimskom metodom sa ureazom, koncentracija mokraćne kiseline enzimskom metodom sa urikazom, a koncentracija kreatinina Jaffé-ovom metodom. Koncentracija ukupnih proteina u serumu određena je biuretskom metodom, a albumina metodom sa bromkrezol zelenim. Za izračunavanje procenjene brzine glomerulske filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) korišćena je MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*, MDRD) jednačina.

### 3.9. Statistička obrada podataka

Tip distribucije kontinuiranih varijabli procenjen je primenom Shapiro-Wilk testa. Podaci koji prate normalnu raspodelu prikazani su kao srednje vrednosti sa pripadajućim standardnim devijacijama, dok su varijable koje značajno odstupaju od normalne distribucije predstavljene kao medijane sa interkvartilnim rasponom. Kategoričke varijable su iskazane kroz apsolutne i relativne frekvencije.

Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između posmatranih grupa korišćen je Studentov t-test za nezavisne uzorke u slučaju normalno distribuiranih podataka, odnosno Mann-Whitney U test za neparametarske varijable. Za komparaciju parametarskih podataka između tri nezavisne grupe primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) sa Tukey *post hoc* testom, dok je za neparametarske podatke u ovu svrhu korišćen *Kruskal-Wallisov* test. Za naknadna višestruka poređenja između grupa korišćen je Mann-Whitney U test uz Bonferronijevu korekciju  $p$  vrednosti. Analiza povezanosti kategoričkih podataka sprovedena je primenom Chi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa ili Fisherovog testa, u zavisnosti od očekivanih frekvenciji u tabelama kontingencije. Za evaluaciju korelacije između kontinuiranih varijabli primenjena je Spearmanova korelaciona analiza.

Analiza povezanosti ispitivanih parametara izvršena je primenom multiple linearne regresione analize i binarne logističke regresione analize. Dijagnostička tačnost i diskriminaciona sposobnost kreiranih modela procenjene su metodom analize ROC krive (engl. *Receiver Operating Characteristic*). Površina ispod krive interpretirana je prema Hosmer-Lemeshow kriterijumima, gde vrednosti AUC između 0,5 i 0,7 ukazuju na slabu, vrednosti od 0,7 do 0,8 na prihvatljivu, vrednosti od 0,8 do 0,9 na odličnu, dok vrednosti veće od ili jednake 0,9 označavaju izuzetnu diskriminacionu sposobnost modela.

U cilju redukcije dimenzionalnosti skupa podataka i rešavanja potencijalnog problema multikolinearnosti, primenjena je analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) sa varimaks (engl. *varimax*) rotacijom i normalizacijom. Ekstrahovani su faktori sa sopstvenom vrednošću (engl. *eigenvalue*) većom od 1, pri čemu su u finalne komponente uključene isključivo varijable sa faktorskim opterećenjem iznad 0,5. Ovako generisani faktori su zatim implementirani kao prediktori u binarnoj logističkoj regresionoj analizi kako bi se ispitala njihova nezavisna povezanost sa hipometilacijom genomske DNK, koja je u ovoj studiji definisana kao vrednost procentualnog udela 5-metilcitozina ispod 25. percentila raspodele kod pacijenata sa T2DM (5mC < 3,40%).

Celokupna statistička obrada podataka realizovana je u softverskom paketu PASW Statistics, verzija 18 (PASW Statistics, Čikago, SAD). Kao granična vrednost statističke značajnosti prihvaćen je nivo verovatnoće od  $p < 0,05$ .

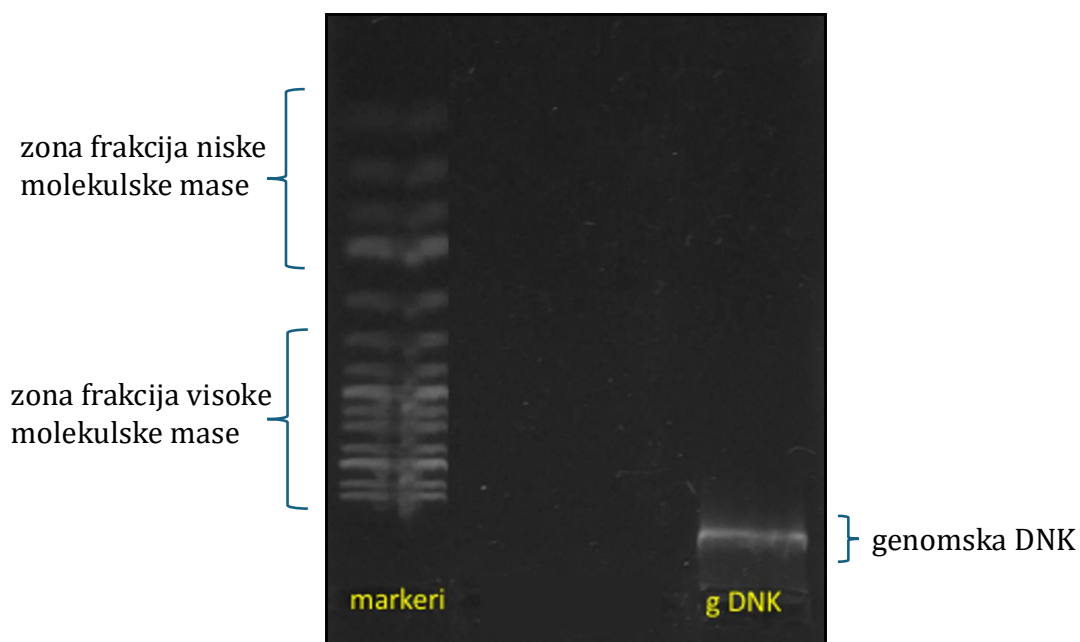
## 4. REZULTATI

### 4.1. Optimizacija UHPLC-DAD metode za određivanje stepena globalne metilacije DNK

S obzirom na to da je globalna metilacija DNK marker podložan preanalitičkim varijacijama, posebno u kontekstu enzimske hidrolize, prvi deo istraživanja bio je fokusiran na evaluaciju integriteta i čistoće izolovane genomske DNK, optimizaciju eksperimentalnog protokola kao i postavljanje hromatografskih uslova u cilju brze i efikasne separacije 5mC i dC, kao i razdvajanja 5mC i 5hmC.

#### 4.1.1. Evaluacija integriteta i čistoće izolovane genomske DNK

Pre same enzimske hidrolize, integritet i kvalitet genomske DNK (gDNK), izolovane iz PBMC uzoraka, provereni su metodom elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Kao referentni standard za procenu veličine fragmenata korišćen je komercijalni GeneRuler marker u vidu tzv. lestvica, koji predstavlja standardizovanu smešu DNK molekula poznatih molekulskih masa (250-10000 bp). Vizualizacijom gelova, za uzorak obeležen kao gDNK identifikovana je jasna i intenzivna traka u zoni razdvajanja frakcija visoke molekulske mase. U slučaju parcijalne degradacije uzorka usled nasumičnog pucanja lanaca, umesto jedne oštre trake na gelu bi se uočio karakterističan vertikalni trag, odnosno degradacioni razmaz (engl. *smear*), koji bi se prostirao ka zonama niže molekulske mase. Odsustvo ovakvog razmaza u navedenim zonama niske molekulske mase (Slika 9) na dobijenom elektroforegramu potvrđuje očuvanje intaktne strukture genomske DNK, kao i odsustvo kontaminacije RNK.



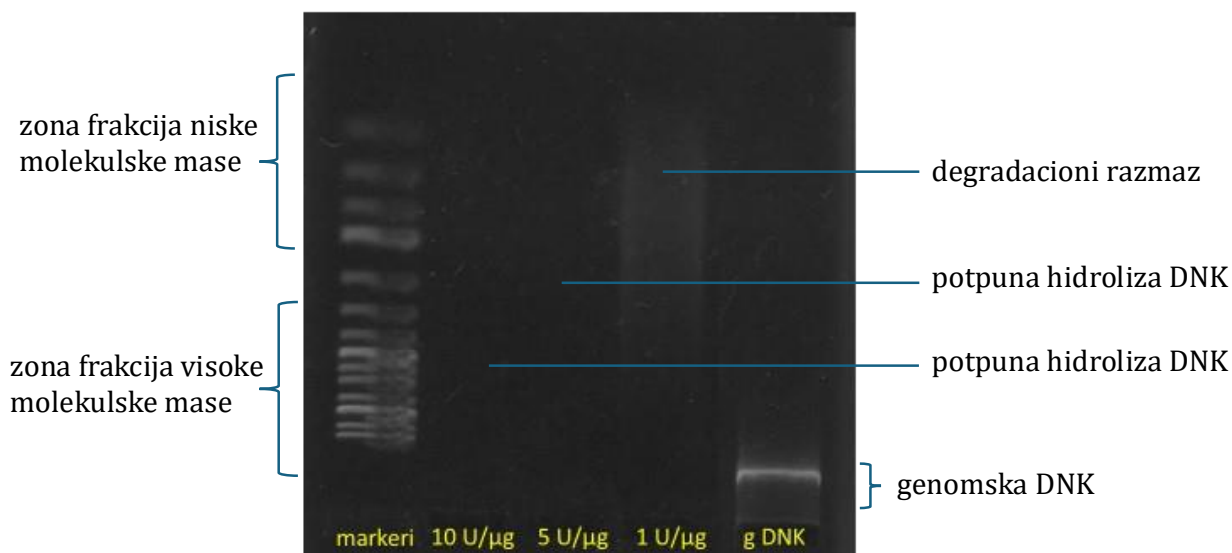
**Slika 9. Provera integriteta genomske DNK i efikasnosti enzimske hidrolize metodom elektroforeze na 1% agaroznom gelu**

Spektrofotometrijskom analizom izvršena je provera čistoće i kvantifikacija DNK. Utvrđen je prosečan prinos DNK od 307,4 ng/ $\mu$ L, čime je osigurana adekvatna količina uzorka za izvođenje svih analiza u duplikatu. Evaluacija čistoće sprovedena je merenjem apsorbancija na 230 nm, 260 nm i 280 nm, na osnovu kojih su izračunati relevantni odnosi. Izračunate vrednosti odnosa  $A_{260}/A_{280}$  bile su iznad 1,7, čime je isključeno prisustvo proteinske kontaminacije koja bi mogla interferirati sa enzimskom aktivnošću u narednim koracima. Dodatno, vrednosti odnosa  $A_{260}/A_{230}$  veće od 2,0 potvrdile su odsustvo rezidualnih soli i fenola poreklom iz korišćenih reagenasa tokom procesa izolacije. Dobijeni parametri potvrđuju odličnu čistoću i kvalitet uzoraka za dalju epigenetsku analizu.

#### **4.1.2. Optimizacija uslova enzimske hidrolize genomske DNK**

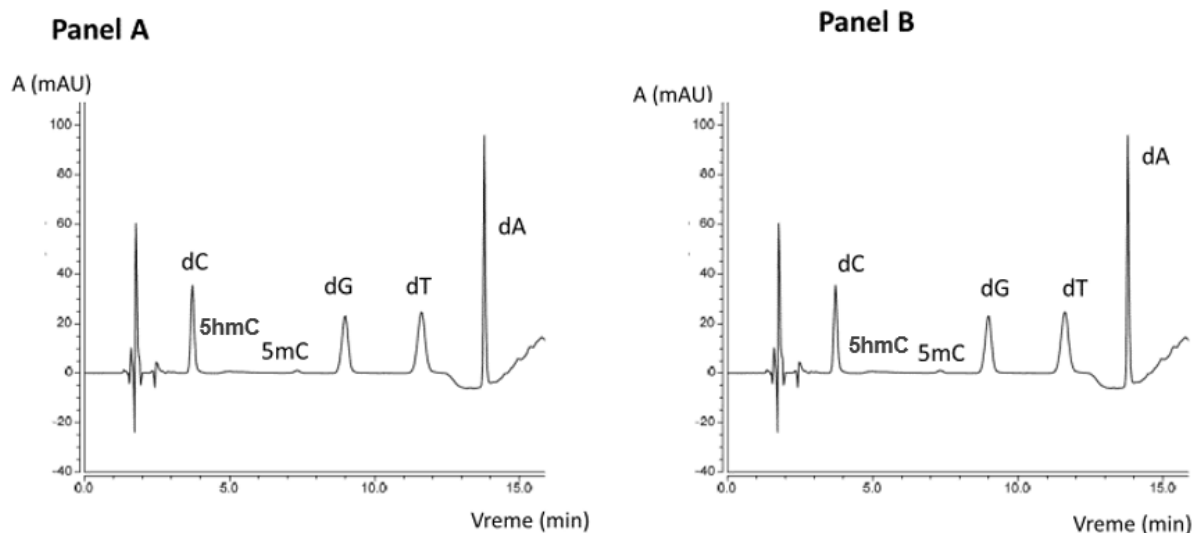
U inicijalnoj fazi istraživanja sprovedena je detaljna optimizacija procesa enzimske hidrolize gDNK primenom komercijalnog enzimskog kompleksa DNA Degradase Plus. Primarni cilj optimizacije bio je postizanje potpune degradacije DNK do pojedinačnih nukleozida, s obzirom na to je nekompletna hidroliza čest preanalitički uzrok netačne kvantifikacije i potcenjivanja stepena globalne metilacije. Parametri čiji je uticaj ispitan obuhvatili su koncentraciju enzima, optimalnu temperaturu inkubacije, trajanje inkubacije i inicijalnu količinu uzorka.

Efikasnost hidrolize prvo je testirana variranjem udela enzima u odnosu na količinu supstrata. Ispitana su tri različita odnosa: 1 U/ $\mu$ g DNK, 5 U/ $\mu$ g DNK i 10 U/ $\mu$ g DNK, pri čemu je inkubacija u svim eksperimentima sprovedena tokom 2 sata na temperaturi od 37 °C. Kompletna enzimaska hidroliza genetskog materijala potvrđena je elektroforezom na agaroznom gelu uz korišćenje GeneRuler markera kao kontrole, na osnovu kojeg su vizuelno definisane zone visoke i niske molekulske mase. Elektroforegram prikazan na Slici 10 potvrđuje da je minimalna aktivnost enzima od 5 U/ $\mu$ g genomske DNK neophodna za potpunu hidrolizu. Potpuno odsustvo traka ili razmaza u zonama uzoraka tretiranih sa 5 U/ $\mu$ g i 10 U/ $\mu$ g pokazuju potpunu hidrolizu do nivoa pojedinačnih nukleozida, čime se eliminiše prisustvo rezidualnih fragmenata koji bi doveli do netačne kvantifikacije 5mC. Osim toga, prisustvo parcijalno hidrolizovanih fragmenata DNK može dovesti do nakupljanja makromolekula na stacionarnoj fazi i posledične opstrukcije analitičke kolone tokom hromatografskog razdvajanja. Sa druge strane, degradacioni razmaz u zoni uzorka tretiranog sa 1 U/ $\mu$ g genomske DNK potvrđuje prisustvo parcijalno hidrolizovanih fragmenata, što pokazuje da je pri nižoj enzimskoj aktivnosti hidroliza nepotpuna.



**Slika 10. Elektroforegram hidrolizata DNK pri različitim odnosima enzima i supstrata**

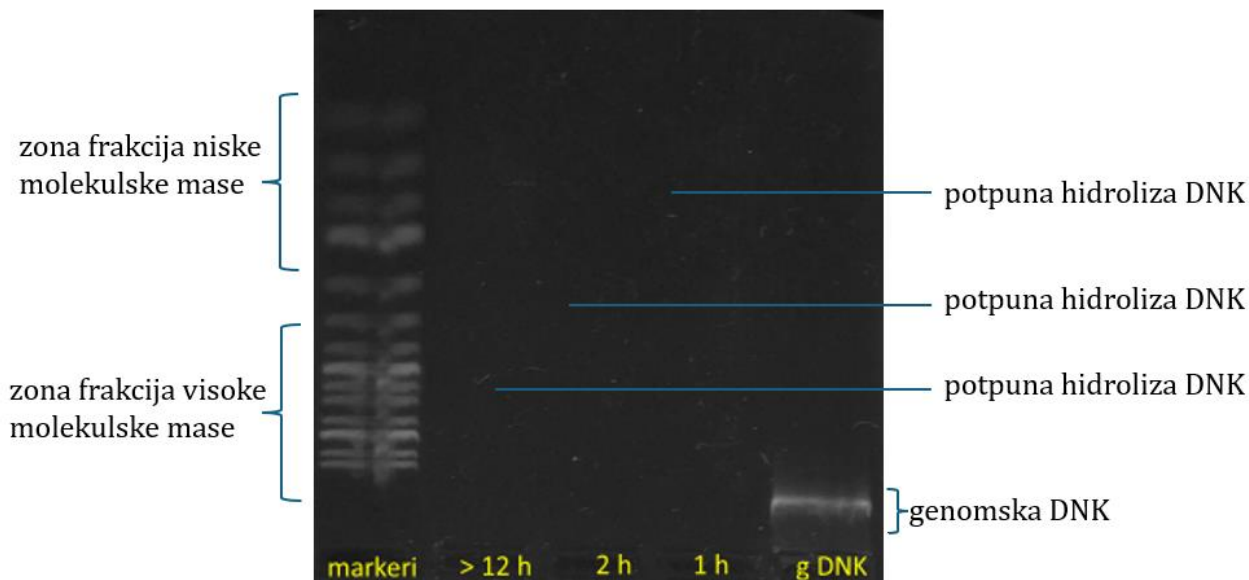
U sledećem koraku, dobijeni rezultati potvrđeni su UHPLC-DAD analizom, poređenjem hromatograma dobijenih primenom 5 U/μg i 10 U/μg DNK (Slika 11). Kako su oba protokola rezultovala potpunom hidrolizom uz identičan profil nukleozida (dC, 5mC, dG, dT, dA) za dalji rad je odabran odnos od 5 U/μg kao ekonomski opravdaniji pristup, bez gubitka na preciznosti analize.



**Slika 11. Uporedni prikaz hromatograma hidrolizata DNK, dobijenih različitim odnosima enzima i DNK**

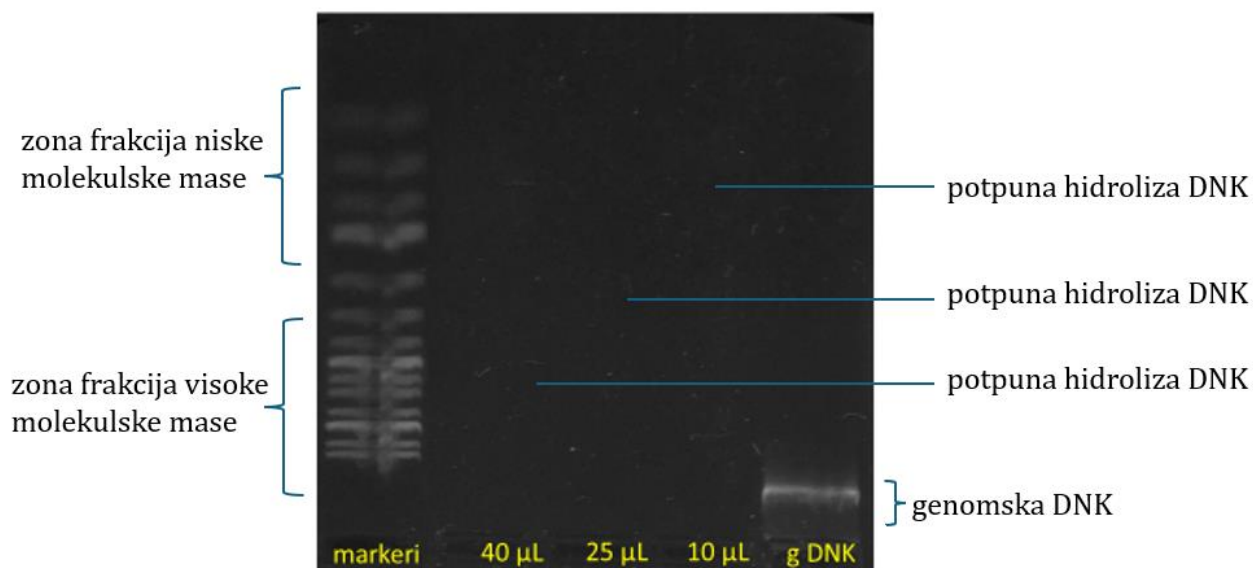
Panel A: Eksperiment sa 5 U/ug DNK; Panel B: Eksperiment sa 10 U/ug DNK; dC - deoksicitidin; 5mC - 5-metilcitidin; dG - deoksiguanozin; dT - deoksitimidin; dA - deoksiadenozin

Nakon utvrđenja optimalne količine enzima ispitan je uticaj trajanja inkubacije na 37 °C u sledećim vremenskim intervalima: 1 sat, 2 sata i preko noći (više od 12 sati). Elektroforegram prikazan na Slici 12 pokazuje da se kompletna hidroliza postiže već nakon jednog sata inkubacije. Ipak, radi osiguranja potpune stabilnosti reakcije kod realnih uzoraka, kao optimalno vreme inkubacije usvojeno je trajanje od 2 sata.



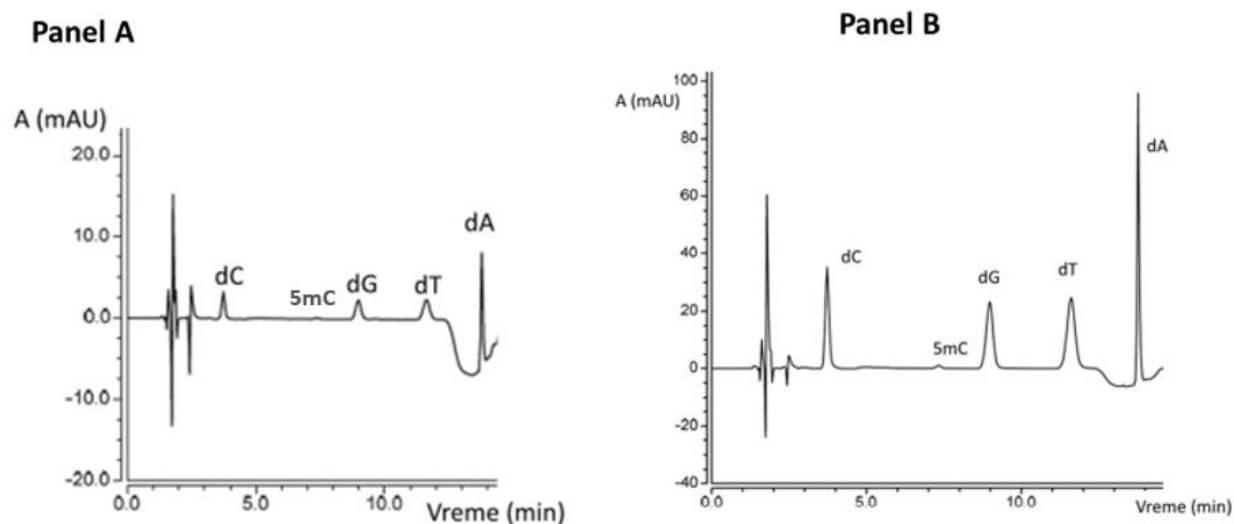
**Slika 12. Elektroforegram hidrolizata DNK dobijenih različitim trajanjem inkubacije**

Dodatno, potvrđeno je i da variranje reakcione zapremine (10  $\mu$ L, 25  $\mu$ L i 40  $\mu$ L) koje je neophodno zbog tehničkih zahteva UHPLC sistema ne utiče negativno na efikasnost enzimske hidrolize gDNK (Slika 13). Uspešnost procesa ponovo je evaluirana elektroforezom na agaroznom gelu, uz korišćenje GeneRuler markera za vizuelno definisanje zona visoke i niske molekulske mase. Elektroforegram prikazan na Slici 13 pokazuje potpuno odsustvo traka ili razmaza u navedenim referentnim zonama za sve tri ispitivane reakcione zapremine. Ovakav rezultat vizuelno potvrđuje da je u svim slučajevima ostvarena potpuna hidroliza DNK do pojedinačnih nukleozida, čime se osigurava pouzdanost i tačnost naknadne hromatografske analize.



**Slika 13. Evaluacija efikasnosti enzimske hidrolize u zavisnosti od ukupne zapremine reakcione smeše**

Na samom kraju optimizacije protokola za hidrolizu bilo je potrebno definisati polaznu količinu DNK koja bi obezbedila adekvatnu osetljivost detekcije, posebno kada je reč o 5mC. Iako se u literaturi vrlo često navodi upotreba 1 µg DNK za analizu metilacije DNK, hromatografska analiza (Slika 14, Panel A) je potvrdila da ova količina DNK ne daje dovoljno jak signal pri primenjenoj zapremini injektovanja (10-20 µL) za detekciju 5mC. Zbog toga je inicijalna količina uzorka povećana na 6 µg DNK, što odgovara koncentraciji od 75 ng/µL u finalnom hidrolizatu. Ovakva modifikacija omogućila je odličnu rezoluciju i osetljivost neophodnu za preciznu kvantifikaciju svih prisutnih nukleozida (Slika 14, Panel B).



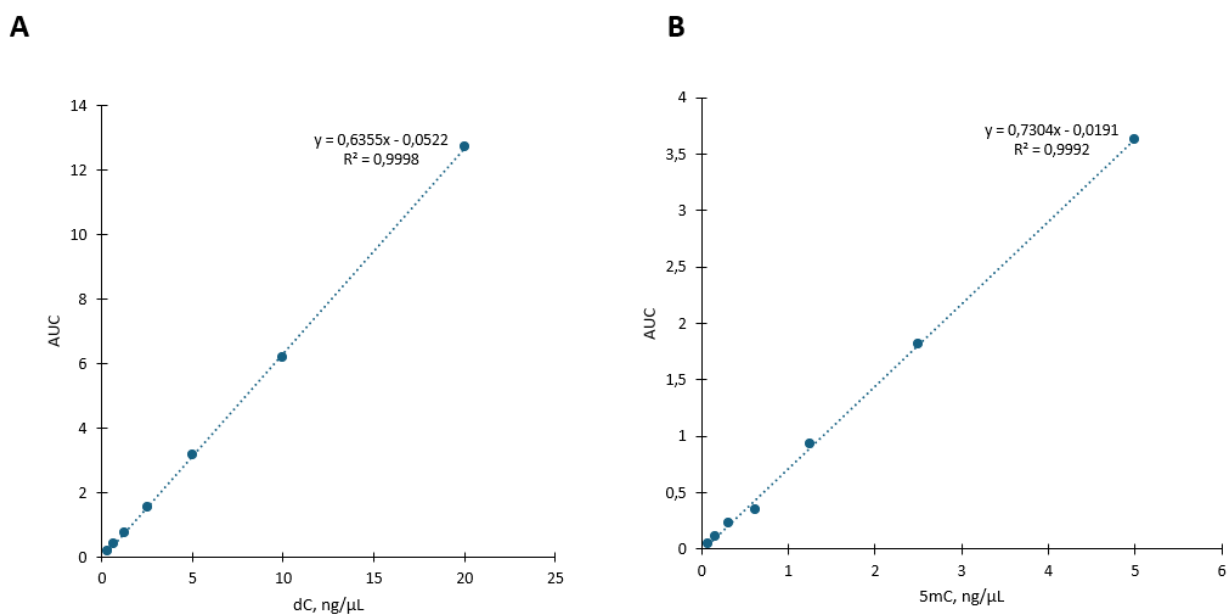
**Slika 14. Hromatogrami dobijeni hidrolizom 1 µg DNK (Panel A) i 6 µg DNK (Panel B)**  
*dC - dezoksicitidin; 5mC - 5-metildezoksicitidin; dG - dezoksiguanozin; dT - dezoksitimidin; dA - dezoksiadenozin*

Na osnovu sprovedenih eksperimenata, usvojeni su finalni optimalni uslovi hidrolize: primena 5 U enzima po 1 µg DNK, uz inkubaciju od 2 h na 37 °C i polaznu količinu od 6 µg DNK po uzorku.

#### 4.1.3. Analitička validacija metode

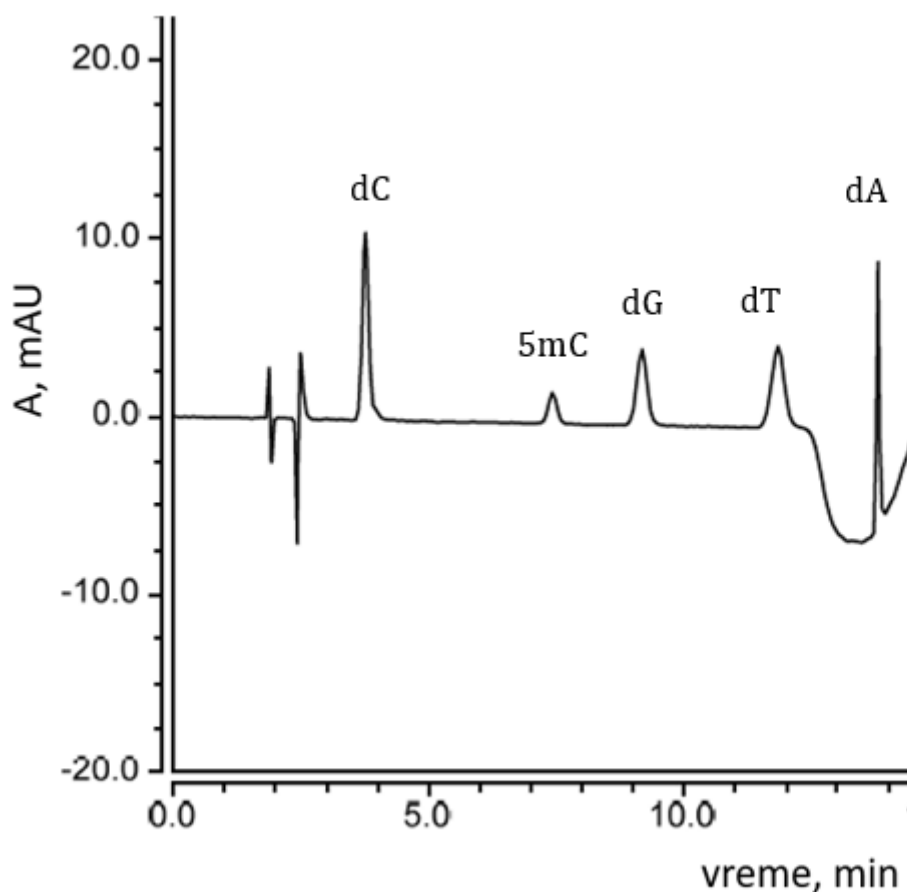
Hromatografski uslovi su optimizovani u cilju postizanja maksimalne rezolucije pikova 5mC i dC, uz istovremeno skraćivanje trajanja analitičkog ciklusa. Validacija metode sprovedena je u skladu sa važećim smernicama Međunarodnog saveta za harmonizaciju tehničkih zahteva za lekove za humanu upotrebu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), obuhvatajući ispitivanje linearnosti, selektivnosti, specifičnosti i preciznosti. Za potrebe kvantifikacije pripremljene su odgovarajuće kalibracione krive, korišćenjem sedam serijskih razblaženja komercijalnih standarda 2'-deoksicitidina čistoće ≥99% (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) i 2'-deoksi-5-metilcitidina čistoće 98% (J&K Scientific, Peking, Kina). Koncentracioni opsezi su definisani na osnovu fiziološkog udela nukleozida u humanoj genomskoj DNK, pri čemu dC čini približno 20% genoma, dok 5mC obuhvata između 3% i 6% ukupnog sadržaja citozina, što odgovara udelu od oko 1% u ukupnoj DNK (248,249).

Linearna zavisnost za dC potvrđena je u opsegu od 0,313 do 20 ng/µL ( $y = 0,6355x - 0,0522$ ;  $R^2 = 0,9998$ ), a za 5mC u opsegu od 0,078 do 5 ng/µL ( $y = 0,7304x - 0,0191$ ;  $R^2 = 0,9992$ ). Visoke vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2 > 0,999$ ) za oba analita ukazuju na linearnost metode unutar ispitivanog radnog opsega (Slika 15).



**Slika 15. Kalibracione krive za određivanje koncentracije dC (A) i 5mC (B)**

Selektivnost optimizovane UHPLC-DAD metode potvrđena je analizom smeše standarda svih relevantnih deoksiribonukleozida, prema redosledu eluiranja: 5mC, 5hmC, dC, dG, dT i dA. Primenjeni hromatografski uslovi omogućili su jasnu rezoluciju i preciznu identifikaciju svih komponenti unutar jednog ciklusa analize, u skladu sa prikazom na Slici 16. Potvrđeno je potpuno razdvajanje modifikovanih baza od osnovnih nukleozida, bez pojave koelucije. Specifičnost je dodatno potvrđena i analizom spektralne čistoće pikova pomoću DAD detektora.



**Slika 16. Reprezentativni hromatogram smeše standarda**

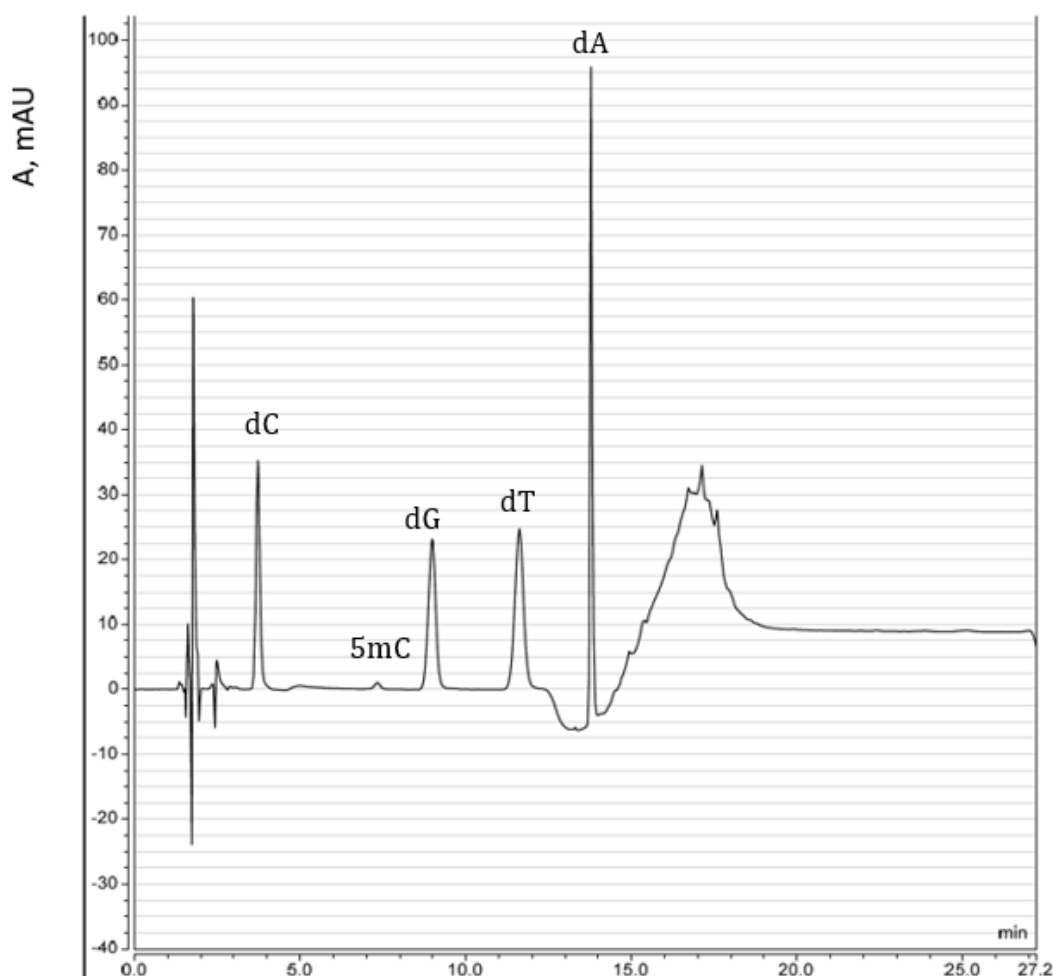
*Redosled eluiranja: deoksicitidin (dC), 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidin (5hmC), 5-metil-2'-deoksicitidin (5mC), deoksiguanozin (dG), deoksitimidin (dT) i deoksiadenozin (dA).*

Preciznost optimizovane metode procenjena je određivanjem koeficijenta varijacije (CV, %) za retenciona vremena ( $t_r$ ) i površine pikova dC i 5mC. Ispitivanje je obuhvatilo ponovljivost unutar istog dana (engl. *intra-day precision*) i između različitih dana analize (engl. *inter-day precision*). Analizom 6 uzastopnih injektovanja smeše standarda koncentracije 0,625 ng/ $\mu$ L za 5mC i 2 ng/ $\mu$ L za dC utvrđena je izuzetna stabilnost sistema. Za dC, CV za  $t_r$  iznosio je 0,42%, dok je za površinu pika iznosio 1,15%. Za 5mC dobijene su vrednosti CV od 0,58% za  $t_r$  i 1,42% za AUC. Prilikom evaluacije tokom 3 uzastopna dana, prosečni CV za AUC iznosio je 2,34% za dC, odnosno 2,81% za 5mC. Sve izračunate vrednosti CV bile su niže od 5%, što potvrđuje izuzetnu ponovljivost i primenljivost metode za rutinsku primenu.

Osetljivost metode evaluirana je kroz određivanje limita detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i limita kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ). Parametri su izračunati na osnovu standardne devijacije odgovora i nagiba kalibracione krive. Za dC LOD iznosio je 0,089 ng/μL, dok je LOQ iznosio 0,270 ng/μL. Za 5mC utvrđen je izuzetno nizak LOD od 0,002 ng/μL i LOQ od 0,007 ng/μL. Visoka osetljivost detekcije 5mC bila je od ključnog značaja zbog njegove niske zastupljenosti u odnosu na osnovne nukleozide. Analizom slepe probe potvrđeno je odsustvo interferencija, dok je odnos signal-šum (engl. *signal/noise*, S/N) za najnižu tačku kalibracije iznosio 27, što značajno premašuje zahtevani kriterijum (10:1) neophodan za pouzdanu kvantifikaciju.

#### 4.1.4. Analiza stepena globalne metilacije DNK u realnom uzorku

Primenljivost metode verifikovana je analizom realnog uzorka genomske DNK, izolovane iz PBMC zdravog ispitanika. Na Slici 17 prikazan je reprezentativni hromatogram dobijen hidrolizom 6 μg DNK. Jasno definisana morfologija i oštrina pikova 5mC i dC ukazuju na potpunu enzimsku digestiju i odsustvo interferencija matriksa. Stabilnost bazne linije tokom gradijentnog ispiranja kolone potvrđuje efikasnu regeneraciju stacionarne faze, što metodu čini pogodnom za analizu velikog broja uzoraka.



**Slika 17. Hromatogram nukleozida dobijenih potpunom enzimskom hidrolizom realnog uzorka genomske DNK**

## 4.2. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

Osnovne demografske karakteristike i distribucija faktora rizika kod pacijenata sa T2DM i zdravih ispitanika u KG prikazani su u Tabeli 1. Studijom je obuhvaćeno ukupno 163 ispitanika, od čega je grupu sa T2DM činilo 107 pacijenata prosečne starosti  $62,0 \pm 11,3$  godine, dok je kontrolnu grupu činilo 56 zdravih dobrovoljaca prosečne starosti  $52,6 \pm 9,3$  godine.

**Tabela 1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika**

Parametar	KG	T2DM	<i>p</i>
Starost, godine	52,6 ± 9,3	62,0 ± 11,3	< 0,001
Pol, m/ž	20/36	60/47	< 0,05
ITM, kg/m <sup>2</sup>	25,6 ± 3,6	31,5 ± 6,8	< 0,001
Gojaznost, %	7,1	49,5	< 0,001
Obim struka, cm	85,2 ± 12,1	106,6 ± 17,1	< 0,001
Sistolni pritisak, mmHg	122 ± 20,3	134 ± 20,7	< 0,001
Dijastolni pritisak, mmHg	80,5 ± 10,8	80,5 ± 11,7	0,990
Hipertenzija, %	35,7	88,7	< 0,001
Pušenje, %	5,4	38,3	< 0,001

*Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i kao apsolutne ili relativne frekvencije. Kontinuirani podaci su poređeni Studentovim t-testom, a kategorički podaci Chi-kvadrat testom.*

Analiza demografskih podataka otkrila je značajne razlike u starosnoj dobi i polnoj strukturi između grupa ( $p < 0,05$ ), pri čemu je u T2DM grupi zabeležena veća zastupljenost muškaraca (56,1%) i starijih ispitanika. Pacijenti sa T2DM imali su značajno viši ITM u poređenju sa KG. Takođe, u ovoj grupi je evidentirana značajno veća učestalost hipertenzije (88,7%) i veće vrednosti sistolnog krvnog pritiska, dok nije bilo razlike u vrednostima dijastolnog pritiska. U grupi pacijenata bilo je 49,5% gojaznih i 38,3% pušača, što je bila znatno veća zastupljenost u odnosu na KG.

U Tabeli 2 dat je prikaz ispitanih biohemijskih i hematoloških parametara. Prosečne koncentracije uree, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu pacijenata sa T2DM bile su značajno više, a vrednost eGFR značajno niža nego u KG. Nije bilo značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina između ispitivanih grupa ( $p = 0,148$ ), dok je razlika u koncentraciji albumina bila na granici statističke značajnosti, uz primetan trend ka nižim vrednostima kod pacijenata sa T2DM ( $p = 0,058$ ). Kada je reč o hematološkim parametrima, pacijenti sa T2DM imali su značajno veći broj leukocita, neutrofila i monocita u odnosu na KG, dok nije bilo značajne razlike u broju eritrocita, koncentraciji hemoglobina i vrednostima hematokrita između ispitivanih grupa, kao ni u broju limfocita, eozinofila, bazofila i trombocita.

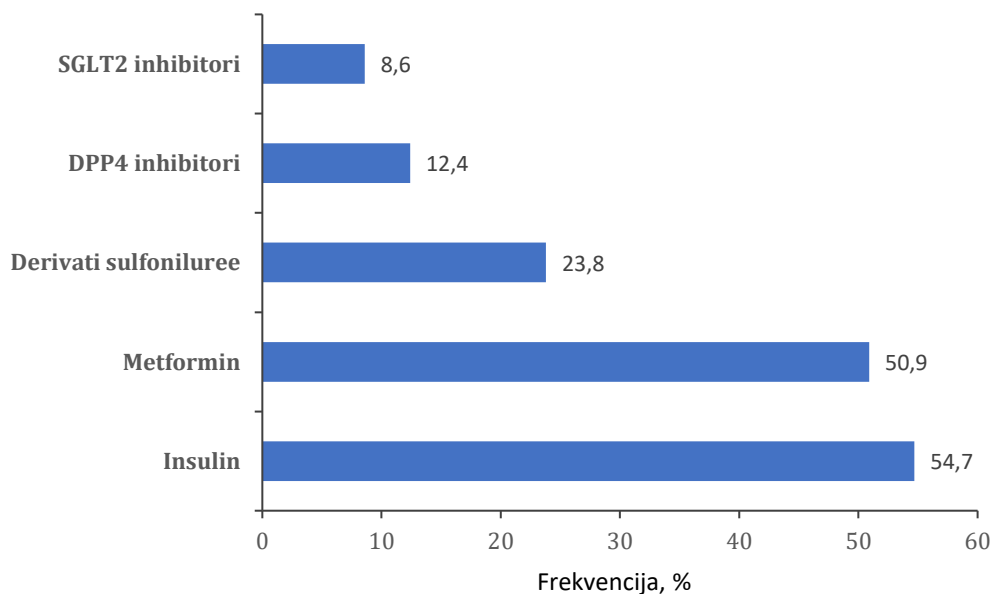
**Tabela 2. Biohemijski i hematološki parametri u ispitivanim grupama**

Parametar	KG	T2DM	<i>p</i>
Biohemijski parametri			
Urea, mmol/L	5,14 ± 1,22	6,76 ± 2,24	< 0,001
Kreatinin, µmol/L <sup>#</sup>	71,5 (62,0–81,5)	82,0 (67,0–104,0)	< 0,01
eGFR, mL/min/1,73 m <sup>2#</sup>	98,2 (89,5–105,4)	88,3 (63,1–98,4)	< 0,001
Mokraćna kiselina, µmol/L <sup>#</sup>	302 (255–351)	338 (272–402)	< 0,05
Ukupni proteini, g/L	72,1 ± 4,3	70,8 ± 5,9	0,148
Albumin, g/L <sup>#</sup>	44,0 (42,0–46,0)	43,0 (41,0–45,0)	0,058
Hematološki parametri			
Eritrociti, x 10 <sup>12</sup> /L #	4,40 (4,15–4,80)	4,60 (4,20–4,90)	0,137
Hemoglobin, g/L	133,84 ± 16,56	133,69 ± 18,58	0,962
Hematokrit, L/L <sup>#</sup>	0,40 (0,37–0,44)	0,42 (0,38–0,44)	0,270
Leukociti, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	6,50 (5,80–8,20)	7,80 (6,50–9,90)	< 0,01
Neutrofilni, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	3,89 (3,20–5,19)	4,65 (3,56–6,14)	< 0,05
Limfociti, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	2,17 (1,85–2,62)	2,17 (1,66–2,55)	0,317
Monociti, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	0,35 (0,29–0,43)	0,54 (0,39–0,69)	< 0,001
Eozinofili, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	0,16 (0,10–0,25)	0,17 (0,11–0,28)	0,503
Bazofili, x 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	0,04 (0,03–0,05)	0,05 (0,04–0,06)	0,151
Trombociti, x10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	250 (204–283)	255 (203–309)	0,512

*Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim t-testom. #Podaci koji ne prate normalnu raspodelu prikazani su kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.*

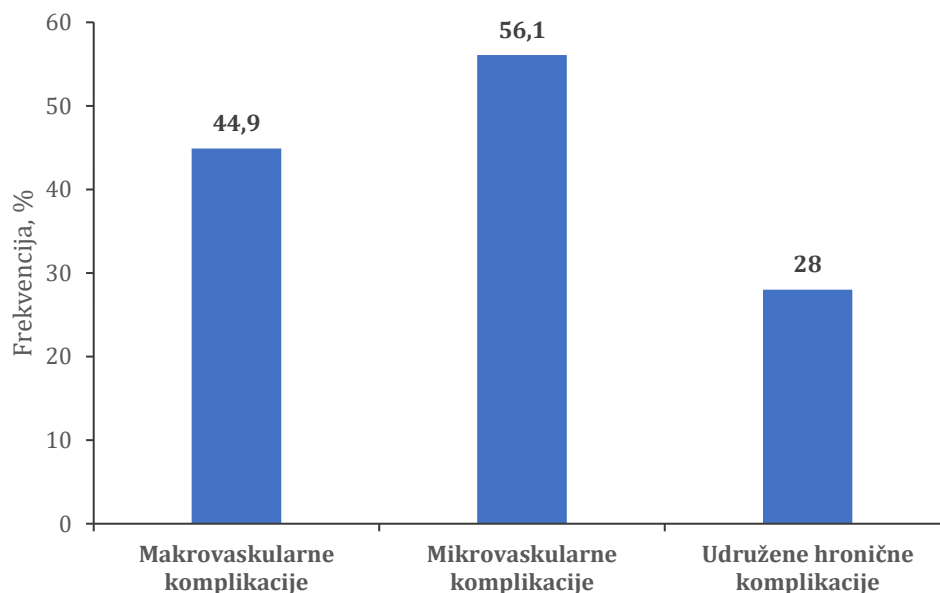
#### 4.2.1. Terapijski modaliteti i hronične komplikacije

Medijana trajanja bolesti u T2DM grupi iznosila je 10 godina (interkvartilni raspon: 3-15 godina). Većina pacijenata (63,6%) je bila na terapiji oralnim antidijabeticima, a okosnicu terapije činio je metformin. Takođe, više od polovine pacijenata (54,7%) bilo je na insulinskoj terapiji, bilo samostalno ili u kombinaciji sa oralnim hipoglikemijskim agensima (Slika 18). U okviru prateće farmakoterapije, 62,3% pacijenata primenjivalo je antihipertenzive, pri čemu su najzastupljeniji bili ACEI (39,0%), a 8% pacijenata je koristilo ARB. Kod 17,9% ispitanika zabeležena je primena statina.



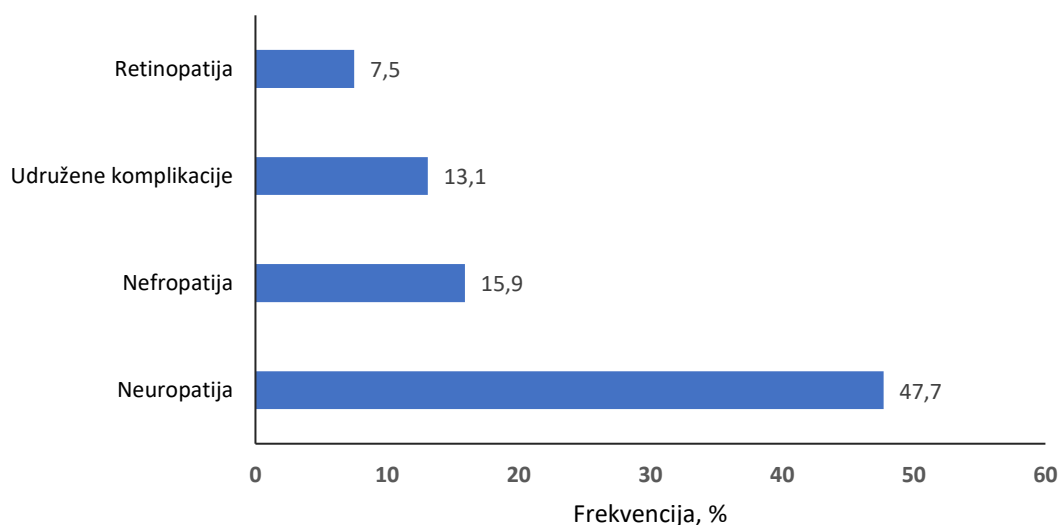
**Slika 18. Distribucija modaliteta hipoglikemijske terapije u grupi pacijenata sa T2DM**  
Insulin je primenjivan kao monoterapija ili u kombinaciji sa oralnim hipoglikemijskim agensima

Prevalencija hroničnih komplikacija kod pacijenata sa T2DM bila je izrazito visoka, pri čemu je kod čak 72,9% ispitanika potvrđen najmanje jedan oblik vaskularnog oštećenja. Makrovaskularne komplikacije su zabeležene kod 44,9% pacijenata, dok su mikrovaskularne komplikacije bile još učestalije (56,1%). Najteži oblik vaskularnog oštećenja u vidu istovremenog prisustva makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija zabeležen je kod gotovo trećine pacijenata (Slika 19).



**Slika 19. Prevalencija hroničnih komplikacija kod pacijenata sa T2DM**

Među mikrovaskularnim oštećenjima, najučestalija je bila neuropatija, detektovana kod 47,7% pacijenata (N = 51). Učestalost nefropatije iznosila je 15,9% (N = 17), a retinopatije 7,5% (N = 8) (Slika 20). Posebno je značajan podatak da je 13,1% pacijenata imalo istovremeno prisutno više od jednog tipa mikrovaskularnih komplikacija. Učestalost sindroma dijabetesnog stopala u ispitivanoj grupi iznosila je 23,4% (N=25).



**Slika 20. Zastupljenost specifičnih mikrovaskularnih komplikacija u T2DM grupi**

### 4.3. Parametari metaboličke kontrole

Analiza parametara metaboličke kontrole (Tabela 3) pokazala je da su pacijenti imali značajno više koncentracije glukoze u serumu u poređenju sa KG. Očekivano, pacijenti sa T2DM imali su značajno viši udeo HbA<sub>1c</sub> u odnosu na ispitanike u KG. Neadekvatnu metaboličku kontrolu (HbA<sub>1c</sub> > 7%) imalo je 94,9% pacijenata. Pored evaluacije standardnih parametara glikemije, analizirani su i AGE produkti u serumu, ali nije bilo značajne razlike u odnosu na KG.

**Tabela 3. Parametri metaboličke kontrole u ispitivanim grupama**

<b>Parametar</b>	<b>KG</b>	<b>T2DM</b>	<b>p</b>
Glukoza, mmol/L	5,23 ± 0,61	10,60 ± 4,08	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,37 ± 1,12	9,92 ± 1,89	< 0,001
AGE, U/mL <sup>#</sup>	5,82 (4,89–7,71)	5,44 (4,56–6,73)	0,139
AGE, AU/g <sup>#</sup>	8,09 (6,76–10,36)	7,50 (6,19–8,88)	0,109

*Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim t-testom. <sup>#</sup>Podaci koji ne prate normalnu raspodelu prikazani su kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.*

#### 4.4. Lipidni profil ispitanika

Detaljna evaluacija lipidnog profila kod svih ispitanika je obuhvatila ispitivanje lipidnog statusa, uključujući rutinske parametare i aktivnost LCAT i CETP, kao i dodatnu analizu LDL i HDL subfrakcija u plazmi.

##### 4.4.1. Lipidni status i aktivnost LCAT i CETP

Uporedna analiza parametara lipidnog statusa (Tabela 4) pokazala je značajno niže koncentracije HDL-h, a više koncentracije TG kod pacijenata sa T2DM. Koncentracije TC, LDL-h i non-HDL-h u grupi pacijenata su bile značajno niže nego u KG. Nije bilo razlike u aktivnosti LCAT i CETP između ispitivanih grupa.

**Tabela 4. Parametri lipidnog statusa u ispitivanim grupama**

Parametar	KG	T2DM	<i>p</i>
TC, mmol/L	6,17 ± 1,14	4,61 ± 1,21	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,88 ± 1,01	2,64 ± 0,99	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,65 ± 0,39	1,06 ± 0,39	< 0,001
TG, mmol/L <sup>#</sup>	1,19 (0,97–1,55)	1,75 (1,10–2,68)	< 0,001
Non-HDL-h, mmol/L	4,52 ± 1,22	3,55 ± 1,25	< 0,001
LCAT, μmol/L/h <sup>#</sup>	70,4 (56,5–90,3)	65,2 (44,5–95,1)	0,300
CETP, μmol/L/h <sup>#</sup>	203 (151–253)	157 (107–266)	0,107

*Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim t-testom. #Podaci koji ne prate normalnu raspodelu su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.*

Dodatnom analizom lipidnog statusa u T2DM grupi, utvrdili smo da je terapijski cilj za LDL-h (< 1,4 mmol/L) ostvarilo svega 10,3% pacijenata (250). Koncentracije TG > 1,7 mmol/L zabeležene su kod polovine pacijenata, što je značajno veća učestalost nego u KG (50,0% u T2DM naspram 19,6% u KG;  $\chi^2 = 37,82$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.2. Analiza LDL i HDL subfrakcija

U Tabeli 5 dat je uporedni prikaz veličine i raspodele LDL subfrakcija u ispitivanim grupama. Nije bilo razlike u prosečnim vrednostima LDL dijametra između posmatranih grupa. Pacijenti su imali značajno viši relativni udeo LDL I i LDL II subfrakcija, a niži udeo LDL III, LDL IV i sdLDL čestica od ispitanika u KG.

**Tabela 5. Veličina i raspodela LDL subfrakcija u ispitivanim grupama**

Parametar	KG	T2DM	<i>p</i>
LDL dijametar, nm	26,30 (25,60–26,70)	26,00 (25,30–26,90)	0,460
LDL I, %	21,20 (18,25–24,45)	23,70 (19,65–30,27)	< 0,01
LDL II, %	26,00 (23,55–29,35)	29,45 (25,82–35,98)	< 0,001
LDL III, %	22,30 (20,50–24,40)	19,90 (16,02–24,60)	< 0,01
LDL IV, %	29,20 (24,75–33,45)	22,70 (18,32–27,12)	< 0,001
sdLDL, %	51,80 (48,35–55,40)	43,65 (35,82–51,27)	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Kada je reč o HDL česticama, prosečni dijametar je bio značajno niži u grupi pacijenata sa T2DM (Tabela 6). Osim toga, pacijenti su imali značajno niži udeo velikih, protektivnih HDL2b subfrakcija ( $p < 0,001$ ), dok je udeo manjih, gušćih HDL čestica, prvenstveno HDL3a i HDL3b bio značajno viši. Nasuprot tome, relativni udeo HDL3c subfrakcija bio je značajno niži u grupi pacijenata u odnosu na KG.

**Tabela 6. Veličina i raspodela HDL subfrakcija u ispitivanim grupama**

Parametar	KG	T2DM	<i>p</i>
HDL dijametar, nm	10,3 (9,40–10,9)	9,00 (8,60–9,40)	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	40,1 (33,3–44,9)	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,7 (21,24–26,5)	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	17,5 (14,93–21,2)	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,30–9,18)	9,52 (7,06–13,5)	< 0,05
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,61 (6,18–11,1)	< 0,05

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

#### 4.5. Parametri redoks statusa

Redoks status kod svih ispitanika procenjen je određivanjem prooksidativnih i antioksidativnih biomarkera. Uporedan prikaz rezultata u ispitivanim grupama dat je u Tabeli 7. Pacijenti su imali značajno više vrednosti gotovo svih prooksidativnih parametara (TOS, PAB, IMA i AOPP), dok je koncentracija MDA bila niža nego u KG. Sa druge strane, antioksidativni parametri (PON1, TAS i SH-grupe) bili su značajno niži kod pacijenata, dok se aktivnost SOD nije značajno razlikovala između grupa.

*Tabela 7. Parametri redoks statusa u ispitivanim grupama*

<b>Parametar</b>	<b>KG</b>	<b>T2DM</b>	<b>p</b>
Prooksidativni biomarkeri			
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,5 (4,0–6,0)	6,60 (4,7–8,0)	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	88,33 (67,6–127)	< 0,001
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,55 (0,47–0,62)	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,68 (1,46–1,99)	< 0,001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,2 (18,3–27,4)	48,9 (36,6–58,9)	< 0,001
Antioksidativni biomarkeri			
PON1, U/L	365 (233–928)	251 (148–503)	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1385)	962 (714–1120)	< 0,001
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,25 (0,19–0,31)	< 0,001
SOD, U/L	133 (124–141)	136 (126–142)	0,162

*Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.*

#### 4.6. Parametri sistemske inflamacije

U Tabeli 8 dat je uporedni prikaz koncentracije hsCRP i vrednosti inflamatornih indeksa kod pacijenata sa T2DM i u KG. Vrednosti NWR i PLR indeksa se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa. Nasuprot tome, LWR indeks u grupi sa T2DM bio je značajno niži u odnosu na KG. Koncentracije hsCRP i vrednosti svih ostalih inflamatornih indeksa bile su značajno više u grupi pacijenata nego u KG.

**Tabela 8. Inflamatorni biomarkeri u ispitivanim grupama**

Parametar	KG	T2DM	p
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	5,80 (1,85–13,6)	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,19 (1,63–2,93)	< 0,05
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,60 (0,54–0,67)	0,407
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,24 (0,20–0,31)	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,06 (0,05–0,08)	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,28 (0,23–0,34)	< 0,001
PLR	106,90 (89,75–139)	111,00 (91,1–151)	0,326
SII	448 (344–609)	511 (382–783)	< 0,05
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	1,09 (0,75–1,83)	< 0,001
PIV	137 (102–239)	261 (166–489)	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

NLR - odnos broja neutrofila i limfocita; NWR - odnos broja neutrofila i ukupnog broja leukocita; MLR - odnos broja monocita i limfocita; MWR - odnos broja monocita i ukupnog broja leukocita; LWR - odnos broja limfocita i ukupnog broja leukocita; PLR - odnos broja trombocita i limfocita; SII - sistemski imuno-inflamatorni indeks; SIRI - indeks sistemskog inflamatornog odgovora; PIV - sveobuhvatna imuno-inflamatorna vrednost.

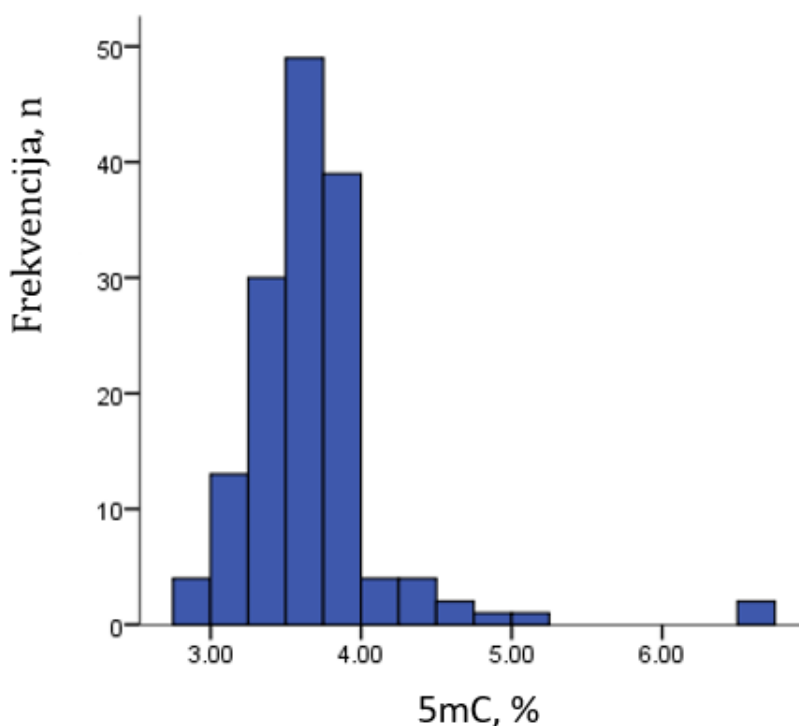
#### 4.7. Stepen globalne metilacije DNK u ispitivanim grupama

Centralni deo ovog istraživanja obuhvatio je kvantifikaciju stepena globalne metilacije DNK u ispitivanim grupama. Deskriptivna analiza otkrila je specifične obrasce distribucije unutar ispitivanih grupa, sumirano u Tabeli 9.

**Tabela 9. Deskriptivni parametri distribucije stepena globalne metilacije**

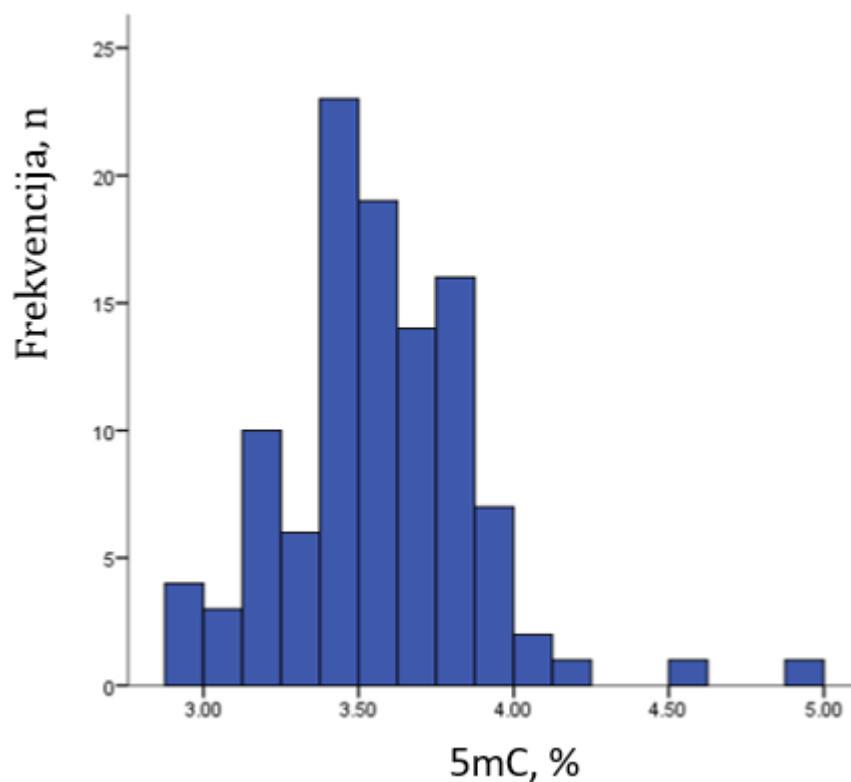
5mC, %	KG	T2DM
Srednja vrednost $\pm$ SD	4,00 $\pm$ 0,68	3,55 $\pm$ 0,31
Medijana (interkvartilni raspon)	3,86 (3,59–4,05)	3,54 (3,31–3,67)
Minimum	3,47	2,90
Maksimum	6,63	4,92

U KG vrednosti udela 5mC kretale su se u rasponu od 3,47 % do 6,63 % (medijana: 3,86 %; interkvartilni raspon: 3,59–4,05%), dok je prosečna vrednost udela 5mC iznosila 4,00  $\pm$  0,68 %. Grafički prikaz udela 5mC u celokupnoj studijskoj populaciji, koja obuhvata KG i sve pacijente, dat je na Slici 21.



**Slika 21. Histogram raspodele vrednosti stepena globalne metilacije u celokupnoj populaciji ispitanika**

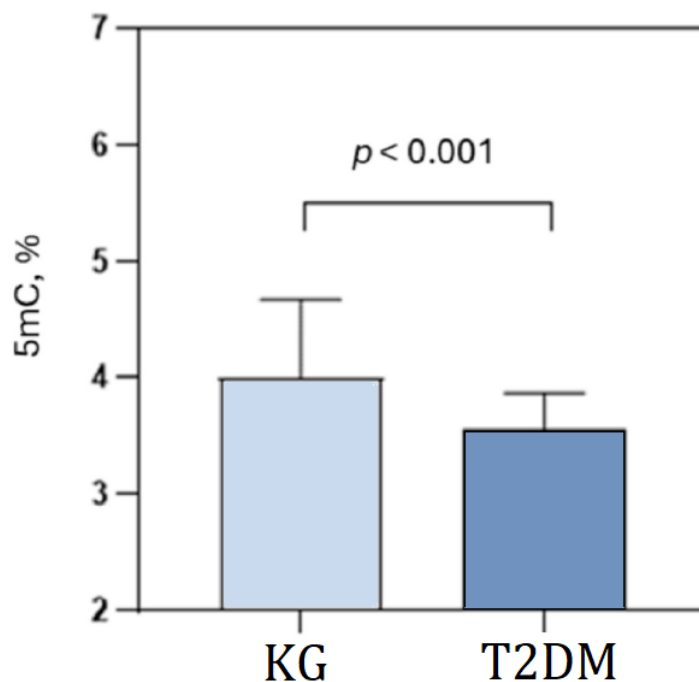
Nasuprot tome, u T2DM grupi stepen globalne metilacije DNK kretao se u užem i nižem rasponu, od 2,90% do 4,92%. Prosečna vrednost udela 5mC iznosila je  $3,55 \pm 0,31\%$ , sa medijanom 3,54% (interkvartilni raspon: 3,31–3,67%) (Slika 22).



**Slika 22. Histogram raspodele vrednosti stepena globalne metilacije u grupi pacijenata**

Poređenjem ovih deskriptivnih parametara utvrđeno je da pacijenti sa T2DM imaju ujednačeniji profil metilacije DNK sa nižim prosečnim vrednostima i medijanom, dok zdravi ispitanici ispoljavaju veću varijaciju i tendenciju ka većem stepenu globalne metilacije DNK.

Pacijenti su imali značajno niže vrednosti stepena globalne metilacije u odnosu na KG ( $p < 0,05$ ). S obzirom na to da starost i pol ispitanika utiču na gubitak metilacije u genomu, kako bismo ispitali nezavisan uticaj T2DM na epigenetski status, primenjena je korekcija za starost i pol ispitanika. Ovim je potvrđeno da uočena globalna hipometilacija DNK nije posledica demografskih razlika između grupa, poput starosti ili polne strukture, već je povezana sa prisustvom T2DM (Slika 23).



**Slika 23. Stepen globalne metilacije DNK u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa T2DM**  
Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije i poređeni Studentovim t-testom

#### **4.8. Varijabilnost globalne metilacije DNK u ispitivanim grupama**

U daljem toku istraživanja sprovedena je detaljna analiza stepena globalne metilacije DNK unutar specifičnih podgrupa pacijenata sa T2DM, kako bi se ispitaio potencijalni uticaj demografskih i kliničkih varijabli na epigenetski status ispitanika. Pacijenti su stratifikovani u odnosu na pol, antropometrijske karakteristike (povišen ITM i prisustvo gojaznosti), trajanje bolesti duže od 10 godina, pušački status, prisustvo hipertenzije i stepen metaboličke kontrole procenjen na osnovu granične vrednosti HbA<sub>1c</sub> od 8%, što je manje striktan terapijski cilj koji važi za starije pacijente i one sa pridruženim komorbiditetima.

Rezultati prikazani u Tabeli 10 pokazuju da se stepen globalne metilacije DNK značajno razlikovao u odnosu na trajanje bolesti duže od 10 godina, dok nije bilo razlike u odnosu na pol, ITM, pušenje, hipertenziju i neadekvatnu metaboličku kontrolu kod pacijenata sa T2DM.

**Tabela 10. Step en globalne metilacije DNK u odnosu na demografske i kliničke karakteristike**

Kategorija	N	5mC, %	p
Pol			
Muški	60	3,56 ± 0,27	0,912
Ženski	47	3,56 ± 0,35	
ITM, kg/m <sup>2</sup>			
<25	54	3,53 ± 0,33	0,246
≥25	53	3,60 ± 0,29	
Trajanje T2DM, godine			
<10	69	3,62 ± 0,33	< 0,05
≥10	38	3,48 ± 0,24	
Pušenje			
Ne	66	3,53 ± 0,28	0,090
Da	41	3,64 ± 0,34	
Hipertenzija			
Ne	12	3,55 ± 0,49	0,884
Da	95	3,56 ± 0,28	
HbA <sub>1c</sub> , %			
< 8	24	3,48 ± 0,26	0,176
≥ 8	83	3,58 ± 0,31	

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim t testom.

Zatim smo ispitali varijaciju stepena globalne metilacije DNK u odnosu na podelu pacijenata na preporučene koncentracije serumskih lipidnih parametara (Tabela 11). Pacijenti su podeljeni u odnosu na granične vrednosti i terapijske ciljeve preporučene u aktuelnim smernicama Evropskog kardiološkog društva (engl. *European Society of Cardiology, ESC*) i Evropskog društva za aterosklerozu (engl. *European Atherosclerosis Society, EAS*) za procenu kardiovaskularnog rizika (250). U skladu sa tim, primenjene su granične koncentracije TG od 1,7 mmol/L, LDL-h od 1,8 mmol/L i striktnija granica od 1,4 mmol/L, HDL-h od 1,0 mmol/L i non-HDL-h od 2,6 mmol/L. Ova analiza je pokazala da se nivo metilacije DNK nije značajno razlikovao između pacijenata stratifikovanih na osnovu navedenih graničnih vrednosti serumskih lipidnih parametara.

**Tabela 11. Stepen globalne metilacije DNK u odnosu na lipidni status**

Kategorija	N	5mC, %	p
TG, mmol/L			
< 1,7	57	3,54 ± 0,31	0,396
≥ 1,7	50	3,59 ± 0,31	
LDL-h, mmol/L			
< 1,8	33	3,58 ± 0,37	0,640
≥ 1,8	74	3,55 ± 0,28	
LDL-h, mmol/L			
< 1,4	23	3,56 ± 0,30	0,991
≥ 1,4	84	3,56 ± 0,31	
HDL-h, mmol/L			
≥ 1	57	3,55 ± 0,29	0,748
< 1	50	3,57 ± 0,33	
Non-HDL-h, mmol/L			
< 2,6	33	3,61 ± 0,36	0,305
≥ 2,6	74	3,54 ± 0,28	

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim *t* testom.

Sličan trend uočen je i prilikom analize stepena globalne metilacije DNK u zavisnosti od primenjenih terapijskih režima (Tabela 12). Terapija oralnim antidijabeticima generalno, kao i primena metformina, insulina i novijih klasa lekova poput SGLT2 inhibitora, nije značajno uticala na stepen globalne metilacije DNK. Uočen je trend ka višim vrednostima globalne metilacije DNK kod pacijenata na terapiji derivatima sulfoniluree ( $p = 0,076$ ). Sa druge strane, trend ka nižim vrednostima primećen kod pacijenata na terapiji inhibitorima DPP4 ( $p = 0,079$ ) verovatnije predstavlja posledicu izuzetno malog uzorka u ovoj grupi, nego što odražava efekat terapije.

**Tabela 12. Stepen globalne metilacije DNK u odnosu na hipoglikemijsku terapiju**

Kategorija	N	5mC, %	<i>p</i>
Oralni antidijabetici			
Ne	39	3,51 ± 0,24	0,213
Da	68	3,59 ± 0,34	
Metformin			
Ne	53	3,52 ± 0,31	0,248
Da	54	3,59 ± 0,31	
Insulin			
Ne	49	3,54 ± 0,30	0,491
Da	58	3,58 ± 0,31	
Derivati sulfoniluree			
Ne	75	3,53 ± 0,29	0,143
Da	32	3,63 ± 0,34	
SGLT2 inhibitori			
Ne	96	3,55 ± 0,30	0,374
Da	9	3,65 ± 0,39	
DPP4 inhibitori			
Ne	105	3,57 ± 0,31	0,079
Da	2	3,18 ± 0,32	

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Studentovim *t* testom.

#### 4.9. Korelaciona analiza stepena globalne metilacije DNK

U daljem toku istraživanja ispitana je korelacija stepena globalne metilacije DNK sa demografskim i kliničkim karakteristikama, kao i sa laboratorijskim parametrima. Rezultati prikazani u Tabeli 13 pokazuju da starost, obim struka, ITM i vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska nisu korelirali sa stepenom globalne metilacije u ispitivanim grupama.

**Tabela 13. Korelacije stepena globalne metilacije DNK sa demografskim i kliničkim parametrima**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
Starost, godine	-0,113	0,475	-0,050	0,608
Obim struka, cm	0,032	0,847	-0,033	0,780
ITM, kg/m <sup>2</sup>	-0,044	0,792	0,066	0,519
Stistolni pritisak, mmHg	0,062	0,707	-0,165	0,096
Dijastolni pritisak, mmHg	-0,044	0,789	-0,082	0,413

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

Rezultati korelacione analize sa parametarima metaboličke kontrole (Tabela 14) pokazali su da udeo 5mC značajno raste sa porastom udela HbA<sub>1c</sub> u KG, dok u grupi pacijenata nije bilo značajnih korelacije.

**Tabela 14. Korelacija stepena globalne metilacije DNK sa parametrima metaboličke kontrole**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
Glukoza, mmol/L	-0,225	0,151	0,039	0,733
HbA <sub>1c</sub> , %	0,709	< 0,05	0,084	0,406
AGE, AU/mL	-0,065	0,712	0,055	0,574
AGE, AU/g	-0,028	0,873	-0,039	0,726

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

Tabela 15 prikazuje rezultate ispitivanja korelacije stepena globalne metilacije DNK i parametara redoks statusa. U KG udeo 5mC je negativno korelirao sa vrednostima TOS. U grupi sa T2DM utvrđena je pozitivna korelacija udela 5mC sa vrednostima TOS i TAS, kao i sa koncentracijama AOPP, a negativna sa vrednostima PAB.

**Tabela 15. Korelacija stepena globalne metilacije DNK sa parametrima redoks statusa**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	-0,125	0,429	0,235	< 0,05
MDA, $\mu\text{mol/L}$	-0,064	0,686	-0,039	0,699
TOS, $\mu\text{mol/L}$	-0,313	< 0,05	0,324	< 0,001
PAB, U/L	-0,058	0,715	-0,326	< 0,001
IMA, AU	0,005	0,975	-0,152	0,119
SOD, U/mL	0,045	0,779	0,162	0,098
SH-grupe, mmol/L	0,047	0,769	0,151	0,127
TAS, $\mu\text{mol/L}$	-0,063	0,692	0,246	< 0,05
PON1, U/L	0,033	0,837	-0,050	0,608

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

U daljem koraku, analizirana je korelacija udela 5mC sa panelom inflamatornih markera, a rezultati su prikazani u Tabeli 16. U kontrolnoj grupi nije zabeležena značajna korelacija između navedenih parametara. Nasuprot tome, u grupi pacijenata sa T2DM utvrđena je značajna negativna korelacija udela 5mC sa koncentracijama hsCRP i vrednostima PLR indeksa, dok sa ostalim parametrima nije bilo značajnih korelacija.

**Tabela 16. Korelacija stepena globalne metilacije DNK sa parametrima inflamacije**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
hsCRP, mg/L	0,131	0,407	-0,206	< 0,05
NLR	0,013	0,937	0,013	0,897
PLR	0,130	0,413	-0,228	< 0,05
NWR	-0,022	0,888	-0,039	0,691
MLR	-0,001	0,997	0,012	0,900
MWR	-0,042	0,791	0,038	0,704
LWR	-0,050	0,754	-0,034	0,734
SII	0,086	0,587	-0,151	0,124
SIRI	0,059	0,710	0,077	0,432
PIV	0,079	0,617	-0,074	0,451

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

Naredni korak bio je analiza korelacija između stepena globalne metilacije DNK i parametara lipidnog statusa (Tabela 17). U kontrolnoj grupi zabeležena je značajna negativna korelacija između nivoa 5mC i aktivnosti CETP enzima, dok je kod pacijenata sa T2DM utvrđena značajna pozitivna korelacija nivoa 5mC sa koncentracijom TG.

**Tabela 17. Korelacija stepena globalne metilacije DNK sa parametrima lipidnog profila**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
TC, mmol/L	-0,180	0,255	0,080	0,430
LDL-h, mmol/L	-0,210	0,200	0,085	0,410
HDL-h, mmol/L	0,025	0,879	-0,026	0,803
TG, mmol/L	-0,139	0,378	0,220	< 0,05
non-HDL h, mmol/L	-0,152	0,336	0,138	0,184
LCAT, $\mu\text{mol/L/h}$	-0,282	0,071	0,100	0,318
CETP, $\mu\text{mol/L/h}$	-0,408	< 0,01	0,102	0,310

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

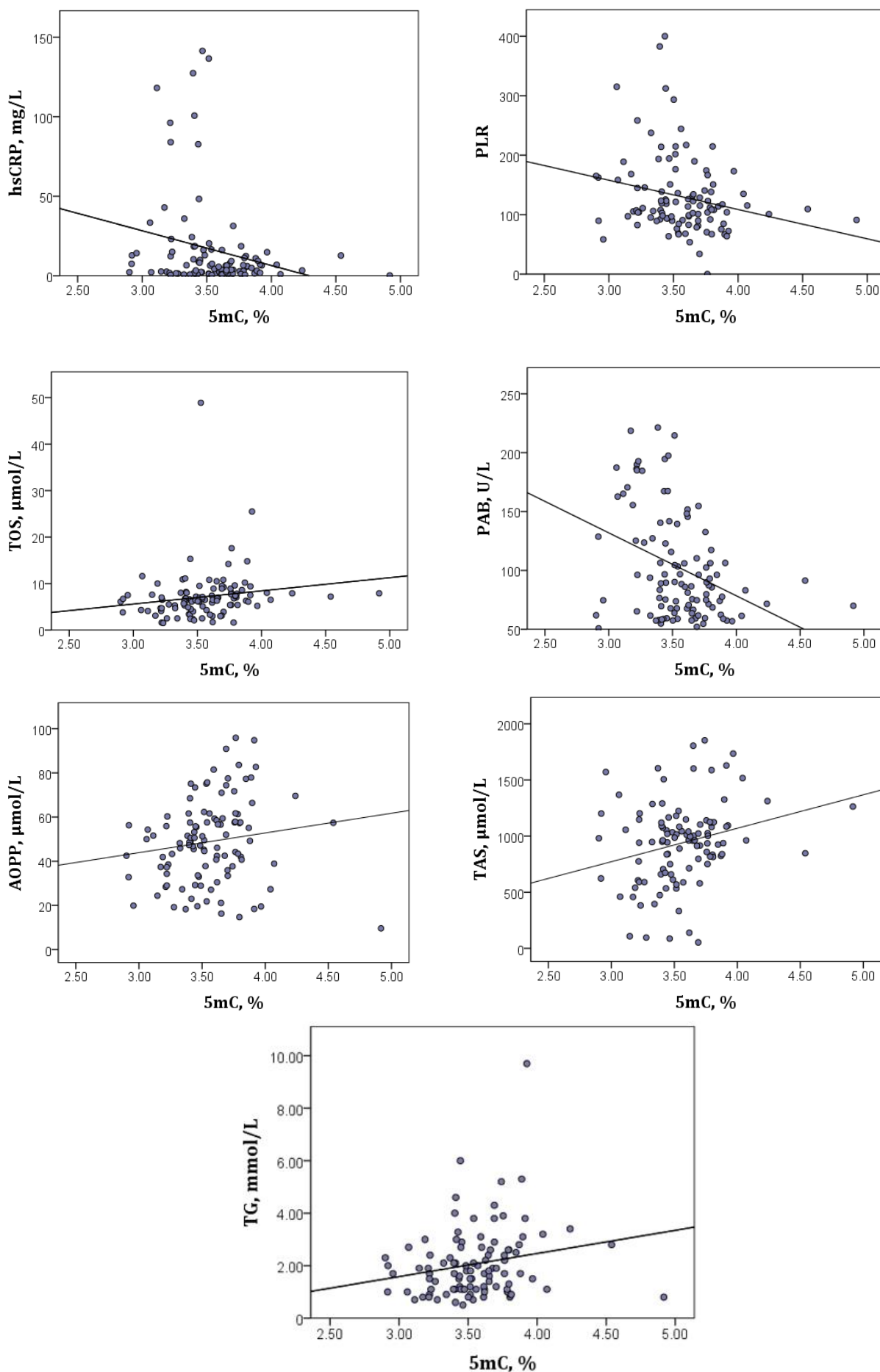
Nadalje, ispitana je korelacija udela 5mC sa veličinom i relativnim udelima LDL i HDL subfrakcija, a uporedni prikaz rezultata u analiziranim grupama dat je u Tabeli 18. U KG je utvrđena pozitivna korelacija udela 5mC sa relativnim udelima HDL2b i LDL IV subfrakcija, dok kod pacijenata sa T2DM nije bilo značajnih korelacija.

**Tabela 18. Korelacija stepena globalne metilacije DNK sa LDL i HDL subfrakcijama**

Parametar	KG		T2DM	
	$\rho$	$p$	$\rho$	$p$
LDL dijametar, nm	0,179	0,283	0,164	0,094
LDL I, %	-0,027	0,874	0,021	0,827
LDL II, %	-0,278	0,091	0,136	0,166
LDL III, %	-0,078	0,641	-0,073	0,457
LDL IV, %	0,385	< 0,05	-0,090	0,357
sdLDL, %	0,164	0,326	-0,120	0,220
HDL dijametar, nm	0,300	0,067	-0,089	0,364
HDL2a, %	-0,294	0,073	0,091	0,356
HDL2b, %	0,340	< 0,05	-0,172	0,077
HDL3a, %	-0,003	0,986	0,081	0,411
HDL3b, %	-0,165	0,322	0,110	0,261
HDL3c, %	-0,069	0,682	0,016	0,871

*Prikazani podaci su dobijeni primenom Spearmanove korelacione analize.*

Na Slici 24 prikazane su značajne korelacije stepena globalne metilacije DNK sa ispitivanim laboratorijskim parametrima u grupi pacijenata sa T2DM. Sumirano, utvrdili smo značajne negativne korelacije udela 5mC sa koncentracijama hsCRP i PLR indeksom, a pozitivne korelacije sa koncentracijama AOPP, vrednostima TOS, TAS, kao i sa koncentracijama TG (Slika 24).



**Slika 24. Značajne korelacije 5mC i laboratorijskih parametara**

#### 4.10. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo kardiovaskularnih bolesti

U daljem toku istraživanja analizirani su laboratorijski parametri uzimajući u obzir prisustvo kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa T2DM.

##### 4.10.1. Parametri metaboličke kontrole

Tabela 19 prikazuje parametre metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo KVB. Koncentracija glukoze i udeo HbA<sub>1c</sub> bili su viši kod pacijenata bez KVB i kod pacijenata sa KVB u poređenju sa KG. Nasuprot tome, vrednosti AGE se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa.

**Tabela 19. Parametri metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo KVB**

Parametar	KG	Pacijenti bez KVB	Pacijenti sa KVB	<i>p</i>
Glukoza, mmol/L	5,20 (4,80–5,60)	9,25 (8,05–13,2) <sup>a***</sup>	10,78 (7,50–13,4) <sup>a***</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,22 (2,62–4,09)	10,2 (8,60–11,0) <sup>a***</sup>	9,95 (8,30–10,8) <sup>a***</sup>	< 0,001
AGE, U/mL	5,82 (4,91–7,71)	5,23 (4,36–6,30)	5,52 (4,81–7,12)	0,175
AGE, AU/g	8,09 (6,81–10,3)	7,15 (6,12–8,79)	7,84 (6,87–8,98)	0,185

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.10.2. Parametri redoks statusa

U Tabeli 20 je dat prikaz parametara redoks statusa u ispitivanim grupama. Vrednosti TOS, AOPP, PAB i IMA bile su više u obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Nasuprot tome, koncentracije MDA bile su niže kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Pored toga, vrednosti TOS bile su više kod pacijenata sa KVB u poređenju sa pacijentima bez ove komplikacije. Nije bilo razlike u aktivnosti SOD između analiziranih grupa. Vrednosti antioksidativnih parametara TAS i SH-grupa i aktivnosti PON1 bile su značajno niže u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok između pacijenata sa i bez KVB nisu uočene razlike u vrednostima ovih parametara.

**Tabela 20. Parametri redoks statusa u odnosu na prisustvo KVB**

Parametar	KG	Pacijenti bez KVB	Pacijenti sa KVB	p
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,5 (4,0–6,0)	6,3 (4,0–7,4)	7,0 (5,3–9,6) <sup>a***,b*</sup>	< 0,001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,20 (18,2–27,3)	50,60 (34,3–57,6) <sup>a***</sup>	48,40 (39,8–62,0) <sup>a***</sup>	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,59 (1,44–1,82) <sup>a***</sup>	1,78 (1,52–2,02) <sup>a***</sup>	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	85,9 (65,2–133) <sup>a*</sup>	89,1 (71,6–116) <sup>a**</sup>	< 0,001
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,54 (0,47–0,61) <sup>a***</sup>	0,57 (0,48–0,61) <sup>a***</sup>	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1384)	935 (673–1083) <sup>a***</sup>	1002 (863–1134) <sup>a***</sup>	< 0,001
SOD, U/mL	133 (124–141)	137 (124–142)	136,50 (124–143)	0,314
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,26 (0,16–0,30) <sup>a***</sup>	0,25 (0,19–0,32) <sup>a***</sup>	< 0,001
PON1, U/L	365 (233–927)	236 (177–518) <sup>a*</sup>	259 (134–426) <sup>a**</sup>	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez KVB na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.10.3. Parametri inflamacije

U Tabeli 21 dat je komparativni prikaz parametara inflamacije kod analiziranih grupa. Koncentracije hsCRP bile su značajno povišene u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, pri čemu su više koncentracije zabeležene kod pacijenata sa KVB. Slično tome, vrednosti MLR, MWR, SIRI i PIV indeksa bile su više kako kod pacijenata bez KVB, tako i kod pacijenata sa KVB u poređenju sa KG. Parametri NLR i SII pokazali su više vrednosti samo u grupi pacijenata sa KVB u odnosu na KG, dok je LWR bio niži isključivo u ovoj grupi. Vrednosti PLR i NWR se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa.

**Tabela 21. Parametri inflamacije u odnosu na prisustvo KVB**

Parametar	KG	Pacijenti bez KVB	Pacijenti sa KVB	<i>p</i>
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	4,70 (1,65–12,3) <sup>a***</sup>	6,35 (2,00–18,4) <sup>a***</sup>	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,04 (1,48–2,92)	2,32 (1,76–2,95) <sup>a*</sup>	< 0,05
PLR	107 (89,7–139)	108 (89,7–140)	114 (92,1–170)	0,521
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,59 (0,52–0,67)	0,62 (0,56–0,67)	0,247
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,23 (0,18–0,30) <sup>a***</sup>	0,24 (0,20–0,31) <sup>a***</sup>	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,07 (0,05–0,08) <sup>a***</sup>	0,06 (0,06–0,08) <sup>a**</sup>	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,29 (0,23–0,35)	0,27 (0,22–0,32) <sup>a**</sup>	< 0,01
SII	448 (343–608)	475 (344–772)	530 (402–844) <sup>a*</sup>	< 0,05
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	1,05 (0,67–1,55) <sup>a***</sup>	1,16 (0,84–2,06) <sup>a***</sup>	< 0,001
PIV	137 (101–239)	235 (151–459) <sup>a***</sup>	287 (194–530) <sup>a***</sup>	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  na osnovu Mann-Whitney U testa.

#### 4.10.4. Parametri dislipidemije

Tabela 22 prikazuje lipidni profil pacijenata u zavisnosti od KVB statusa. Koncentracije TC, LDL-h, HDL-h i non-HDL-h bile su niže u obe grupe pacijenata u poređenju sa KG, pri čemu su najniže vrednosti navedenih parametara zabeležene kod pacijenata sa KVB. Nasuprot tome, koncentracije TG bile su više u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, bez uočene razlike između samih grupa pacijenata. Nismo utvrdili razliku u aktivnosti LCAT i CETP između tri posmatrane grupe.

**Tabela 22. Parametri lipidnog profila u odnosu na prisustvo KVB**

Parametar	KG	Pacijenti bez KVB	Pacijenti sa KVB	p
TC, mmol/L	6,12 (5,29–7,01)	5,00 (3,90–5,80) <sup>a***</sup>	4,40 (3,40–5,25) <sup>a***</sup>	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,83 (3,20–4,61)	2,75 (2,00–3,65) <sup>a***</sup>	2,40 (1,80–3,20) <sup>a***</sup>	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,60 (1,30–1,90)	1,06 (0,83–1,35) <sup>a***</sup>	0,93 (0,72–1,10) <sup>a***</sup>	< 0,001
TG, mmol/L	1,19 (0,98–1,54)	1,70 (1,10–2,70) <sup>a*</sup>	1,85 (1,25–2,60) <sup>a***</sup>	< 0,001
non-HDL-h, mmol/L	4,45 (3,80–5,46)	3,61 (3,05–4,66) <sup>a**</sup>	3,36 (2,53–4,21) <sup>a***</sup>	< 0,001
LCAT, $\mu$ mol/L/h	69,5 (55,5–90,2)	63,7 (41,6–92,8)	67,7 (45,7–96,5)	0,801
CETP, $\mu$ mol/L/h	201 (140–251)	156 (95–255)	166 (115–276)	0,492

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Analiza LDL i HDL subfrakcija (Tabela 23) pokazala je da obe grupe pacijenata imaju značajno veći udeo LDL II, a manji udeo LDL IV i ukupnih sdLDL čestica u odnosu na KG. Pored toga, u grupi pacijenata sa KVB zabeležen je veći udeo LDL I, a manji udeo LDL III subfrakcija u poređenju sa KG. Kada je reč o HDL subfrakcijama, kod obe grupe pacijenata utvrđene su značajne razlike u HDL dijametru, kao i u udelima HDL2b i HDL3a subfrakcija u odnosu na KG. Udeo HDL2a subfrakcija bio je značajno viši kod obe grupe pacijenata, dok je udeo HDL3b bio viši isključivo kod pacijenata sa KVB u odnosu na KG. Nisu uočene značajne razlike u vrednostima LDL dijametra i udelu HDL3c čestica između ispitivanih grupa. Takođe, međusobnim poređenjem grupe pacijenata sa i bez KVB nisu utvrđene značajne razlike u distribuciji analiziranih subfrakcija lipoproteina.

**Tabela 23. Veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo KVB**

Parametar	KG	Pacijenti bez KVB	Pacijenti sa KVB	p
LDL dijametar, nm	26,3 (25,6–26,7)	26,0 (25,2–27,0)	26,0 (25,5–26,7)	0,724
LDL I, %	21,2 (18,3–24,5)	22,0 (19,6–30,8)	24,9 (19,6–30,1) <sup>a**</sup>	< 0,05
LDL II, %	26,0 (23,6–29,4)	29,2 (26,1–34,7) <sup>a***</sup>	30,7 (26,0–36,8) <sup>a***</sup>	< 0,01
LDL III, %	22,3 (20,5–24,4)	21,4 (16,2–25,1)	19,3 (15,1–23,8) <sup>a***</sup>	< 0,01
LDL IV, %	29,2 (24,8–33,5)	22,4 (19,6–25,2) <sup>a****</sup>	23,2 (17,6–28,2) <sup>a****</sup>	< 0,001
sdLDL, %	51,8 (48,4–55,4)	44,4 (36,3–51,4) <sup>a****</sup>	41,6 (34,5–50,1) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL dijametar, nm	10,3 (9,40–10,9)	9,20 (8,60–9,70) <sup>a****</sup>	8,90 (8,55–9,25) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	41,5 (33,9–45,2) <sup>a***</sup>	36,7 (31,5–43,6) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,3 (21,3–26,6) <sup>a****</sup>	23,8 (21,0–25,7) <sup>a***</sup>	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	16,9 (14,8–20,0) <sup>a****</sup>	18,7 (15,9–21,6) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,30–9,18)	8,34 (6,85–13,5)	10,1 (7,25–13,6) <sup>a***</sup>	< 0,05
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,56 (6,24–10,7)	8,76 (6,00–11,7)	0,111

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.10.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa KVB

U daljem toku analize sprovedi smo korelacionu analizu ispitivanih parametara u grupi pacijenata sa T2DM koji imaju KVB. Rezultati su prikazani u Tabeli 24. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija inflamatornih indeksa SII i PIV sa vrednostima PAB, kao i pozitivna korelacija koncentracija glukoze sa koncentracijama MDA. Pored toga, utvrđena je i značajna pozitivna korelacija koncentracija TG sa vrednostima TOS, te relativnih udela HDL2a subfrakcija sa TAS vrednostima. U ovoj grupi zabeležena je i značajna negativna korelacija PLR indeksa sa aktivnošću LCAT enzima i udelom LDL III subfrakcija.

**Tabela 24. Značajne korelacije ispitivanih parametara kod pacijenata sa KVB**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Inflamacija i redoks status	SII i PAB	0,507	< 0,001
	PIV i PAB	0,489	< 0,001
Lipidni profil i redoks status	TG i TOS	0,555	< 0,001
	HDL2a i TAS	0,560	< 0,001
Inflamacija i lipidni status	PLR i LDL III	-0,458	< 0,01
	PLR i LCAT	-0,439	< 0,01
Metabolička kontrola i redoks status	glukoza i MDA	0,496	< 0,01

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize.*

U daljem koraku ispitali smo dijagnostičku tačnost analiziranih laboratorijskih parametara da predvide prisustvo KVB. U cilju ispitivanja dijagnostičkog potencijala, u ROC analizu su inicijalno uključeni svi ispitivani biomarkeri, međutim, tabelarno su prikazani samo parametri koji su pokazali prihvatljivu diskriminativnu moć, odnosno čija je AUC iznosila više od 0,5, što predstavlja metodološki prag za kliničku relevantnost testa. Standardni parametri lipidnog statusa nisu prikazani u ovom modelu s obzirom na to da nisu ispunili navedeni kriterijum. Rezultati (Tabela 25) su pokazali da najveću AUC ima hsCRP pri *cut-off* vrednosti 1,1 mg/L. Prihvatljivu diskriminativnu moć imali su i AOPP (AUC > 0,7), dok je AUC za TOS bila na samoj granici (AUC = 0,696). Najslabiju diskriminativnu sposobnost od izdvojenih markera imali su PAB i SII indeks (AUC = 0,613).

**Tabela 25. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa i inflamacije**

<b>Parametar</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Osetljivost, %</b>	<b>Specifičnost, %</b>
hsCRP, mg/L	0,753	1,1	95,7	49,1
AOPP, $\mu$ mol/L	0,722	41,9	75,0	69,0
TOS, $\mu$ mol/L	0,696	5,1	81,2	50,5
SIRI	0,687	0,83	77,1	55,8
PIV	0,671	206	74,5	53,2
NLR	0,622	2,18	57,4	65,8
PAB, $\mu$ mol/L	0,613	75,3	69,6	52,2
SII	0,613	380	85,1	34,2

*Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.*

#### 4.11. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne nefropatije

Stratifikacija pacijenata prema prisustvu DNF ukazala je na značajne razlike u parametrima metaboličke kontrole, redoks statusa i lipidnog profila.

##### 4.11.1. Parametri metaboličke kontrole

Analiza parametara metaboličke kontrole (Tabela 26) pokazala je značajno više koncentracije glukoze i udela HbA<sub>1c</sub> kod pacijenata sa i bez DNF u poređenju sa KG. Pored toga, u grupi pacijenata sa DNF zabeležen je trend viših vrednosti AGE (AU/g) u odnosu na pacijente bez ove komplikacije, iako nije dostignuta statistička značajnost ( $p = 0,068$ ).

**Tabela 26. Parametri metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo DNF**

Parametar	KG	Pacijenti bez DNF	Pacijenti sa DNF	<i>p</i>
Glukoza, mmol/L	5,20 (4,80–5,60)	9,50 (7,60–13,2) <sup>a***</sup>	9,69 (7,50–14,4) <sup>a***</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,22 (2,63–4,09)	9,85 (8,58–11,0) <sup>a***</sup>	10,3 (8,45–10,8) <sup>a***</sup>	< 0,001
AGE, U/mL	5,82 (4,91–7,71)	5,40 (4,54–6,59)	6,04 (5,18–7,52)	0,106
AGE, AU/g	8,09 (6,81–10,3)	7,26 (6,12–8,71)	9,37 (7,64–11,4)	< 0,05

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG: \*\*\*  $p < 0,001$  na osnovu Mann-Whitney U testa.

#### 4.11.2. Parametri redoks statusa

U daljem toku analize, ispitivanje parametara oksidativnog stresa (Tabela 27) pokazalo je da su najviše vrednosti AOPP, PAB i IMA, uz istovremeno najniže vrednosti TAS i SH-grupe, zabeležene u grupi pacijenata sa DNF. Koncentracije MDA bile su značajno niže kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG.

**Tabela 27. Parametri redoks statusa u odnosu na prisustvo DNF**

Parametar	KG	Pacijenti bez DNF	Pacijenti sa DNF	<i>p</i>
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,50 (4,00–6,00)	6,60 (4,70–7,90) <sup>a**</sup>	6,50 (5,10–9,50) <sup>a*</sup>	< 0,001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,2 (18,3–27,4)	48,7 (33,6–57,9) <sup>a***</sup>	51,6 (41,9–68,5) <sup>a***</sup>	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,65 (1,44–1,99) <sup>a***</sup>	1,81 (1,68–1,99) <sup>a**</sup>	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	85,9 (67,7–124) <sup>a**</sup>	103 (74,6–165) <sup>a**</sup>	< 0,001
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,55 (0,47–0,62) <sup>a***</sup>	0,58 (0,53–0,61) <sup>a***</sup>	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1385)	963 (732–1112) <sup>a***</sup>	925 (590–1140) <sup>a***</sup>	< 0,001
SOD, U/mL	133 (124–141)	138 (127–143)	131 (122–136)	0,059
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,26 (0,16–0,31) <sup>a***</sup>	0,25 (0,21–0,30) <sup>a**</sup>	< 0,001
PON1, U/L	365 (233–928)	248 (153–521) <sup>a**</sup>	311 (139–353) <sup>a*</sup>	< 0,001

*Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.*

<sup>a</sup> *Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).*

#### 4.11.3. Parametri inflamacije

Naredni korak obuhvatio je ispitivanje parametara sistemske inflamacije (Tabela 28). Koncentracije hsCRP, kao i vrednosti kompozitnih indeksa MLR, MWR, SIRI i PIV bile su značajno više u obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. S druge strane, vrednosti LWR bile su značajno niže samo kod pacijenata bez DNF u odnosu na KG. Poređenjem grupa pacijenata sa i bez DNF nije utvrđena statistički značajna razlika ni u jednom od navedenih inflamatornih markera.

**Tabela 28. Parametri inflamacije u odnosu na prisustvo DNF**

Parametar	KG	Pacijenti bez DNF	Pacijenti sa DNF	<i>p</i>
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	5,60 (1,80–12,4) <sup>a****</sup>	7,50 (1,90–15,0) <sup>a****</sup>	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,18 (1,64–2,93)	2,17 (1,48–2,92)	0,051
PLR	107 (89,8–139)	113 (91,6–148)	104,8 (87,1–148)	0,494
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,61 (0,54–0,67)	0,58 (0,53–0,65)	0,538
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,23 (0,20–0,30) <sup>a****</sup>	0,26 (0,18–0,33) <sup>a**</sup>	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,06 (0,06–0,08) <sup>a****</sup>	0,07 (0,05–0,09) <sup>a*</sup>	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,28 (0,23–0,33) <sup>a**</sup>	0,28 (0,21–0,34)	< 0,01
SII	448 (344–609)	503 (380–789)	522 (385–734)	0,135
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	1,08 (0,75–1,76) <sup>a****</sup>	1,11 (0,76–2,05) <sup>a**</sup>	< 0,001
PIV	137 (102–239)	255 (151–485) <sup>a****</sup>	272 (203–489) <sup>a**</sup>	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

#### 4.11.4. Parametri dislipidemije

U daljem toku istraživanja, analiziran je lipidni profil ispitivanih grupa (Tabela 29). Zabeležene su značajno niže koncentracije TC, LDL-h, HDL-h i non-HDL-h kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Pored toga, koncentracije TG bile su značajno više u obe grupe pacijenata u odnosu na koncentracije u KG. Razlike u aktivnostima LCAT i CETP između analiziranih grupa nisu bile značajne. Takođe, nije bilo razlike u ispitivanim lipidnim parametrima između grupa pacijenata bez i sa DNF.

**Tabela 29. Parametri lipidnog profila u odnosu na prisustvo DNF**

Parametar	KG	Pacijenti bez DNF	Pacijenti sa DNF	<i>p</i>
TC, mmol/L	6,12 (5,29–7,01)	4,50 (3,80–5,50) <sup>a***</sup>	4,40 (3,85–5,50) <sup>a***</sup>	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,83 (3,20–4,61)	2,60 (1,90–3,45) <sup>a***</sup>	2,30 (2,05–3,20) <sup>a***</sup>	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,60 (1,30–1,90)	1,02 (0,82–1,21) <sup>a***</sup>	0,89 (0,69–0,96) <sup>a***</sup>	< 0,001
TG, mmol/L	1,19 (0,98–1,54)	1,70 (1,10–2,60) <sup>a**</sup>	2,40 (1,45–2,95) <sup>a**</sup>	< 0,001
non-HDL-h, mmol/L	4,45 (3,80–5,46)	3,54 (2,72–4,28) <sup>a***</sup>	3,67 (2,61–4,21) <sup>a**</sup>	< 0,001
LCAT, μmol/L/h	69,5 (55,5–90,2)	66,5 (46,0–99,7)	57,6 (35,3–78,2)	0,159
CETP, μmol/L/h	201 (140–251)	167 (104–279)	120 (102–210)	0,211

*Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.*

*<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).*

Radi sveobuhvatnog sagledavanja lipidnog profila, u nastavku su analizirane subfrakcije LDL i HDL čestica (Tabela 30). U odnosu na KG, kod obe grupe pacijenata zabeležen je značajno manji HDL dijametar, niži udeo HDL2b i viši udeo HDL3a subfrakcija. Sa druge strane, značajne promene u distribuciji LDL subfrakcija (viši udeo LDL I i LDL II, a niži udeo LDL III, LDL IV i sdLDL čestica), kao i viši udeo HDL2a subfrakcija, utvrđene su samo u grupi pacijenata bez DNF u poređenju sa KG. Nismo utvrdili statistički značajnu razliku u analiziranim parametrima između samih grupa pacijenata sa i bez DNF.

**Tabela 30. Veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo DNF**

Parametar	KG	Pacijenti bez DNF	Pacijenti sa DNF	p
LDL dijametar, nm	26,3 (25,6–26,7)	26,0 (25,4–27,1)	25,6 (25,0–26,3)	0,081
LDL I, %	21,2 (18,2–24,4)	23,7 (19,8–31,0) <sup>a*</sup>	23,3 (19,2–26,9)	< 0,05
LDL II, %	26,0 (23,5–29,3)	30,5 (26,0–36,0) <sup>****</sup>	27,0 (25,0–33,0)	< 0,001
LDL III, %	22,3 (20,5–24,4)	19,6 (15,2–24,8) <sup>a*</sup>	22,0 (19,3–23,6)	< 0,05
LDL IV, %	29,2 (24,7–33,4)	22,3 (18,3–25,4) <sup>****</sup>	24,4 (15,9–30,6)	< 0,001
sdLDL, %	51,8 (48,4–55,4)	43,0 (34,7–50,5) <sup>****</sup>	48,9 (41,6–56,0)	< 0,001
HDL dijametar, nm	10,3 (9,40–10,9)	9,00 (8,55–9,40) <sup>****</sup>	8,80 (8,60–9,40) <sup>***</sup>	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	40,1 (32,9–45,1) <sup>****</sup>	40,1 (35,2–43,7) <sup>a*</sup>	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,7 (21,3–26,6) <sup>****</sup>	22,6 (20,3–25,6)	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	17,3 (14,9–21,1) <sup>****</sup>	17,9 (16,5–21,3) <sup>****</sup>	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,30–9,18)	9,61 (7,13–13,7)	8,95 (6,95–10,8)	0,059
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,75 (6,24–10,8)	7,24 (4,50–13,4)	0,122

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,001).

#### 4.11.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DNF

Korelaciona analiza u grupi pacijenata sa DNF (Tabela 31) pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju između aktivnosti PON1 i koncentracije HDL-h, kao i koncentracije SH-grupa sa veličinom HDL čestica. Utvrđena je i značajna pozitivna korelacija koncentracije MDA sa koncentracijom LDL-h i dijametrom LDL čestica, dok su TOS vrednosti pozitivno korelirale sa koncentracijama TG. Takođe, uočena je značajna negativna korelacija između vrednosti PAB i aktivnosti CETP. Dodatno, koncentracija glukoze je pozitivno korelirala sa vrednostima sistemskog inflamatornog indeksa SII.

**Tabela 31. Značajne korelacije ispitivanih parametara kod pacijenata sa DNF**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Redoks status i lipidni profil	PON1 i HDL-h	0,799	< 0,001
	MDA i LDL-h	0,749	< 0,01
	TOS i TG	0,713	< 0,01
	PAB i CETP	-0,692	< 0,01
	MDA i LDL dijametar	0,629	< 0,01
	SH-grupe i HDL dijametar	0,622	< 0,01
Metabolička kontrola i inflamacija	Glukoza i SII	0,714	< 0,01

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize.*

U cilju procene dijagnostičke tačnosti, sprovedena je ROC analiza. Radi evaluacije dijagnostičkog značaja, inicijalna ROC analiza obuhvatila je celokupan panel posmatranih biomarkera. U cilju jasnijeg prikaza, tabelarno su izdvojeni samo oni pokazatelji koji imaju klinički značajnu diskriminativnu moć, definisanu vrednošću AUC > 0,5 (Tabela 32). Rezultati su pokazali da klinički prihvatljivu vrednost AUC ima AOPP (AUC > 0,7) uz osetljivost od 88,2%, ali nedovoljnu specifičnost. Pored AOPP, analizom je utvrđeno da je hsCRP imao granično prihvatljivu vrednost AUC, dok su ostali parametri imali umerenu diskriminacionu sposobnost. Najniža AUC zabeležena je za SOD.

**Tabela 32. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa i inflamacije**

<b>Parametar</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Osetljivost, %</b>	<b>Specifičnost, %</b>
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,717	35,9	88,2	55,2
hsCRP, mg/L	0,699	1,3	88,2	42,8
PAB, U/L	0,658	93,8	70,6	71,3
PIV	0,642	148	93,8	36,4
TAS, $\mu\text{mol/L}$	0,640	947	58,8	72,9
SIRI	0,611	1,1	58,8	65,5
SOD, IU/L	0,609	134	70,6	56,2

*Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.*

## 4.12. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne retinopatije

### 4.12.1. Parametri metaboličke kontrole

Analiza parametara metaboličke kontrole (Tabela 33) pokazala je značajno više koncentracije glukoze i udela HbA<sub>1c</sub> u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok se vrednosti između ove dve grupe pacijenata nisu razlikovale. Sa druge strane, vrednosti AGE su bile značajno više u grupi pacijenata sa DR u poređenju sa pacijentima bez ove mikrovaskularne komplikacije ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 33. Parametari metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo DR**

Parametar	KG	Pacijenti bez DR	Pacijenti sa DR	<i>p</i>
Glukoza, mmol/L	5,20 (4,80–5,60)	9,75 (7,50–13,4) <sup>a***</sup>	8,60 (8,10–11,0) <sup>a***</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,22 (2,63–4,09)	9,95 (8,60–10,8) <sup>a***</sup>	10,85 (8,05–11,1) <sup>a***</sup>	< 0,001
AGE, U/mL	5,82 (4,91–7,71)	5,41 (4,54–6,59)	7,73 (5,77–9,48) <sup>b*</sup>	< 0,05
AGE, AU/g	8,09 (6,81–10,3)	7,28 (6,12–8,73)	10,33 (8,39–13,0) <sup>b*</sup>	< 0,05

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa ( $***p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DR na osnovu Mann-Whitney U testa ( $*p < 0,05$ )

#### 4.12.2 Parametri redoks statusa

Analiza redoks statusa (Tabela 34) pokazala je značajno više vrednosti prooksidativnih markera (TOS, AOPP, PAB, IMA), a niže vrednosti parametara antioksidativne zaštite (SH-grupe, PON1) kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Uočeni su i značajno niži nivoi TAS isključivo u grupi pacijenata bez DR u poređenju sa KG, dok se u grupi pacijenata sa DR ove vrednosti nisu značajno razlikovale u odnosu na zdrave ispitanike.

**Tabela 34. Parametri redoks statusa u odnosu na prisustvo DR**

Parametar	KG	Pacijenti bez DR	Pacijenti sa DR	<i>p</i>
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,50 (4,00–6,00)	6,55 (4,50–8,00) <sup>***</sup>	7,05 (5,85–8,40) <sup>a*</sup>	< 0,01
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,2 (18,3–27,4)	48,5 (34,3–58,5) <sup>****</sup>	57,0 (44,8–73,7) <sup>****</sup>	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,68 (1,47–1,99) <sup>****</sup>	1,65 (1,40–1,84) <sup>***</sup>	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	88,7 (67,8–131) <sup>***</sup>	94,9 (58,5–106) <sup>***</sup>	< 0,01
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,56 (0,47–0,62) <sup>****</sup>	0,52 (0,50–0,58) <sup>****</sup>	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1385)	950 (673–1120) <sup>****</sup>	1078 (1000–1113)	< 0,001
SOD, U/mL	133 (124–141)	136 (123–142)	139 (130–147)	0,198
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,26 (0,18–0,31) <sup>****</sup>	0,22 (0,20–0,32) <sup>***</sup>	< 0,001
PON1, U/L	365 (233–928)	256 (153–487) <sup>a**</sup>	152 (120–473) <sup>a*</sup>	< 0,01

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 4.12.3 Parametri inflamacije

Naredni korak obuhvatio je ispitivanje parametara hronične inflamacije (Tabela 35). Koncentracije hsCRP i MLR, MWR i SIRI vrednosti bile su značajno više kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Pored toga, značajno niže vrednosti LWR i značajno više vrednosti PIV zabeležene su isključivo u grupi pacijenata bez DR u odnosu na KG. Vrednosti inflamatornih parametara nisu se razlikovale između grupe sa i bez DR.

**Tabela 35. Parametri inflamacije u odnosu na prisustvo DR**

Parametar	KG	Pacijenti bez DR	Pacijenti sa DR	<i>p</i>
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	6,00 (1,85–14,5) <sup>****</sup>	2,65 (1,55–6,70) <sup>**</sup>	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,18 (1,58–2,97)	2,17 (1,83–2,76)	0,055
PLR	107 (89,8–139)	110 (91,0–151)	108,9 (93,5–125)	0,617
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,61 (0,54–0,67)	0,58 (0,55–0,60)	0,411
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,24 (0,20–0,30) <sup>****</sup>	0,25 (0,21–0,33) <sup>***</sup>	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,07 (0,05–0,08) <sup>****</sup>	0,07 (0,06–0,08) <sup>**</sup>	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,28 (0,23–0,34) <sup>***</sup>	0,28 (0,22–0,30)	< 0,01
SII	448 (344–609)	512 (377–798)	400 (391–627)	0,117
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	1,08 (0,73–1,82) <sup>****</sup>	1,23 (0,95–1,62) <sup>***</sup>	< 0,001
PIV	137 (102–239)	260 (170–495) <sup>****</sup>	254 (143–441)	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

#### 4.12.4. Parametri dislipidemije

U daljem toku istraživanja, analiziran je lipidni status pacijenata u odnosu na prisustvo DR (Tabela 36). U poređenju sa KG, kod obe grupe pacijenata zabeležene su značajno niže koncentracije HDL-h i više koncentracije TG. Sa druge strane, značajno niže koncentracije TC, LDL-h i non-HDL-h uočene su isključivo u grupi pacijenata bez DR u odnosu na KG. Nismo utvrdili razliku u aktivnosti LCAT i CETP između posmatranih grupa, kao ni razlike u analiziranim lipidnim parametrima između pacijenata sa i bez DR.

**Tabela 36. Parametri lipidnog profila u odnosu na prisustvo DR**

Parametar	KG	Pacijenti bez DR	Pacijenti sa DR	<i>p</i>
TC, mmol/L	6,12 (5,29–7,01)	4,45 (3,70–5,50) <sup>****</sup>	4,85 (4,40–6,10)	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,83 (3,20–4,61)	2,60 (1,90–3,30) <sup>****</sup>	2,65 (2,10–3,70)	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,60 (1,30–1,90)	0,99 (0,82–1,20) <sup>****</sup>	0,96 (0,66–1,39) <sup>***</sup>	< 0,001
TG, mmol/L	1,19 (0,98–1,54)	1,70 (1,10–2,60) <sup>***</sup>	2,50 (1,30–3,80) <sup>**</sup>	< 0,01
non-HDL-h, mmol/L	4,45 (3,80–5,46)	3,54 (2,66–4,25) <sup>****</sup>	3,82 (3,38–4,38)	< 0,001
LCAT, $\mu$ mol/L/h	69,5 (55,6–90,3)	66,5 (44,5–95,9)	57,6 (24,5–62,4)	0,179
CETP, $\mu$ mol/L/h	202 (140–251)	167 (106–275)	119 (53,3–130)	0,089

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\*\**p* < 0,001).

Analiza lipoproteinskih subfrakcija (Tabela 37) pokazala je da je u poređenju sa KG, kod obe grupe pacijenata zabeležen značajno manji HDL dijametar, niži udeo LDL IV i HDL2b, a viši udeo HDL3a subfrakcija. S druge strane, kod pacijenata sa DR u odnosu na KG utvrđene su značajne promene u distribuciji ostalih subfrakcija, viši udeo LDL I, LDL II i HDL2a, kao i niži udeo LDL III i sdLDL čestica. Za razliku od distribucije subfrakcija, nije utvrđena značajna razlika u LDL dijamentru između posmatranih grupa.

**Tabela 37. Veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo DR**

Parametar	KG	Pacijenti bez DR	Pacijenti sa DR	<i>p</i>
LDL dijametar, nm	26,3 (25,6–26,7)	26,0 (25,3–26,9)	25,9 (25,3–27,0)	0,700
LDL I, %	21,2 (18,3–24,5)	23,7 (19,6–30,8) <sup>a*</sup>	24,4 (20,9–26,9)	< 0,05
LDL II, %	26,0 (23,6–29,4)	30,3 (25,8–36,0) <sup>****</sup>	28,5 (26,3–33,8)	< 0,01
LDL III, %	22,3 (20,5–24,4)	19,9 (15,6–24,6) <sup>a*</sup>	22,2 (19,7–26,5)	< 0,05
LDL IV, %	29,2 (24,8–33,5)	22,7 (18,4–27,5) <sup>****</sup>	22,6 (16,6–25,2) <sup>a*</sup>	< 0,001
sdLDL, %	51,8 (48,4–55,4)	43,6 (34,9–51,4) <sup>****</sup>	43,8 (37,5–51,1)	< 0,001
HDL dijametar, nm	10,3 (9,40–10,90)	9,00 (8,60–9,40) <sup>****</sup>	8,75 (8,45–9,65) <sup>***</sup>	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	40,1 (33,6–44,9) <sup>****</sup>	36,8 (29,7–42,3) <sup>a*</sup>	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,7 (21,3–26,4) <sup>****</sup>	22,1 (20,9–27,0)	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	17,5 (14,9–21,3) <sup>****</sup>	17,9 (16,0–19,8) <sup>a*</sup>	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,30–9,18)	9,45 (7,07–13,6)	10,1 (7,80–14,3)	0,052
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,56 (6,20–11,0)	9,78 (5,69–14,2)	0,098

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001)

#### 4.12.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DR

U narednom koraku ispitali smo postojanje značajnih korelacija između analiziranih parametara kod pacijenata sa DR (Tabela 38). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija TAS vrednosti i udela HDL2a subfrakcija, a negativna između aktivnosti SOD i udela HDL3a čestica. Koncentracija AOPP pozitivno je korelirala sa koncentracijom TG. Vrednosti indeksa MWR su bile u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima TAS i udelom HDL2a subfrakcija, a u negativnoj sa koncentracijom MDA. Pored toga, uočena je značajna negativna korelacija vrednosti AGE (AU/g) i udela HDL3c subfrakcija.

**Tabela 38. Značajne korelacije ispitivanih parametara kod pacijenata sa DR**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Redoks status i lipidni profil	TAS i HDL2a	0,929	< 0,001
	SOD i HDL3a	-0,833	< 0,05
	AOPP i TG	0,826	< 0,05
Inflamacija i redoks status	MWR i TAS	0,857	< 0,01
	MWR i MDA	-0,850	< 0,01
Inflamacija i lipidni profil	MWR i HDL2a	0,881	< 0,01
Metabolička kontrola i lipidi	AGE (AU/g) i HDL3c	-0,857	< 0,05

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize.*

Na kraju, ispitali smo i dijagnostičku tačnost analiziranih parametara u grupi sa DR, a rezultati su prikazani u Tabeli 39. Utvrdili smo da najveću i prihvatljivu AUC ima AOPP (AUC > 0,7).

**Tabela 39. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa i inflamacije**

Parametar	AUC	Cut-off	Osetljivost, %	Specifičnost, %
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,754	40,7	87,5	57,1
TOS, $\mu\text{mol/L}$	0,664	5,10	100	42,8
SIRI	0,644	1,10	75,0	64,9
MWR	0,623	0,059	87,5	47,7

*Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.*

#### 4.13. Analiza laboratorijskih parametara u odnosu na prisustvo dijabetesne neuropatije

U daljem toku istraživanja, analizirani su parametri kod pacijenata stratifikovanih prema prisustvu DN.

##### 4.13.1. Parametri metaboličke kontrole

Analiza parametara metaboličke kontrole (Tabela 40) pokazala je značajno više koncentracije glukoze i HbA<sub>1c</sub> kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Iako je inicijalna analiza ukazala na varijacije u vrednostima AGE (U/mL), nakon *post hoc* analize nisu potvrđene značajne razlike između ispitivanih grupa.

**Tabela 40. Parametri metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo DN**

Parametar	KG	Pacijenti bez DN	Pacijenti sa DN	<i>p</i>
Glukoza, mmol/L	5,20 (4,80–5,60)	10,10 (7,70–13,4) <sup>a***</sup>	9,00 (7,55–12,5) <sup>a***</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,22 (2,63–4,09)	10,20 (9,15–11,5) <sup>a***</sup>	9,10 (7,85–10,7) <sup>a***</sup>	< 0,001
AGE, U/mL	5,82 (4,91–7,71)	5,08 (4,34–6,32)	5,86 (4,89–7,34)	< 0,05
AGE, AU/g	8,09 (6,81–10,3)	7,14 (5,85–8,85)	7,99 (6,71–8,90)	0,123

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.13.2. Parametri redoks statusa

Naredni korak bio je ispitivanje parametara redoks statusa, a uporedni prikaz rezultata dat je u Tabeli 41. Vrednosti prooksidativnih markera TOS, AOPP i IMA bile su značajno više, dok su vrednosti antioksidativnih parametara TAS, SH-grupa i PON1, kao i koncentracije MDA bile značajno niže kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Kada je reč o PAB vrednostima, u grupi pacijenata sa DN bile su značajno veće u odnosu na KG. Iako se podaci nisu značajno razlikovali između grupa sa i bez DN, uočen je trend viših vrednosti prooksidativnih, a nižih vrednosti antioksidativnih markera u grupi sa DN. Aktivnosti SOD se nisu značajno razlikovale između grupa.

**Tabela 41. Parametri redoks statusa u odnosu na prisustvo DN**

Parametar	KG	Pacijenti bez DN	Pacijenti sa DN	p
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,50 (4,00–6,00)	6,50 (5,25–7,55) <sup>a****</sup>	6,80 (4,20–9,05) <sup>a***</sup>	< 0,01
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,2 (18,3–27,4)	48,2 (36,0–57,5) <sup>a****</sup>	50,6 (36,6–61,0) <sup>a****</sup>	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,68 (1,47–1,96) <sup>a****</sup>	1,74 (1,44–1,99) <sup>a****</sup>	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	83,3 (63,9–106)	99,6 (69,6–155) <sup>a****</sup>	< 0,001
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,56 (0,46–0,61) <sup>a****</sup>	0,55 (0,48–0,62) <sup>a****</sup>	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1385)	972 (660–1140) <sup>a****</sup>	959 (732–1083) <sup>a****</sup>	< 0,001
SOD, U/mL	133 (124–141)	136 (127–143)	136,5 (123–142)	0,352
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,24 (0,17–0,30) <sup>a****</sup>	0,27 (0,19–0,33) <sup>a****</sup>	< 0,001
PON1, U/L	365 (233–928)	234 (147–501) <sup>a**</sup>	270 (149–476) <sup>a**</sup>	< 0,01

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

#### 4.13.3. Parametri inflamacije

Daljom analizom inflamatornih markera (Tabela 42) utvrđene su značajno više koncentracije hsCRP, kao i vrednosti indeksa MLR, MWR, SIRI i PIV kod pacijenata sa i bez DN u poređenju sa KG. Nasuprot tome, vrednosti indeksa LWR bile su značajno niže kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Poređenjem grupa pacijenata sa i bez DN, nije utvrđena značajna razlika ni za jedan od analiziranih parametara.

**Tabela 42. Parametri inflamacije u odnosu na prisustvo DN**

Parametar	KG	Pacijenti bez DN	Pacijenti sa DN	<i>p</i>
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	5,60 (1,65–12,6) <sup>a***</sup>	6,35 (1,95–17,4) <sup>a***</sup>	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,18 (1,60–2,91)	2,12 (1,63–2,97)	0,055
PLR	107 (89,8–139)	105 (90,8–136)	123 (92,2–167)	0,146
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,61 (0,53–0,66)	0,59 (0,54–0,67)	0,762
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,24 (0,19–0,32) <sup>a***</sup>	0,25 (0,20–0,30) <sup>a***</sup>	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,07 (0,06–0,09) <sup>a***</sup>	0,06 (0,06–0,08) <sup>a***</sup>	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,28 (0,23–0,33) <sup>a*</sup>	0,28 (0,21–0,34) <sup>a*</sup>	< 0,01
SII	448 (344–609)	476 (376–747)	522 (393–927)	0,072
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	1,07 (0,74–1,82) <sup>a***</sup>	1,11 (0,76–1,79) <sup>a***</sup>	< 0,001
PIV	137 (102–239)	243 (147–470) <sup>a***</sup>	289 (166–518) <sup>a***</sup>	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.13.4. Parametri dislipidemije

Kada je reč o analizi lipidnog profila u odnosu na prisustvo DN (Tabela 43), zabeležene su značajno niže koncentracije TC, LDL-h, HDL-h i non-HDL-h kod svih pacijenata u poređenju sa KG. Suprotno, koncentracije TG bile su značajno više u obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Analizom enzimske aktivnosti utvrđena je značajna razlika u aktivnosti CETP među ispitivanim grupama, pri čemu su najniže vrednosti zabeležene u grupi pacijenata sa DN. Sa druge strane, nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti LCAT.

**Tabela 43. Parametri lipidnog profila u odnosu na prisustvo DN**

Parametar	KG	Pacijenti bez DN	Pacijenti sa DN	<i>p</i>
TC, mmol/L	6,12 (5,29–7,01)	4,20 (3,80–5,20) <sup>a***</sup>	5,05 (3,70–5,60) <sup>a***</sup>	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,83 (3,20–4,61)	2,40 (2,00–3,30) <sup>a***</sup>	2,80 (1,75–3,60) <sup>a***</sup>	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,60 (1,30–1,90)	0,92 (0,82–1,16) <sup>a***</sup>	1,06 (0,80–1,28) <sup>a***</sup>	< 0,001
TG, mmol/L	1,19 (0,98–1,54)	1,80 (1,10–2,70) <sup>a**</sup>	1,70 (1,10–2,60) <sup>a**</sup>	< 0,001
non-HDL-h, mmol/L	4,45 (3,80–5,46)	3,27 (2,89–4,21) <sup>a***</sup>	3,90 (2,31–4,40) <sup>a**</sup>	< 0,001
LCAT, μmol/L/h	69,5 (55,6–90,3)	77,3 (43,3–103)	59,9 (42,4–85,7)	0,149
CETP, μmol/L/h	202 (140–251)	201 (111–292)	141 (79,9–210)	< 0,05

*Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.*

*<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).*

Analiza distribucije lipoproteinskih subfrakcija (Tabela 44) pokazala je značajne razlike među ispitivanim grupama. Kod obe grupe pacijenata utvrđen je značajno viši udeo LDL II, HDL2a i HDL3a subfrakcija, a značajno manji HDL dijametar, kao i manji udeo LDL IV, sdLDL i HDL2b čestica u odnosu na KG. Specifično, samo u grupi pacijenata sa DN uočen je značajno viši udeo LDL I i niži udeo LDL III subfrakcija u poređenju sa KG, dok je isključivo kod pacijenata bez DN zabeležen značajno viši udeo HDL3b subfrakcija. Poređenjem samih grupa pacijenata, utvrđeno je da pacijenti sa DN imaju značajno viši udeo LDL I i HDL2b, a značajno niži udeo HDL3a i HDL3b subfrakcija u odnosu na pacijente bez ove komplikacije.

**Tabela 44. Veličina i raspodela LDL i HDL u odnosu na prisustvo DN**

Parametar	KG	Pacijenti bez DN	Pacijenti sa DN	<i>p</i>
LDL dijametar, nm	26,3 (25,6–26,7)	26,0 (25,2–26,7)	26,0 (25,3–27,1)	0,547
LDL I, %	21,2 (18,3–24,5)	21,8 (18,6–27,6)	26,9 (21,4–32,8) <sup>a**,b*</sup>	< 0,01
LDL II, %	26,0 (23,6–29,4)	28,8 (25,7–36,0) <sup>a**</sup>	30,0 (26,2–36,0) <sup>a**</sup>	< 0,01
LDL III, %	22,3 (20,5–24,4)	22,0 (17,1–24,9)	19,0 (15,2–24,1) <sup>a**</sup>	< 0,01
LDL IV, %	29,2 (24,8–33,5)	23,7 (18,9–28,8) <sup>a****</sup>	21,8 (18,3–25,4) <sup>a****</sup>	< 0,001
sdLDL, %	51,8 (48,4–55,4)	43,6 (34,9–51,4) <sup>a**</sup>	43,8 (37,5–51,1) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL dijametar, nm	10,3 (9,40–10,9)	8,90 (8,50–9,30) <sup>a****</sup>	9,15 (8,70–10,1) <sup>a**</sup>	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	36,8 (31,0–43,3) <sup>a****</sup>	41,9 (35,2–49,1) <sup>a**,b*</sup>	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,7 (21,0–26,1) <sup>a**</sup>	23,5 (21,5–26,8) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	19,4 (16,2–23,0) <sup>a****</sup>	16,7 (12,9–19,0) <sup>a**,b**</sup>	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,30–9,18)	10,2 (8,29–13,9) <sup>a**</sup>	7,52 (6,05–11,1) <sup>b**</sup>	< 0,001
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,56 (6,42–11,1)	8,85 (4,50–11,1)	0,101

*Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.*

*<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).*

*<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DN na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01).*

#### 4.13.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DN

U cilju daljeg sagledavanja odnosa između analiziranih parametara, sprovedena je korelaciona analiza u grupi pacijenata sa DN (Tabela 45). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija vrednosti TOS i AOPP sa koncentracijom TG. Vrednosti PAB pokazale su značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijama hsCRP, kao i sa relativnim udelom HDL2b subfrakcija. Pored toga, među parametrima metaboličke kontrole, udeo HbA<sub>1c</sub> je značajno pozitivno korelirao sa koncentracijom TG i udelom HDL3c subfrakcija. Takođe, zabeležena je značajna negativna korelacija između indeksa PLR i udela HDL3c subfrakcija.

**Tabela 45. Značajne korelacije ispitivanih parametara kod pacijenata sa DN**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Redoks status i lipidni profil	TOS i TG	0,645	< 0,001
	PAB i HDL2b	0,523	< 0,001
	AOPP i TG	0,491	< 0,001
Inflamacija i redoks status	hsCRP i PAB	0,547	< 0,001
Metabolička kontrola i lipidni profil	HbA <sub>1c</sub> i HDL3c	0,472	< 0,01
	HbA <sub>1c</sub> i TG	0,471	< 0,01
Inflamacija i lipidni profil	PLR i HDL3c	-0,424	< 0,01

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize.*

Rezultati analize dijagnostičke tačnosti (Tabela 46) pokazali su da najveću AUC u identifikaciji DN imaju hsCRP i AOPP (AUC > 0,7). Pored ovih parametara, prihvatljiva diskriminativna sposobnost utvrđena je za TAS (AUC = 0,683), dok su preostali markeri inflamacije i redoks statusa pokazali slabiju dijagnostičku efikasnost.

**Tabela 46. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa i inflamacije**

<b>Marker</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Osetljivost (%)</b>	<b>Specifičnost (%)</b>
hsCRP, mg/L	0,741	0,80	95,8	43,0
AOPP, $\mu$ mol/L	0,738	32,8	84,3	62,2
TAS, $\mu$ mol/L	0,683	1120	82,4	60,9
PAB, U/L	0,681	93,0	58,0	77,3
PIV	0,671	274	58,0	70,6
SIRI	0,651	0,65	84,3	40,5
TOS, $\mu$ mol/L	0,612	6,20	64,7	59,6
MWR	0,605	0,058	74,0	52,3

*Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.*

#### 4.14. Analiza parametara u odnosu na prisustvo dijabetesnog stopala

U okviru sveobuhvatne analize uticaja hroničnih komplikacija, posebno je ispitan i biohemijski profil pacijenata sa dijagnostikovanim DS, kao krajnjim stadijumom mikrovaskularnih i neuropatskih oštećenja.

##### 4.14.1. Parametri metaboličke kontrole

Evaluacijom parametara metaboličke kontrole (Tabela 47) utvrđene su značajno više koncentracije glukoze i veći udeo HbA<sub>1c</sub> kod pacijenata sa i bez DS u odnosu na KG. Prilikom poređenja samih pacijenata, udeo HbA<sub>1c</sub> bio je veći kod pacijenata bez DS u poređenju sa grupom koja ima ovu komplikaciju. S druge strane, za koncentracije glukoze i vrednosti AGE nisu utvrđene značajne razlike između pacijenata sa i bez DS.

**Tabela 47. Parametri metaboličke kontrole u odnosu na prisustvo DS**

Parametar	KG	Pacijenti bez DS	Pacijenti sa DS	<i>p</i>
Glukoza, mmol/L	5,20 (4,80–5,60)	10,1 (8,20–14,2) <sup>a***</sup>	8,14 (7,00–10,7) <sup>a***</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	3,22 (2,63–4,09)	10,2 (9,05–11,1) <sup>a***</sup>	8,18 (7,23–10,2) <sup>a***,b*</sup>	< 0,001
AGE, U/mL	5,82 (4,91–7,71)	5,47 (4,70–6,70)	5,44 (4,36–8,05)	0,366
AGE, AU/g	8,09 (6,81–10,3)	7,36 (6,26–8,79)	7,82 (6,32–11,0)	0,176

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DS na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05).

#### 4.14.2. Parametri redoks statusa

Analiza parametara redoks statusa (Tabela 48) ukazala je na značajne razlike među ispitivanim grupama. Vrednosti prooksidativnih markera AOPP i IMA bile su značajno više, dok su vrednosti MDA, TAS, SH-grupa i PON1 bile značajno niže kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Kada je reč o TOS vrednostima i aktivnosti SOD, značajno više vrednosti u odnosu na KG zabeležene su isključivo kod pacijenata bez DS. Sa druge strane, vrednosti PAB bile su značajno više samo u grupi pacijenata sa DS u odnosu na KG. Prilikom poređenja samih grupa pacijenata, kod onih sa DS zabeležene su značajno više vrednosti PAB, a značajno niži nivoi TAS i aktivnosti SOD u poređenju sa pacijentima bez ove komplikacije. Vrednosti TAS kod pacijenata sa DS bile su najniže u odnosu na sve ostale analizirane grupe ispitanika.

**Tabela 48. Parametri redoks statusa u odnosu na prisustvo DS**

Parametar	KG	Pacijenti bez DS	Pacijenti sa DS	p
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4,50 (4,00–6,00)	6,70 (5,40–8,00) <sup>a****</sup>	5,10 (3,40–9,40)	< 0,001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19,2 (18,3–27,4)	49,2 (37,3–60,3) <sup>a****</sup>	45,5 (35,9–54,3) <sup>a****</sup>	< 0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	2,71 (2,26–3,08)	1,68 (1,47–1,96) <sup>a****</sup>	1,78 (1,41–1,99) <sup>a****</sup>	< 0,001
PAB, U/L	74,2 (60,3–84,1)	75,6 (62,9–96,4)	155 (106–187) <sup>a****,b****</sup>	< 0,001
IMA, AU	0,28 (0,20–0,33)	0,55 (0,47–0,61) <sup>a****</sup>	0,57 (0,50–0,63) <sup>a****</sup>	< 0,001
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290 (1217–1384)	999 (829–1133) <sup>a****</sup>	751 (540–950) <sup>a****,b*</sup>	< 0,001
SOD, U/mL	133 (124–141)	139 (132–143) <sup>a*</sup>	128 (105–135) <sup>b****</sup>	< 0,001
SH-grupe, mmol/L	0,35 (0,31–0,39)	0,26 (0,19–0,33) <sup>a****</sup>	0,22 (0,15–0,29) <sup>a****</sup>	< 0,001
PON1, U/L	365 (233–928)	251 (161–487) <sup>a**</sup>	231 (139–391) <sup>a*</sup>	< 0,01

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DS na osnovu Mann-Whitney U testa (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.14.3. Parametri inflamacije

Analizom inflamatornih markera u odnosu na prisustvo DS (Tabela 49) utvrđene su značajno veće koncentracije hsCRP, kao i vrednosti indeksa MLR, MWR, SIRI i PIV kod obe grupe pacijenata u poređenju sa KG. Nasuprot tome, vrednosti indeksa LWR bile su značajno manje kod pacijenata sa i bez DS u odnosu na KG. Specifično, značajno veće vrednosti SII zabeležene su isključivo u grupi pacijenata sa DS u poređenju sa KG. Iako je inicijalni test ukazao na varijacije u vrednostima NLR, *post hoc* analiza nije potvrdila postojanje značajnih razlika između ispitivanih grupa. Nisu utvrđene značajne razlike u vrednostima analiziranih inflamatornih indeksa poređenjem pacijenata sa i bez DS.

**Tabela 49. Parametri inflamacije u odnosu na prisustvo DS**

Parametar	KG	Pacijenti bez DS	Pacijenti sa DS	<i>p</i>
hsCRP, mg/L	0,30 (0,10–0,85)	4,60 (1,60–11,2) <sup>a****</sup>	7,50 (2,20–42,9) <sup>a****</sup>	< 0,001
NLR	1,95 (1,35–2,17)	2,17 (1,56–2,88)	2,62 (1,89–3,44)	< 0,05
PLR	107 (89,8–139)	108 (91,0–135)	145 (92,0–194)	0,142
NWR	0,60 (0,53–0,63)	0,60 (0,53–0,65)	0,60 (0,56–0,71)	0,252
MLR	0,16 (0,13–0,20)	0,23 (0,19–0,30) <sup>a****</sup>	0,26 (0,21–0,31) <sup>a****</sup>	< 0,001
MWR	0,05 (0,04–0,06)	0,07 (0,06–0,08) <sup>a****</sup>	0,06 (0,05–0,08) <sup>a**</sup>	< 0,001
LWR	0,31 (0,29–0,38)	0,28 (0,23–0,34) <sup>a*</sup>	0,25 (0,21–0,32) <sup>a**</sup>	< 0,05
SII	448 (344–609)	479 (377–747)	630 (403–1182) <sup>a*</sup>	< 0,001
SIRI	0,56 (0,43–0,88)	0,98 (0,73–1,70) <sup>a****</sup>	1,41 (0,98–2,49) <sup>a****</sup>	< 0,001
PIV	137 (102–239)	244 (158–431) <sup>a****</sup>	392 (216–763) <sup>a****</sup>	< 0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

#### 4.14.4. Parametri dislipidemije

Analizom lipidnog profila (Tabela 50) utvrđene su značajno niže koncentracije TC, LDL-h, HDL-h i non-HDL-h kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Značajno više koncentracije TG zabeležene su isključivo u grupi pacijenata bez DS u poređenju sa KG. Značajna razlika utvrđena je u aktivnosti enzima CETP, koja je bila najniža kod pacijenata sa DS. U *post hoc* analizi je potvrđeno da je aktivnost CETP u grupi pacijenata sa DS značajno niža kako u poređenju sa KG, tako i u odnosu na pacijente bez ove komplikacije, dok se aktivnost ovog enzima kod pacijenata bez DS nije značajno razlikovala od KG.

**Tabela 50. Parametri lipidnog profila u odnosu na prisustvo DS**

Parametar	KG	Pacijenti bez DS	Pacijenti sa DS	<i>p</i>
TC, mmol/L	6,12 (5,29–7,01)	4,40 (3,80–5,50) <sup>a***</sup>	4,80 (3,65–5,55) <sup>a***</sup>	< 0,001
LDL-h, mmol/L	3,83 (3,20–4,61)	2,60 (1,95–3,30) <sup>a***</sup>	2,35 (1,95–3,75) <sup>a***</sup>	< 0,001
HDL-h, mmol/L	1,60 (1,30–1,90)	0,97 (0,83–1,18) <sup>a***</sup>	1,10 (0,66–1,50) <sup>a***</sup>	< 0,001
TG, mmol/L	1,19 (0,98–1,54)	1,90 (1,20–2,70) <sup>a***</sup>	1,20 (1,00–2,15)	< 0,001
non-HDL-h, mmol/L	4,45 (3,80–5,46)	3,51 (2,92–4,23) <sup>a***</sup>	3,85 (2,40–4,35) <sup>a*</sup>	< 0,001
LCAT, μmol/L/h	69,5 (55,5–90,2)	70,3 (45,2–102)	55,9 (34,0–76,4)	0,077
CETP, μmol/L/h	202 (140–251)	175 (117–292)	109 (37,3–157) <sup>a**,b**</sup>	< 0,01

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DS na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\* *p* < 0,01).

Analiza distribucije subfrakcija LDL i HDL čestica (Tabela 51) ukazala je na specifične razlike među ispitivanim grupama. Kod obe grupe pacijenata zabeležen je značajno viši udeo LDL I, LDL II i HDL2a, kao i značajno manji udeo LDL IV i sdLDL subfrakcija u poređenju sa KG. Istovremeno, u obe grupe pacijenata zabeležen je i značajno manji HDL dijametar. Specifično, udeo HDL3b subfrakcija bio je značajno viši isključivo kod pacijenata bez DS, dok je značajno niži udeo HDL3c uočen samo u grupi sa DS u poređenju sa KG. Poređenjem samih grupa pacijenata, utvrđeno je da oni sa DS imaju značajno veći HDL dijametar i udeo HDL2b, uz značajno manji udeo HDL3a i HDL3b subfrakcija u odnosu na pacijente bez ove komplikacije.

**Tabela 51. Veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo DS**

Parametar	KG	Pacijenti bez DS	Pacijenti sa DS	<i>p</i>
LDL dijametar, nm	26,3 (25,6–26,7)	26,2 (25,5–27,1)	25,5 (25,2–25,9)	0,086
LDL I, %	21,2 (18,3–24,5)	23,2 (19,7–30,2) <sup>a*</sup>	23,8 (19,6–30,5) <sup>a*</sup>	< 0,05
LDL II, %	26,0 (23,6–29,4)	28,8 (25,4–36,0) <sup>a***</sup>	30,8 (28,0–36,2) <sup>a*</sup>	< 0,001
LDL III, %	22,3 (20,5–24,4)	21,0 (16,3–24,6)	18,2 (14,5–26,0)	< 0,05
LDL IV, %	29,2 (24,8–33,5)	23,6 (18,1–28,2) <sup>a****</sup>	20,7 (18,9–23,4) <sup>a****</sup>	< 0,001
sdLDL, %	51,8 (48,4–55,4)	44,1 (36,3–52,7) <sup>a****</sup>	37,0 (35,3–50,2) <sup>a****</sup>	< 0,001
HDL dijametar, nm	10,3 (9,4–10,9)	8,95 (8,5–9,3) <sup>a****</sup>	9,70 (8,9–10,9) <sup>a**,b**</sup>	< 0,001
HDL2b, %	46,5 (42,5–51,0)	36,9 (31,5–43,0) <sup>a****</sup>	47,5 (38,1–51,9) <sup>b****</sup>	< 0,001
HDL2a, %	20,6 (19,2–22,1)	23,8 (21,3–26,7) <sup>a****</sup>	22,8 (21,2–24,6) <sup>a*</sup>	< 0,001
HDL3a, %	14,2 (13,5–14,7)	18,5 (16,1–21,6) <sup>a****</sup>	14,8 (11,9–17,5) <sup>b****</sup>	< 0,001
HDL3b, %	8,05 (7,3–9,18)	9,77 (7,67–13,7) <sup>a**</sup>	6,95 (5,81–10,1) <sup>b**</sup>	< 0,001
HDL3c, %	9,97 (7,57–12,4)	8,85 (6,52–11,2)	7,17 (3,87–10,3) <sup>a*</sup>	< 0,05

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Kruskal-Wallisovim testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Mann-Whitney U testa (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

<sup>b</sup> Značajno različito od pacijenata bez DS na osnovu Mann-Whitney U testa (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

#### 4.14.5. Korelaciona analiza i dijagnostički značaj biomarkera kod pacijenata sa DS

U grupi pacijenata sa DS (Tabela 52) utvrđena je značajna povezanost parametara inflamacije, redoks statusa i lipidnog profila. Koncentracije hsCRP, kao i vrednosti indeksa SII i MLR, pozitivno su korelirale sa vrednostima PAB. Pored toga, utvrđena je značajna pozitivna korelacija vrednosti indeksa MWR sa koncentracijama TC i LDL-h. Kada je reč o povezanosti redoks statusa i lipidnog profila, zabeležena je značajna negativna korelacija između koncentracija AOPP i HDL-h, kao i između vrednosti TAS i veličine HDL čestica.

**Tabela 52. Značajne korelacije ispitivanih parametara kod pacijenata sa DS**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Inflamacija i redoks status	hsCRP i PAB	0,689	< 0,001
	SII i PAB	0,637	< 0,001
	MLR i PAB	0,629	< 0,001
Inflamacija i lipidni profil	MWR i TC	0,727	< 0,001
	MWR i LDL-h	0,718	< 0,001
Redoks status i lipidni profil	AOPP i HDL-h	-0,686	< 0,001
	TAS i HDL dijametar	-0,632	< 0,001

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize.*

U Tabeli 53 prikazani su rezultati ROC analize za parametre koji su nakon inicijalne analize imali AUC > 0,5. Najveću diskriminacionu sposobnost pokazale su vrednosti PAB sa izvanrednom dijagnostičkom tačnošću. Utvrđena granična vrednost za PAB od 102,46 U/L omogućava identifikaciju pacijenata sa DS uz osetljivost od 88% i specifičnost od 83%. Kriterijum klinički prihvatljive diskriminativne moći (AUC > 0,7) ispunili su i TAS, indeks PIV, koncentracija hsCRP, kao i aktivnost enzima SOD. Za TAS vrednosti < 950 µmol/L zabeležena je osetljivost od 76% i specifičnost od 77,2%, dok je granična koncentracija hsCRP od 1,9 mg/L pokazala osetljivost od 88%. Nasuprot tome, AUC za koncentracije AOPP, kao i za indekse SII, NLR i PLR ostale su ispod poželjnog praga za dijagnostičku tačnost (AUC > 0,7), uz nižu osetljivost u poređenju sa ostalim analiziranim parametrima.

**Tabela 53. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa i inflamacije**

<b>Parametar</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>	<b>Osetljivost, %</b>	<b>Specifičnost, %</b>
PAB, U/L	0,893	102	88,0	83,0
TAS, µmol/L	0,800	950	76,0	77,2
hsCRP, mg/L	0,760	1,90	88,0	53,1
SIRI	0,717	1,10	72,0	69,3
SOD, IU/L	0,715	136	84,0	52,9
PIV	0,707	385	56,0	81,3
AOPP, µmol/L	0,673	29,0	96,0	47,4
SII	0,657	856	40,0	90,3
NLR	0,628	2,61	52,0	75,4
PLR	0,623	158,3	48,0	87,3

*Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.*

#### 4.14.6. Poređenje pacijenata bez hroničnih komplikacija i pacijenata sa DS

U cilju procene nezavisnog uticaja DS na ispitivane parametre, inicijalna analiza je ponovljena poređenjem pacijenata sa DS i pacijenata bez hroničnih komplikacija (Tabela 54).

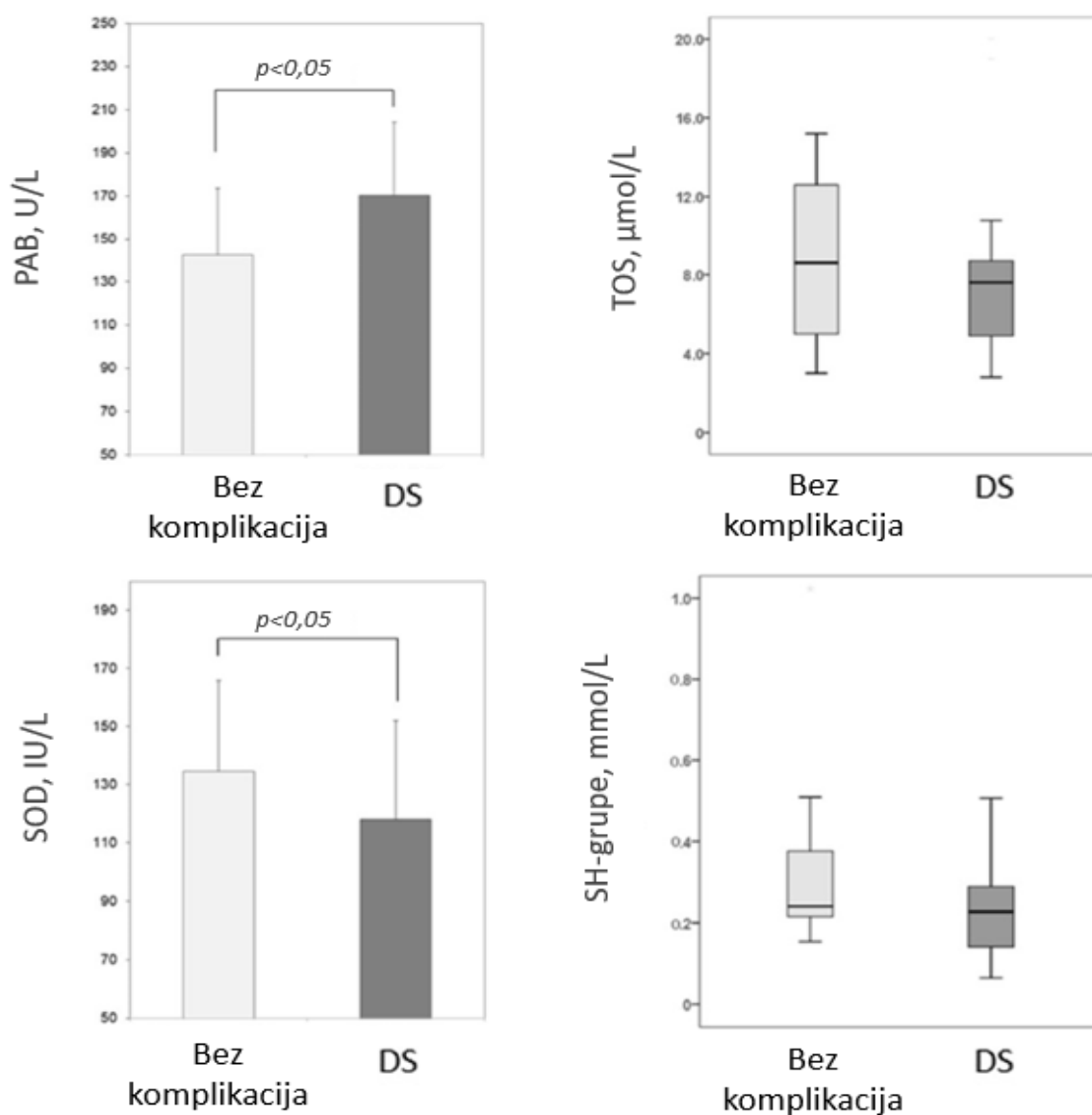
**Tabela 54. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata bez komplikacija i sa DS**

Parametar	Pacijenti bez komplikacija	Pacijenti sa DS	<i>p</i>
Starost, godine	59,2 ± 12,9	66,7 ± 9,40	< 0,05
Pol, muški/ženski, %	57,9 / 42,1	82,6 / 17,4	0,098
ITM, kg/m <sup>2</sup>	31,7 ± 5,70	28,7 ± 4,70	0,116
Trajanje dijabetesa, godine	7,1 ± 5,60	13,7 ± 7,80	< 0,05
Gojaznost, %	69,2	45,5	0,293
Hipertenzija, %	88,9	77,3	0,427
Pušenje, %	18,8	40,9	0,178
HbA <sub>1c</sub> , %	9,60 ± 1,70	7,80 ± 1,30	< 0,05
Glukoza, mmol/L	10,1 ± 3,70	9,70 ± 2,60	0,665
Eritrociti, × 10 <sup>12</sup> /L <sup>#</sup>	4,74 ± 0,61	4,04 ± 0,71	< 0,05
Hemoglobin, g/L <sup>#</sup>	137 ± 19,7	121 ± 10,8	< 0,05
Leukociti, × 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	7,80 ± 1,80	8,90 ± 2,50	0,123
Neutrofili, × 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	4,00 (3,30–5,30)	5,60 (4,20–6,60)	< 0,05
Limfociti, × 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	2,40 (2,10–2,80)	1,90 (1,60–2,30)	< 0,05
Monociti, × 10 <sup>9</sup> /L <sup>#</sup>	0,60 (0,50–0,70)	0,70 (0,50–0,80)	0,331
NLR <sup>#</sup>	1,60 (1,30–2,10)	2,80 (2,00–4,30)	< 0,05

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i kao relativne frekvencije. Kontinuirani podaci su poređeni Studentovim t-testom, a kategorički podaci Chi-kvadrat testom. <sup>#</sup>Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Analizom dobijenih rezultata, utvrđeno je da su pacijenti sa DS bili značajno stariji i da su imali znatno duže trajanje dijabetesa u poređenju sa grupom pacijenata bez komplikacija. U pogledu parametara glikemijske kontrole, uočeno je da su pacijenti sa DS imali značajno niže vrednosti HbA<sub>1c</sub>. Kada su u pitanju hematološki parametri, kod pacijenata sa DS zabeležen je značajano manji broj eritrocita i niža koncentracija hemoglobina. Pored toga, u ovoj grupi je zabeležen i značajno veći broj neutrofila, kao i više vrednosti NLR indeksa, dok je broj limfocita bio značajno niži u odnosu na pacijente bez komplikacija.

Analizom parametara redoks statusa (Slika 25) utvrđene su veće vrednosti PAB u grupi pacijenata sa DS ( $170 \pm 33,9$  U/L) u odnosu na pacijente bez komplikacija ( $143 \pm 31,2$  U/L). Pored toga, aktivnost SOD je bila značajno niža kod pacijenata sa DS u poređenju sa pacijentima bez hroničnih komplikacija ( $135 \pm 13,7$  U/L). Sa druge strane, nije bilo razlike u vrednostima TOS ( $p = 0,397$ ) i SH-grupa ( $p = 0,123$ ) između ispitivanih grupa.



**Slika 25. Redoks parametri kod pacijenata bez komplikacija i pacijenata sa DS**

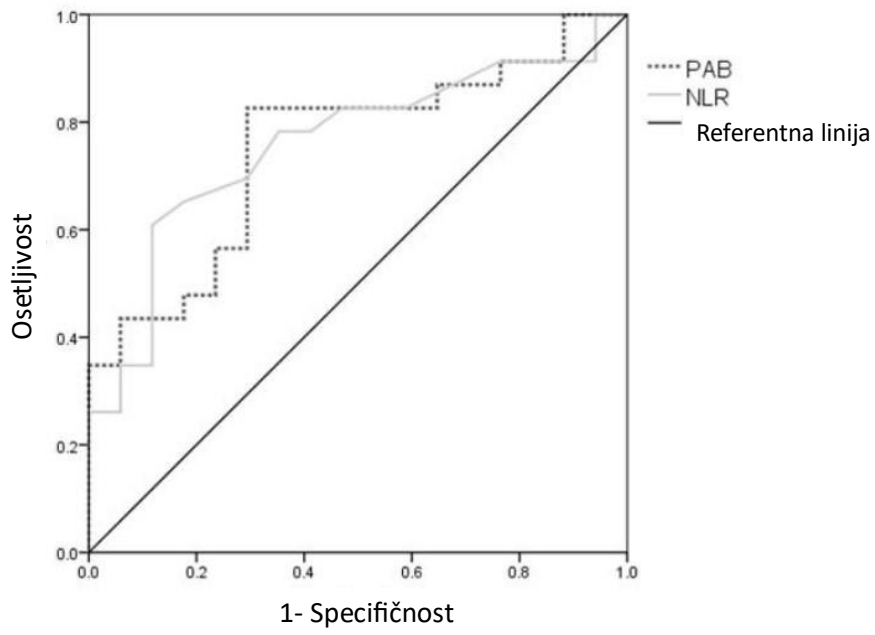
Daljom stratifikacijom pacijenata sa DS uočeno je da su vrednosti PAB bile više u podgrupi pacijenata koji su podvrgnuti amputaciji ( $N = 13$ ;  $183 \pm 26,7$  U/L) u poređenju sa onima koji su lečeni konzervativnim pristupom ( $N = 10$ ;  $155 \pm 37,2$  U/L;  $p = 0,050$ ). Pored toga, pacijenti podvrgnuti amputaciji imali su značajno niže koncentracije SH-grupa (medijana: 0,15 mmol/L; interkvartilni raspon: 0,12–0,28 mmol/L) u poređenju sa pacijentima lečenim konzervativnim pristupom (medijana: 0,29 mmol/L; interkvartilni raspon: 0,26–0,35 mmol/L). Između navedenih podgrupa nije utvrđena značajna razlika u vrednostima NLR ( $p = 0,203$ ).

Povezanost posmatranih biomarkera sa prisustvom DS ispitana je primenom binarne logističke regresione analize (Tabela 55). Povišene vrednosti PAB i NLR bile su značajno udružene sa prisustvom DS u univarijatnom modelu, a ova povezanost ostala je statistički značajna i nakon korekcije za starost, pušački status i nivo HbA<sub>1c</sub>.

**Tabela 55. Binarna logistička regresiona analiza povezanosti PAB i NLR sa DS**

	PAB		NLR	
	OR, 95% CI	<i>p</i>	OR, 95% CI	<i>p</i>
Univarijatni model	1,026 (1,005–1,048)	< 0,05	2,812 (1,206–6,568)	< 0,05
Korekcija za:				
Starost, godine	1,024 (1,003–1,046)	< 0,05	2,684 (1,106–6,513)	< 0,05
Trajanje dijabetesa, godine	1,043 (1,008–1,080)	< 0,05	2,915 (0,924–9,196)	0,068
Pušenje	1,035 (1,009–1,062)	< 0,05	2,621 (1,101–6,230)	< 0,05
HbA <sub>1c</sub> , %	1,057 (1,014–1,102)	< 0,05	4,632 (1,090–19,677)	< 0,05

Dijagnostička tačnost PAB i NLR u identifikaciji DS procenjena je ROC analizom (Slika 26). Utvrđeno je da oba parametra pokazuju prihvatljivu dijagnostičku tačnost. Za *cut-off* vrednost PAB od 149 U/L, osetljivost testa je iznosila 82,6%, a specifičnost 68,0% (AUC = 0,741; 95% CI: 0,590–0,893;  $p < 0,01$ ). Za NLR graničnu vrednost od 1,9, osetljivost je iznosila 78,3%, dok je specifičnost bila 64,7% (AUC = 0,760; 95% CI: 0,608–0,911;  $p < 0,01$ ). Pored toga, kombinovani model PAB i NLR dodatno je unapredio dijagnostičku tačnost za DS (AUC = 0,790; 95% CI: 0,651–0,930;  $p < 0,01$ ).



**Slika 26. Dijagnostička tačnost PAB i NLR u predviđanju DS**

#### 4.15. Stepen globalne metilacije DNK u zavisnosti od prisustva komplikacija

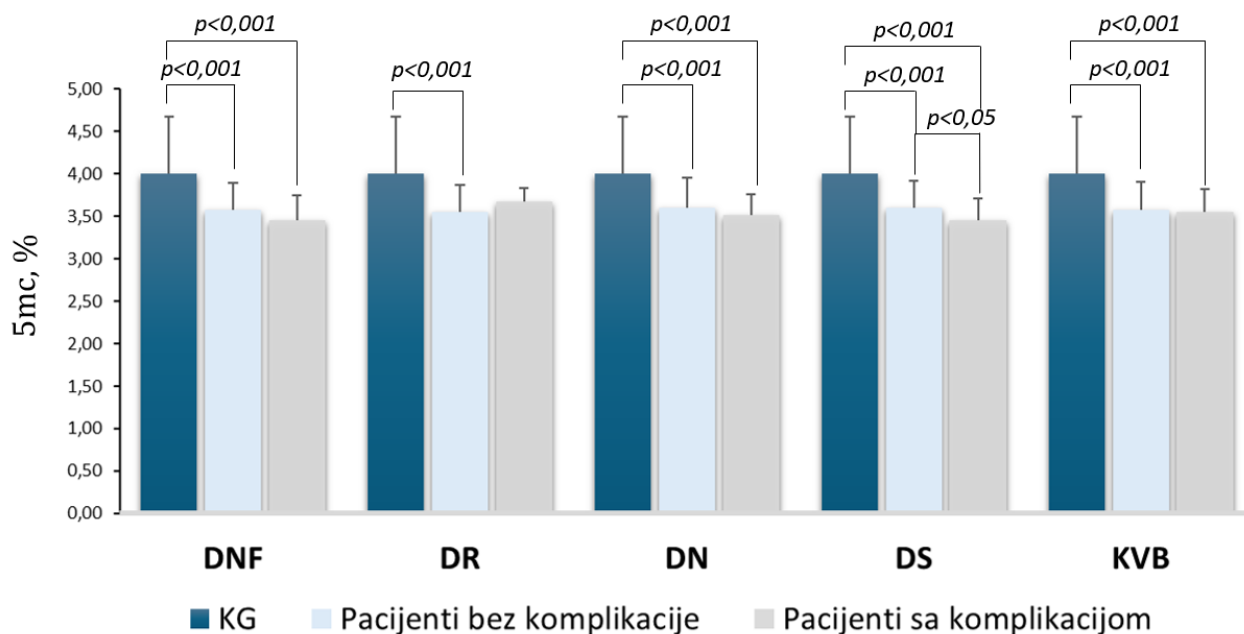
Nakon analize biomarkera redoks statusa, inflamacije i dislipidemije, koji daju uvid u metabolički status pojedinca, dalji tok analize bio je usmeren na okosnicu ovog istraživanja – procenu epigenetskog statusa ispitanika. Stoga je analiziran stepen globalne metilacije DNK u zavisnosti od prisustva specifičnih komplikacija. Rezultati su pokazali da je kod pacijenata sa T2DM prisutan trend globalne hipometilacije, nezavisno od tipa razvijene vaskularne komplikacije (Tabela 56). Zabeležen je trend nižih vrednosti kod pacijenata sa KVB, DNF i DN u poređenju sa pacijentima bez navedenih komplikacija, mada ove razlike nisu dostigle statističku značajnost. Specifičan obrazac uočen je prilikom stratifikacije prema prisustvu DR, gde je značajno niži stepen metilacije DNK u odnosu na KG potvrđen je u grupi bez ove komplikacije, dok kod pacijenata sa DR razlika u odnosu na KG nije bila značajna. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica malog broja pacijenata sa DR. Najizraženije smanjenje stepena globalne metilacije DNK zabeleženo je u grupi sa DS (Slike 27 i 28). Iako se ova razlika ne uočava primenom Tukey *post hoc* testa, verovatno usled uticaja vrednosti iz KG na ukupnu varijansu, direktnim poređenjem isključivo pacijenata sa i bez DS primenom t-testa utvrđena je značajna razlika ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 56. Stepen globalne metilacije DNK u odnosu na vaskularne komplikacije**

Komplikacija	KG	Pacijenti bez komplikacije	Pacijenti sa komplikacijom	<i>p</i>
KVB	4,00 ± 0,68	3,57 ± 0,34 <sup>a***</sup>	3,55 ± 0,27 <sup>a***</sup>	< 0,001
DNF	4,00 ± 0,68	3,58 ± 0,31 <sup>a***</sup>	3,45 ± 0,30 <sup>a***</sup>	< 0,001
DR	4,00 ± 0,68	3,55 ± 0,32 <sup>a***</sup>	3,67 ± 0,16	< 0,001
DN	4,00 ± 0,68	3,60 ± 0,36 <sup>a***</sup>	3,52 ± 0,24 <sup>a***</sup>	< 0,001
DS	4,00 ± 0,68	3,60 ± 0,32 <sup>a***</sup>	3,45 ± 0,26 <sup>a***</sup>	< 0,001

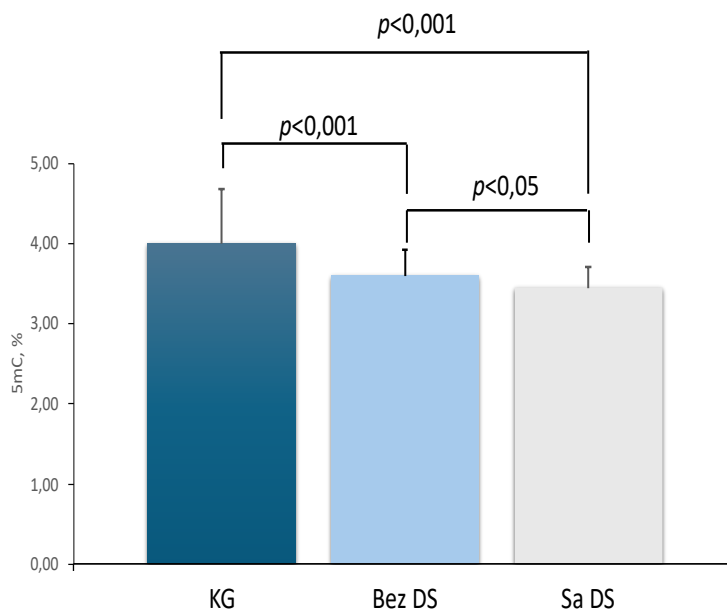
Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom.

<sup>a</sup> Značajno različito od KG na osnovu Tukey *post hoc* testa (<sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ ).



**Slika 27. Stepen globalne metilacije u zavisnosti od prisustva vaskularnih komplikacija**

\*\*\* Značajno različito od KG:  $p < 0,001$  na osnovu Tukey post hoc testa.



**Slika 28. Stepen globalne metilacije DNK u zavisnosti od prisustva DS**

Značajne razlike na osnovu Studentovog t-testa

U cilju daljeg sagledavanja kliničkog značaja uočenih epigenetskih promena u odnosu na prisutne komplikacije, naredni korak u istraživanju obuhvatio je ispitivanje korelacije stepena globalne metilacije DNK sa analiziranim biomarkerima.

Analiza korelacija epigenetskog statusa i ispitivanih parametara kod pacijenata sa KVB prikazana je u Tabeli 57. Utvrđena je značajna negativna korelacija između stepena globalne metilacije DNK i vrednosti PAB. Pored toga, zabeležene su značajne pozitivne korelacije stepena globalne metilacije sa vrednostima parametara redoks statusa, TOS i SH-grupe. Takođe, utvrđena je značajna pozitivna korelacija stepena metilacije DNK sa parametrima metaboličke kontrole i lipidnog statusa, odnosno sa udelom HbA<sub>1c</sub> i koncentracijom TG.

**Tabela 57. Značajne korelacije stepena globalne metilacije DNK sa ispitivanim biomarkerima kod pacijenata sa KVB**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Epigenetski status i redoks status	5mC i PAB	-0,471	< 0,001
	5mC i TOS	0,375	< 0,01
	5mC i SH-grupe	0,291	< 0,05
Epigenetski status i metabolička kontrola	5mC i HbA <sub>1c</sub>	0,365	< 0,05
Epigenetski status i lipidni profil	5mC i TG	0,309	< 0,05

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize; 5mC – stepen globalne metilacije DNK*

Korelaciona analiza globalne metilacije DNK kod pacijenata sa mikrovaskularnim komplikacijama je ukazala da njena povezanost sa biomarkerima redoks statusa, inflamacije i dislipidemije varira u zavisnosti od tipa komplikacije. U grupi pacijenata sa DNF, utvrđena je značajna negativna korelacija između stepena metilacije DNK i vrednosti PAB ( $\rho = -0,487$ ;  $p < 0,05$ ). Kod pacijenata sa DR nije zabeležena značajna korelacija između stepena metilacije DNK i ispitivanih parametara redoks statusa i inflamacije ( $p > 0,05$ ).

U grupi pacijenata sa DN otkriven je veći broj značajnih korelacija sa ispitivanim biomarkerima (Tabela 58). U ovoj grupi udeo 5mC je negativno korelirao sa vrednostima većeg broja inflamatornih indeksa: SII, PLR, NWR, PIV i NLR. Osim toga, kod pacijenata sa DN utvrđena je i značajna negativna korelacija između globalne metilacije DNK i vrednosti PAB, kao i pozitivne korelacije sa vrednostima TOS, veličinom LDL čestica i koncentracijom TG.

**Tabela 58. Značajne korelacije stepena globalne metilacije DNK sa ispitivanim biomarkerima kod pacijenata sa DN**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Epigenetski status i inflamacija	5mC i SII	-0,386	< 0,01
	5mC i PLR	-0,353	< 0,05
	5mC i NWR	-0,343	< 0,05
	5mC i PIV	-0,325	< 0,05
	5mC i NLR	-0,284	< 0,05
Epigenetski status i redoks status	5mC i PAB	-0,337	< 0,05
	5mC i TOS	0,286	< 0,05
Epigenetski status i lipidni profil	5mC i LDL dijametar	0,388	< 0,01
	5mC i TG	0,322	< 0,05

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize; 5mC – stepen globalne metilacije DNK.*

Kod pacijenata sa DS otkriven je najveći broj značajnih korelacija između statusa globalne metilacije DNK i biomarkera redoks statusa, inflamacije i dislipidemije (Tabela 59). Značajna negativna korelacija utvrđena je između stepena globalne metilacije DNK i vrednosti PAB, inflamatornih indeksa PLR, SII, NLR, NWR, MLR i PIV, te koncentracije hsCRP. Dodatno, u ovoj grupi pacijenata stepen globalne metilacije DNK je negativno korelirao sa koncentracijom MDA, a pozitivno sa koncentracijom TG.

**Tabela 59. Značajne korelacije stepena globalne metilacije DNK sa ispitivanim biomarkerima kod pacijenata sa DS**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Epigenetski status i redoks status	5mC i PAB	-0,588	< 0,01
	5mC i MDA	-0,399	< 0,05
Epigenetski status i inflamacija	5mC i PLR	-0,579	< 0,01
	5mC i SII	-0,568	< 0,01
	5mC i NLR	-0,485	< 0,05
	5mC i NWR	-0,481	< 0,05
	5mC i MLR	-0,460	< 0,05
	5mC i PIV	-0,436	< 0,05
	5mC i hsCRP	-0,419	< 0,05
Epigenetski status i lipidni profil	5mC i TG	0,435	< 0,05

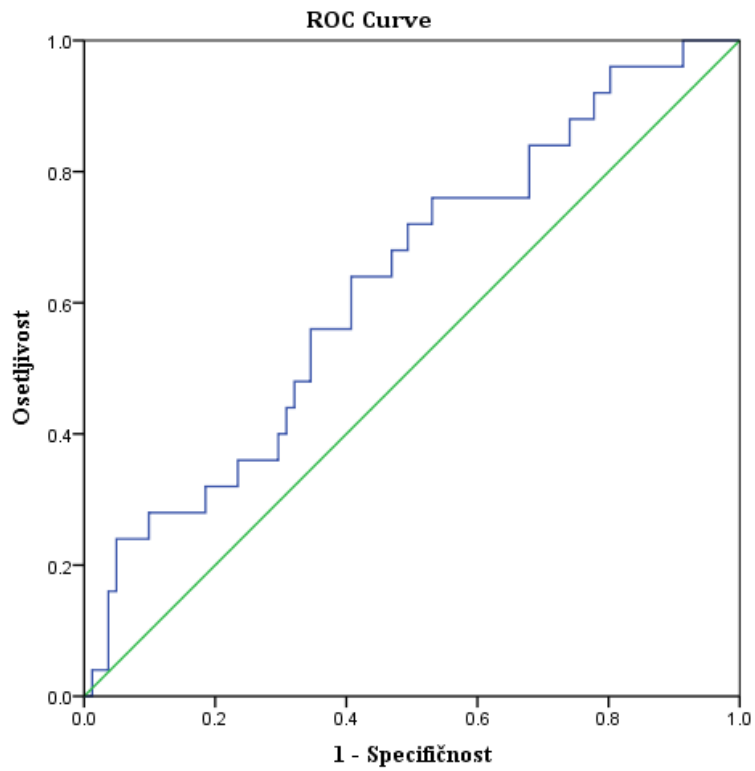
*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize; 5mC – stepen globalne metilacije DNK.*

Naposletku, izvršena je analiza dijagnostičke tačnosti globalne metilacije DNK u detekciji komplikacija T2DM (Tabela 60; Slika 29–31). Najveća vrednost AUC zabeležena je u identifikaciji pacijenata sa DS (AUC = 0,630; 95% CI: 0,506–0,753;  $p = 0,05$ ), uz optimalnu graničnu vrednost 5mC od 3,51%. Iako je slična vrednost AUC utvrđena i za DNF (AUC = 0,625; 95% CI: 0,461–0,790) ovaj rezultat nije dostigao statističku značajnost ( $p = 0,103$ ), pri čemu je granična vrednost od 3,40% pokazala specifičnost od 80,9% i osetljivost od 58,8%. U slučaju DN, vrednost AUC iznosila je 0,553 (95% CI: 0,443–0,663;  $p = 0,351$ ), pri čemu je stepen globalne metilacije DNK ostvario osetljivost od 88,2% pri graničnoj vrednosti od 3,76%, ali uz nisku specifičnost od 29,1%. Odgovarajuće ROC krive su prikazane na slikama 27–29. Nasuprot tome, vrednosti AUC za KVB (AUC = 0,511; 95% CI: 0,399–0,622;  $p = 0,847$ ) i DR (AUC = 0,351; 95% CI: 0,205–0,496;  $p = 0,162$ ) su bile niske, što ukazuje na ograničenu dijagnostičku vrednost globalne metilacije DNK za identifikaciju navedenih komplikacija.

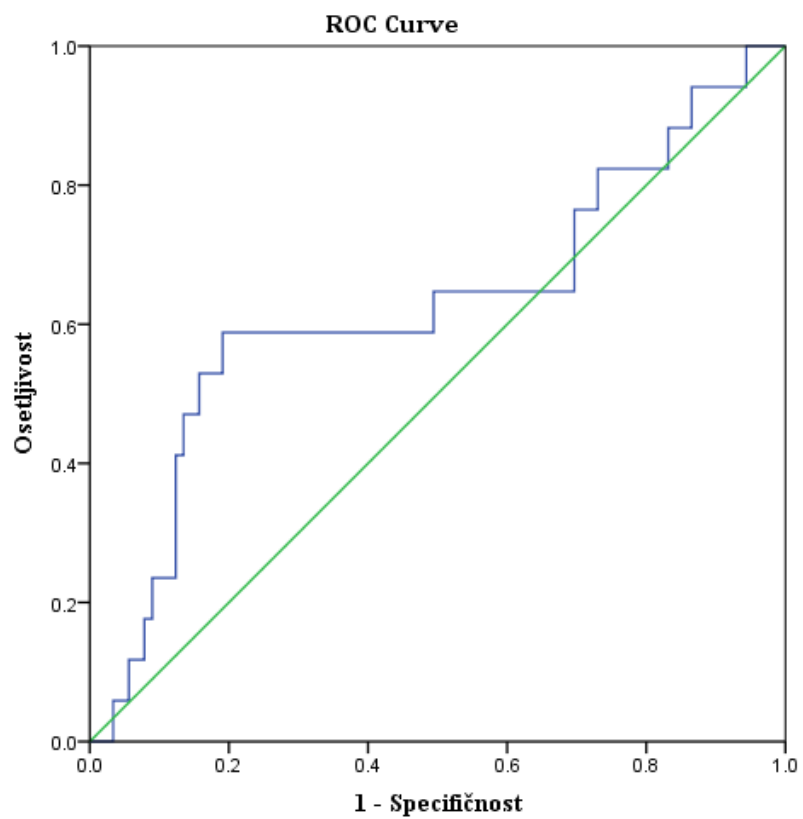
**Tabela 60. Dijagnostička tačnost stepena globalne metilacije DNK u predikciji mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa T2DM**

Komplikacija	AUC	Cut-off	Osetljivost, %	Specifičnost, %
DS	0,630	3,51	64,0	59,3
DNF	0,625	3,40	58,8	80,9
DN	0,553	3,76	88,2	29,1
DR	0,351	3,92	100	7,10
KVB	0,511	3,59	60,4	50,9

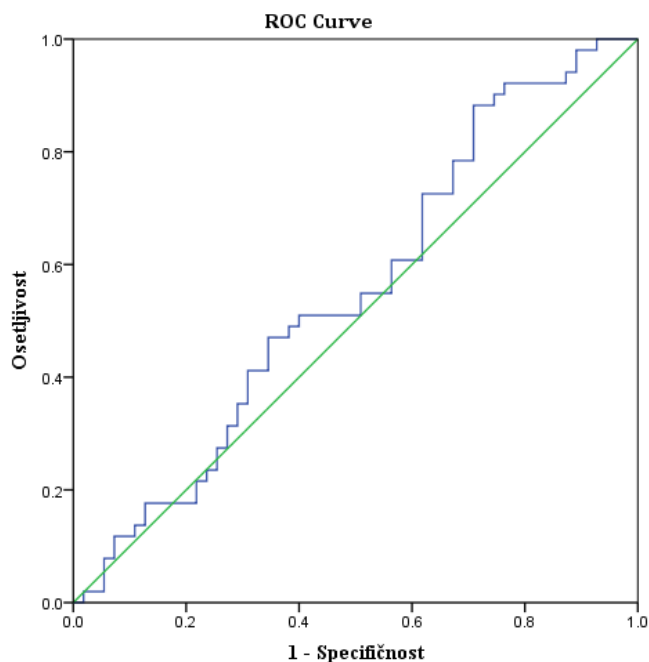
Prikazani su rezultati ROC analize. Odgovarajuće cut-off vrednosti izabrane su primenom Youdenovog indeksa.



**Slika 29. ROC kriva dijagnostičke tačnosti stepena globalne metilacije u predviđanju DS**



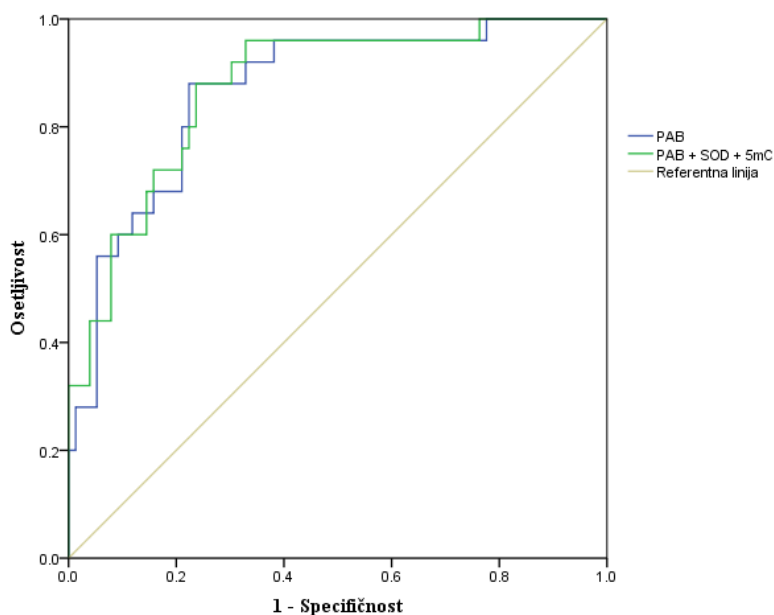
**Slika 30. ROC kriva dijagnostičke tačnosti stepena globalne metilacije u predviđanju DNF**



**Slika 31. Dijagnostička tačnost stepena globalne metilacije u predviđanju DN**

U cilju definisanja modela sa najvećom dijagnostičkom tačnošću za razlikovanje pacijenata sa DS od onih bez komplikacija, kreiran je panel biomarkera koji kombinuje pokazatelje oksidativnog stresa, antioskidativne zaštite i epigenetskih promena (Slika 32). Ovaj panel biomarkera je obuhvatio vrednosti PAB, aktivnost SOD i udeo 5mC.

Rezultati su pokazali da multimarkerski panel ima odličnu diskriminativnu sposobnost, sa vrednošću AUC od 0,868 (95% CI: 0,790–0,946;  $p < 0,001$ ; Slika 32). U odnosu na PAB, čija vrednost AUC iznosi 0,861 (95% CI: 0,780–0,941;  $p < 0,001$ ), dodatak ostalih biomarkera u model doprineo je unapređenju njegove dijagnostičke efikasnosti.



**Slika 32. Dijagnostička tačnost PAB i multimarkerskog modela (PAB + SOD + 5mC) u predikciji prisustva DS**

Kako bi se sagledala povezanost epigenetskih promena sa opštim metaboličkim stanjem, ispitane su korelacije između stepena globalne metilacije DNK i biomarkera inflamacije i redoks statusa u ukupnoj studijskoj populaciji (Tabela 61). Zabeležena je značajna negativna korelacija nivoa 5mC sa proinflamatornim parametrima hsCRP i MLR indeksom, kao i sa biomarkerima oksidativnog stresa PAB, IMA i AOPP. Nasuprot tome, uočena je značajna pozitivna korelacija između udela 5mC i vrednosti TAS i SH-grupa. Ovakav obrazac jasno ukazuje na to da su pojačana sistemska inflamacija i narušena redoks ravnoteža udruženi sa smanjenjem stepena globalne metilacije DNK.

**Tabela 61. Značajne korelacije stepena globalne metilacije DNK sa ispitivanim biomarkerima u ispitivanoj populaciji**

Patofiziološka osovina	Korelacioni par	$\rho$	$p$
Epigenetski status i redoks status	5mC i PAB	-0,343	< 0,001
	5mC i IMA	-0,412	< 0,001
	5mC i TAS	-0,214	< 0,001
	5mC i AOPP	-0,214	< 0,01
	5mC i SH-grupe	0,386	< 0,001
Epigenetski status i inflamacija	5mC i hsCRP	-0,388	< 0,001
	5mC i MLR	-0,174	< 0,05

*Prikazani su rezultati Spearmanove korelacione analize; 5mC – stepen globalne metilacije DNK.*

Da bi se identifikovali potencijalno nezavisni prediktori stepena globalne metilacije DNK, sprovedena je multipla linearna regresiona analiza uz primenu postupne (engl. *stepwise*) selekcije varijabli. Ova analiza je primenjena na celokupan uzorak ispitanika, a uključila je sledeće varijable: starost, pol, koncentracije glukoze i hsCRP, vrednosti MLR, PAB, IMA, AOPP, TAS i SH-grupa. Dobijeni rezultati su pokazali da je starost negativno povezana sa stepenom globalne metilacije DNK ( $\beta = -0,254$ ;  $p < 0,01$ ), dok su antioksidativni biomarkeri TAS ( $\beta = 0,342$ ;  $p < 0,001$ ) i SH-grupe ( $\beta = 0,204$ ;  $p < 0,05$ ) pokazali pozitivnu vezu sa ovim parametrom.

#### 4.16. Uticaj kardiometaboličkih faktora rizika na stepen globalne metilacije DNK

U cilju redukcije broja posmatranih parametara i identifikacije ključnih patofizioloških procesa koji utiču na globalnu metilaciju DNK kod pacijenata sa T2DM, sprovedena je PCA analiza. Kaiser-Meyer-Olkinov (KMO) indeks iznosio je 0,562, ukazujući da je uzorak prihvatljiv, a Bartletov test sferičnosti potvrdio je adekvatnu primenu ove analize ( $p = 0,001$ ). Ekstrahovani faktori, prikazani u Tabeli 62, zajedno su objasnili 58% ukupne varijanse posmatranih parametara.

**Tabela 62. Struktura glavnih komponenti u PCA analizi kod pacijenata sa T2DM**

<b>Faktori</b>	<b>Uključene varijable</b>	<b>Opterećenja varijabli</b>	<b>Variabilnost faktora, % (ukupna varijansa: 58%)</b>
Proinflamatorni faktor	hsCRP, mg/L	0,774	18
	SOD, U/L	-0,689	
	NLR	0,621	
	PAB, U/L	0,607	
	IMA, AU	0,576	
Prooksidativni faktor	TOS, $\mu\text{mol/L}$	0,708	12,5
	AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,643	
	ITM, $\text{kg/m}^2$	0,599	
Faktor starenja	Starost, godine	0,757	10,5
	Trajanje dijabetesa, godine	0,723	
Hiperglikemijski faktor	AGE, U/mL	0,687	9
	Glukoza, mmol/L	-0,544	
	Pol	0,525	
Antioksidativni faktor	SH-grupe, mmol/L	0,715	8

*Prikazani su rezultati PCA analize.*

Prvi faktor, označen kao „proinflamatorni faktor“, objasnio je 18% varijanse, a karakterisala su ga pozitivna opterećenja za hsCRP, NLR, PAB i IMA uz negativno opterećenje za SOD. Drugi faktor, označen kao „prooksidativni faktor“, je objasnio 12,5% varijanse i obuhvatio vrednosti TOS, AOPP i ITM. Treći faktor je definisan kao „faktor starenja“ (10,5% varijanse), a uključivao je starost pacijenata i trajanje dijabetesa. Četvrti faktor je označen kao „hiperglikemijski faktor“ (9% varijanse), jer je obuhvatio vrednosti AGE, pol i koncentraciju glukoze, a peti faktor kao „antioksidativni faktor“ (8% varijanse), jer je uključivao SH-grupe.

U Tabeli 63 su prikazani rezultati binarne logističke regresione analize, sprovedene radi procene nezavisne povezanosti faktora ekstrahovanih u PCA analizi sa pojavom globalne hipometilacije DNK u T2DM. U tom smislu, globalna hipometilacija DNK je definisana kao udeo 5mC manji od 3,40%, što odgovara vrednostima nižim od 25. percentila raspodele 5mC kod pacijenata sa T2DM. Ova analiza izdvojila je „prooksidativni faktor“ kao jedini nezavisan prediktor globalne hipometilacije DNK (OR = 2,294; 95%CI:1,097–4,798; p = 0,027). Ostali faktori nisu pokazali nezavisnu povezanost sa globalnom hipometilacijom DNK u ispitivanoj grupi pacijenata sa T2DM.

***Tabela 63. Prediktori globalne hipometilacije DNK kod pacijenata sa T2DM***

<b>Prediktori</b>	<b>B (SE)</b>	<b>Wald koeficijent</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
Proinflamatorni faktor	-0,777 (0,476)	3,074	0,460 (0,193-1,096)	0,080
Prooksidativni faktor	0,830 (0,377)	4,863	2,294 (1,097-4,798)	< 0,05
Faktor starenja	-0,120 (0,346)	0,120	0,887 (0,450-1,749)	0,730
Hiperglikemijski faktor	0,278 (0,410)	0,460	1,321 (0,591-2,949)	0,498
Antioksidativni faktor	0,173 (0,406)	0,181	1,188 (0,537-2,631)	0,671

*Prikazani su rezultati binarne logističke regresione analize.*

## 5. DISKUSIJA

Globalna pandemija T2DM je jedan od najozbiljnijih javno-zdravstvenih izazova savremenog doba. Prema podacima IDF-a, procenjuje se da preko 537 miliona odraslih širom sveta živi sa ovim poremećajem, uz projekciju porasta na 783 miliona do 2045. godine (2). U Republici Srbiji prevalencija T2DM je izuzetno visoka i obuhvata približno 12% odrasle populacije, pri čemu značajan udeo obolelih ostaje nedijagnostikovano sve do manifestacije vaskularnih komplikacija (19). Uprkos nesumnjivom napretku u farmakoterapiji poslednjih decenija, T2DM i dalje ostaje vodeći uzrok netraumatskih amputacija donjih ekstremiteta, dijalize usled terminalnog stadijuma hronične bubrežne bolesti i gubitka vida kod radno sposobnog stanovništva (54). Deo problema leži u ograničenjima tradicionalnih biomarkera koji se koriste u dijagnostici i praćenju toka bolesti. Parametri poput glukoze i HbA<sub>1c</sub>, iako nezaobilazni u kliničkoj praksi, ne odražavaju potpuno intenzitet intracelularnog oksidativnog stresa niti rane molekularne promene koje se odvijaju na nivou krvnih sudova, zbog čega njihova prediktivna vrednost za predviđanje razvoja komplikacija nije uvek zadovoljavajuća (11). U tom kontekstu, globalna metilacija DNK se izdvaja kao biomarker koji može prevazići ove nedostatke, jer objedinjuje genetsku predispoziciju i uticaje faktora sredine u jedinstven epigenetski otisak, čime odražava rane promene na molekularnom nivou. Istraživanje koje su sprovedeli El-Osta i saradnici pokazalo je da su promene u stepenu metilacije DNK u korelaciji sa ekspresijom proinflamatornih gena, što 5mC čini potencijalnim biomarkerom za praćenje toka bolesti i ranu stratifikaciju rizika od vaskularnih komplikacija (251).

Precizna kvantifikacija stepena globalne metilacije DNK predstavlja značajan analitički izazov. Niska zastupljenost 5mC u odnosu na nemetilovane DNK baze, u kombinaciji sa kompleksnošću matriksa realnih uzoraka postavlja ozbiljne analitičke zahteve pred istraživača (252). Iako su metode poput ELISA testova često korišćene zbog brzine i ekonomičnosti, njihova primena ima ograničenja u vidu unakrsne reaktivnosti antitela i varijabilnosti u komercijalnim setovima, što se ogleda u nekonzistentnim rezultatima u literaturi (252). Lisanti i saradnici ukazali su da ELISA testovi sistematski precenjuju stepen globalne metilacije DNK usled neselektivnog vezivanja antitela (225), što dodatno opravdava odluku da se u ovoj disertaciji primeni HPLC metoda, koja je u naučnoj zajednici prepoznata kao zlatni standard za određivanje ovog epigenetskog biomarkera (252). Adaptacija UHPLC-DAD metode, zasnovane na protokolu Crescentija i saradnika (246) omogućila je skraćivanje analitičkog ciklusa uz minimalnu potrošnju uzorka, što je od posebnog praktičnog značaja pri radu sa humanim PBMC uzorcima. Iz originalnog protokola preuzeti su tip kolone i standardi nukleozida, dok su analitički uslovi, uključujući sastav i gradijent mobilne faze, protok i temperaturu kolone, razvijeni i optimizovani u okviru ove disertacije. Izbor PBMC kao biološkog materijala zasnovan je na relativno jednostavnom i minimalno invazivnom postupku uzorkovanja, kao i na dosadašnjim istraživanjima koja pokazuju dobru korelaciju rezultata u PBMC sa promenama koje se dešavaju na nivou tkiva (221).

Primena enzimskog kompleksa DNA Degradase Plus pokazala se kao analitički povoljnija alternativa tradicionalnoj kiseloj hidrolizi. Naime, klasična hidroliza hlorovodoničnom ili mravljom kiselinom nosi rizik od deaminacije citozina i degradacije labilnih modifikovanih baza, dok enzimski pristup omogućava razlaganje polimernih lanaca DNK na nukleozide uz očuvanje hemijskog integriteta 5mC (253). U procesu optimizacije metode utvrđeno je da inkubacija u trajanju od 2 sata na 37 °C, uz koncentraciju enzima od 5 U/μg obezbeđuje potpunu digestiju 6 μg genomske DNK. Iako pojedini autori preporučuju dvostruko veću koncentraciju enzima (254), produžetak vremena inkubacije na 2 sata u ovom protokolu rezultovao je potpunom eliminacijom rezidualnih polinukleotidnih fragmenata, što

je verifikovano odsustvom razmaza na agaroznom gelu i stabilnom baznom linijom na hromatogramima realnih uzoraka (Slika 17).

Poseban analitički doprinos ovog rada ogleda se u tačnom definisanju minimalne polazne količine DNK neophodne za detekciju putem DAD detektora. Za razliku od konvencionalnog UV detektora, DAD generiše potpune spektralne profile u realnom vremenu, čime značajno povećava specifičnost detekcije i kvantifikacije 5mC (255). Iako se u literaturi navodi širok opseg preporučenih količina uzorka, u ovom istraživanju je utvrđeno da je za postizanje adekvatnog odnosa S/N neophodno najmanje 6 µg genomske DNK. Na taj način obezbeđeno je da koncentracija 5mC u finalnom hidrolizatu bude pouzdano iznad utvrđene granice kvantifikacije (LOQ = 0,007 ng/µL), čime se minimizuju sistemske greške u integraciji pikova. Parametri validacije potvrđuju analitičku pouzdanost metode. Koeficijenti determinacije  $R^2 > 0,999$  za obe kalibracione krive, sa vrednostima CV za preciznost unutar i između dana manjim od 5%, ukazuju na izuzetnu stabilnost metode i ponovljivost merenja. Selektivnost metode potvrđena je jasnim hromatografskim razdvajanjem 5mC od ostalih nukleozida (dC, dG, dT, dA), ali i od 5hmC. Kisila i saradnici ukazali su da neadekvatno razdvajanje ova dva analita može dovesti do značajnog precenjivanja stepena metilacije, s obzirom na to da 5hmC predstavlja stabilan intermedijer u procesu demetilacije sa sopstvenom biološkom ulogom (256). Navedeno našu metodu čini dodatno pouzdanom u poređenju sa metodama u literaturi koje ne prave ovu distinkciju. Međutim, usled nedovoljne analitičke osetljivosti primenjene metode za pouzdanu kvantifikaciju 5hmC u biološkim uzorcima, u literaturi se preporučuje upotreba HPLC metode sa masenom detekcijom (257).

Ispitivanje stepena globalne metilacije DNK u ovoj disertaciji je dizajnirano i koncipirano kao studija preseka, a obuhvatilo je 107 pacijenata sa T2DM, koji na reprezentativan način odražavaju karakteristike ovih pacijenata u našoj populaciji, što se ogleda u predominaciji osoba starije životne dobi, povišenog ITM i prisustvom komorbiditeta (Tabela 1). Prosečna starost od približno 60 godina uz prosečno trajanje bolesti duže od 10 godina karakteristična je za period u kome je akumulacija vaskularnih oštećenja već uznapredovala.

Metabolička kontrola ove grupe pacijenata bila je neadekvatna, sa prosečnim vrednostima HbA<sub>1c</sub> znatno iznad terapijskog cilja od 7%. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima UKPDS studije, koja je dokumentovala progresivan porast rizika za razvoj komplikacija sa svakim povećanjem udela HbA<sub>1c</sub> za 1% (258). Činjenica da većina pacijenata uprkos primenjenoj farmakoterapiji (Slika 18) nije postigla optimalnu metaboličku kontrolu, ukazuje na perzistentan metabolički disbalans, sa potencijalnim uticajem na epigenetski status. Pored hiperglikemije, gojaznost deluje kao snažan, nezavisan pokretač hronične inflamacije niskog stepena koji u sinergiji sa neadekvatnom glikoregulacijom doprinosi iscrpljivanju metilacionog kapaciteta DNK (197). Naši podaci dodatno pokazuju da pacijenti sa prisutnim vaskularnim komplikacijama često imaju nepovoljniji lipidni profil, koji se karakteriše povišenim koncentracijama TG, uz istovremeno snižen HDL-h, što predstavlja klasičnu karakteristiku dijabetesne dislipidemije, koja je prepoznata kao centralni događaj u patogenezi endotelne disfunkcije (259). Opisani skup karakteristika (neadekvatna metabolička kontrola, visoka prevalencija gojaznosti, višegodišnje trajanje bolesti i aterogena dislipidemija), čini ovu kohortu pogodnom za sveobuhvatnu evaluaciju epigenetskog statusa i faktora koji ga determinišu. Utvrđena razlika u starosti i polnoj distribuciji između pacijenata i KG (Tabela 1) predstavlja čest izazov u studijama ovakvog dizajna. Kako je proces starenja inherentno povezan sa progresivnim epigenetskim promenama, pre svega sa globalnom hipometilacijom DNK (260), demografska neusklađenost u starosnoj strukturi između grupa korigovana je u statističkim modelima.

Analiza naše kohorte pokazala je narušenu renalnu funkciju kod pacijenata sa T2DM (Tabela 2). Značajno više koncentracije kreatinina, uree i mokraćne kiseline u T2DM grupi, uz istovremeno sniženu eGFR, ukazuju na prisustvo DNF u različitim stadijumima njenog

napredovanja. Posebno je indikativan trend ka nižim koncentracijama albumina u serumu ( $p = 0,058$ ), koji može odražavati početnu mikroalbuminuriju. Vredan pažnje je i podatak da je većina naših pacijenata koristila renoprotektivnu terapiju u vidu ACEI i ARB, čije je dejstvo između ostalog usmereno na odlaganje nastanka i progresije mikroalbuminurije (261). Studije su potvrdile postojanje veze između renalne disfunkcije i epigenetskih promena, budući da je pokazano da hroničnu bubrežnu bolest karakteriše sistemski smanjena bioraspodivnost SAM-a, glavnog donora metil grupa u procesu metilacije DNK (262). Pored pokazatelja renalne disfunkcije, analiza hematoloških parametara potvrdila je prisustvo hronične sistemske inflamacije, s obzirom na to da su pacijenti sa T2DM imali značajno veći broj leukocita, neutrofila i monocita, dok se ostali hematološki parametri nisu značajno razlikovali.

Analiza primenjenih terapijskih režima u našoj kohorti jasno reflektuje preporuke aktuelnih kliničkih vodiča, gde oralni antidijabetici – a primarno metformin – čine okosnicu terapije (Slika 18). Značajan udeo pacijenata na insulinskoj terapiji, samostalno ili u kombinaciji sa oralnim antidijabeticima, govori u prilog uznapredovalosti bolesti, sa iscrpljenim rezervama  $\beta$ -ćelija pankreasa. Očekivano, ACEI bili su najzastupljenija kardiovaskularna terapija (62,3%), dok je oko petina pacijenata primenjivala statine.

Izrazito visoka prevalencija hroničnih vaskularnih komplikacija (72,9%), sa dominacijom mikrovaskularnih oblika (56,1%), odražava kumulativni efekat dugogodišnje suboptimalne metaboličke kontrole (Slika 19 i Slika 20). U ispitivanoj grupi pacijenata, najučestalija pojedinačna komplikacija bila je DN (47,7%). Dodatni pokazatelj sistemske težine bolesti jeste istovremeno prisustvo mikrovaskularnih i makrovaskularnih lezija, registrovano kod više od četvrtine ispitanika (27,9%). Populaciju pacijenata odlikovala je i visoka učestalost DS (23,4%), kao uznapredovalog stadijuma progresije T2DM, nastalog udruženim delovanjem periferne neuropatije, narušene mikrocirkulacije i tkivne ishemije (55).

Iako su pacijenti sa T2DM imali značajno više koncentracije glukoze našte i viši udeo HbA<sub>1c</sub> u poređenju sa KG (Tabela 3), vrednosti serumskih AGE produkata se nisu značajno razlikovale između grupa. Štaviše, nasuprot očekivanjima, u grupi pacijenata uočen je trend ka nižim vrednostima AGE. Ovaj nalaz odstupa od rezultata koji su publikovali Kilhovda i saradnici (263), a njegovo tumačenje zahteva razmatranje nekoliko patofizioloških i analitičkih činilaca. Pre svega, spektrofluorimetrijska metoda, koja je primenjena u ovom istraživanju, detektuje predominantno fluorescentne AGE produkte, poput pentozidina i kroslina, dok kvantitativno najzastupljeniji AGE produkti u serumu ne poseduju svojstvo fluorescencije, što ograničava procenu ukupnog glikacijskog opterećenja (264). Pored analitičkih ograničenja, vrednosti serumskih AGE produkata odražavaju dinamičku ravnotežu između njihovog endogenog nastanka, tkivne distribucije i brzine klirensa. U odmaklim stadijumima T2DM, cirkulišući AGE produkti u značajnoj meri prelaze iz krvotoka u tkiva, gde se ireverzibilno vezuju za dugoživeće proteine ekstracelularnog matriksa, pre svega za kolagen u zidu krvnih sudova (79). Progresivno deponovanje u tkivima doprinosi njihovom uklanjanju iz seruma, zbog čega vrednosti perifernih AGE produkata ne prate uvek stepen sistemskeg tkivnog oštećenja (265). Dodatni činilac koji verovatno doprinosi ovom nalazu jeste efekat primenjene terapije u ispitivanoj grupi pacijenata. Naime, metformin, kao dominantni lek iz grupe oralnih antidijabetika koji su pacijenti primenjivali u terapiji, može da veže i neutrališe reaktivna dikarbonilna jedinjenja, pre svega metilglioksal, koji predstavlja ključni prekursor u biosintezi fluorescirajućih AGE produkata (266). Sličan antiglikacioni efekat se navodi u literaturi i za ACE inhibitore, koji su takođe bili zastupljeni u terapiji naših ispitanika (267). Sinergističko delovanje ovih lekova moglo je doprineti održavanju nižih serumskih koncentracija AGE produkata, uprkos povišenom udelu HbA<sub>1c</sub>. Stoga, izostanak povišenih vrednosti cirkulišućih fluorescirajućih AGE produkata u našoj kohorti ne isključuje prisustvo glikacijskih oštećenja u ciljnim tkivima, već je verovatnije posledica analitičkih ograničenja metode, tkivne redistribucije i terapijskog uticaja.

Analiza standardnog lipidnog profila naših pacijenata pokazala je prisustvo klasičnog fenotipa dijabetesne dislipidemije, koji karakterišu značajno više koncentracije TG uz snižene koncentracije HDL-h u odnosu na KG (Tabela 4). Istovremeno zabeležene niže koncentracije TC, LDL-h i non-HDL-h ukazuju na tzv. lipidni paradoks, što ukazuje da konvencionalni parametri lipidnog statusa nisu dovoljni za sveobuhvatnu procenu aterogenog rizika u T2DM (268). Jedan od ključnih uzroka ovog fenomena jeste primena statina, koji mogu značajno sniziti serumske koncentracije holesterola. Međutim, terapijski cilj za LDL-h u T2DM je znatno niži od preporučenih koncentracija LDL-h kod zdravih osoba, a naši rezultati pokazuju da je postignut tek kod 10,3% pacijenata. Takođe, treba pomenuti i činjenicu da su efekti statina na kvalitativne karakteristike lipoproteinskih čestica znatno ograničeniji (269), što dodatno naglašava potrebu za ispitivanjem strukturnih i funkcionalnih promena lipoproteinskih čestica, koje standardna evaluacija lipidnog profila ne obuhvata.

U literaturi se navodi da disbalans u aktivnostima LCAT i CETP, ključnih enzima u metabolizmu lipoproteinskih čestica, često predstavlja osnovu kvalitativnih promena lipidnog profila (270). Međutim, u našoj grupi pacijenata sa T2DM nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti LCAT i CETP u poređenju sa KG (Tabela 4). Iako je poznato da u uslovima hipertrigliceridemije pojačana aktivnost CETP katalizuje ubrzanu razmenu holesterol-estara iz HDL i LDL čestica u zamenu za TG (271), dok snižena aktivnost LCAT remeti proces esterifikacije slobodnog holesterola, čime se inhibira normalno sazrevanje HDL čestica i umanjuje efikasnost reverznog transporta holesterola (272), naši rezultati ukazuju na odsustvo ovakvih alteracija, što sugerise da detektovana dijabetesna dislipidemija nije primarno posledica izmenjene aktivnosti ovih enzima.

Detaljna analiza LDL subfrakcija naših pacijenata (Tabela 5) pokazala je profil koji odstupa od uobičajenog modela dominacije sd LDL čestica u dijabetesu. Utvrđena je značajno niža procentualna zastupljenost ovih visoko aterogenih čestica (LDL III i IV), praćena porastom udela većih LDL subfrakcija (LDL I i II). Ovaj nalaz se može objasniti povećanom propustljivošću endotela kod pacijenata sa T2DM, što može olakšati prelazak manjih čestica u subendotelni prostor, te dovesti do posledičnog smanjenja sdLDL u cirkulaciji (273). Sa druge strane, ovakva povoljnija distribucija LDL subfrakcija, u kombinaciji sa nižim apsolutnim koncentracijama ukupnog i LDL-h, može biti odraz i primenjene farmakoterapije, pretežno metformina i insulina. Istraživanja su pokazala da terapija metforminom utiče na povećanje veličine LDL čestica, najverovatnije putem pojačane aktivacije lipoproteinske lipaze, što posledično ubrzava katabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima (274). Pored toga, utvrđeno je da se nivo sdLDL čestica kod pacijentkinja sa sindromom policističnih jajnika smanjuje nakon primene metformina (275). Takođe, ranije je pokazano da insulinska terapija dovodi do povećanja LDL dijametra, uz istovremeno smanjenje udela sdLDL čestica (276).

Evaluacija HDL subfrakcija (Tabela 6) dodatno je potvrdila poremećaje u strukturi i funkciji HDL čestica. Zabeleženo je smanjenje relativnog udela velikih, zrelih HDL2 čestica, dominantno HDL2b subfrakcija, uz istovremeni porast udela manjih, gušćih HDL3 čestica (HDL3a i 3b) i posledično smanjenje prosečnog HDL dijametra. Iako male HDL čestice u fiziološkim uslovima ispoljavaju snažna ateroprotektivna svojstva, u uslovima hiperglikemije, kao i u proinflamatornom i prooksidativnom okruženju karakterističnom za T2DM, one postaju izrazito podložne neenzimskoj glikaciji i lipidnoj peroksidaciji. Navedene strukturne modifikacije rezultuju gubitkom ateroprotektivnog kapaciteta i sledstvenom disfunkcijom HDL čestica (277,278). Dominacija disfunkcionalnih, malih HDL čestica značajno kompromituje sposobnost organizma da neutrališe sistemski oksidativni stres, što pogoduje akumulaciji ROS u cirkulaciji.

Analiza parametara redoks statusa potvrdila je prisustvo hroničnog oksidativnog stresa kod pacijenata sa T2DM (Tabela 7). Ovakav profil predstavlja direktnu posledicu dugotrajne hiperglikemije koja, putem prethodno opisanih alternativnih metaboličkih puteva glukoze,

indukuje prekomernu produkciju ROS. Narušavanje redoks ravnoteže u korist prooksidanasa ogleđa se u povišenim vrednostima sistemskih parametara oksidativnog stresa – PAB, TOS, kao i specifičnih biomarkera oksidativnog oštećenja proteina – AOPP i IMA. Zbog produženog biološkog poluživota, AOPP se u literaturi često navodi kao pouzdaniji pokazatelj oksidativnog oštećenja u odnosu na kratkoživeće lipidne perokside (279). U tom kontekstu može se tumačiti i naizgled paradoksalan nalaz nižih koncentracija MDA u T2DM grupi. Kao izuzetno reaktivan aldehid, u uslovima izraženog i perzistentnog oksidativnog stresa, MDA ubrzano stupa u reakciju sa proteinima i nukleinskim kiselinama, formirajući stabilne kovalentne adukte. Usled navedenog brzog vezivanja u tkivima, detektovana slobodna frakcija MDA u serumu može biti snižena, posebno u odmaklim stadijumima bolesti (280). Pored toga, relativno povoljniji lipidni profil pacijenata, praćen manjom zastupljenošću sdLDL čestica, ukazuje na ograničenu dostupnost supstrata za formiranje MDA (281).

Narušen antioksidativni kapacitet potvrđen je nižim vrednostima TAS, kao i smanjenim koncentracijama ukupnih SH-grupa, koje imaju ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih kiseoničnih radikala u sistemskoj cirkulaciji (282). U kontekstu aterogene dislipidemije, poseban klinički značaj ima nalaz smanjene aktivnosti PON1 u T2DM grupi (Tabela 7). Aktivnost PON1 striktno je uslovljena strukturnim i funkcionalnim integritetom HDL čestica. U tom smislu, smanjena aktivnost PON1 odgovara prethodno opisanim kvalitativnim promenama u distribuciji HDL čestica i potvrđuje njihove disfunkcije. Analizom aktivnosti SOD nije uočena značajna razlika između posmatranih grupa, mada je zabeležen trend blago viših vrednosti kod pacijenata. Ovakvi rezultati su u skladu sa nalazima Bandeira i saradnika (283). Slično tome, Herder i saradnici su pokazali da je aktivnost ekstracelularne SOD (ecSOD) povećana u serumu pacijenata sa dijabetesnom polineuropatijom (284). Navedena tendencija porasta aktivnosti SOD kod pacijenata sa T2DM najverovatnije predstavlja kompenzatorni odgovor na hiperprodukciju superoksidnog anjona. Naime, SOD deluje kao prva linija antioksidativne zaštite, katalizujući dismutaciju superoksidnog anjona u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid. U humanom organizmu prisutne su tri osnovne izoforme ovog enzima: citosolna bakar-cink zavisna (Cu/Zn-SOD ili SOD1), mitohondrijalna mangan-zavisna (Mn-SOD ili SOD2) i ekstracelularna (ecSOD ili SOD3). Dok SOD1 i SOD2 primarno učestvuju u intracelularnoj neutralizaciji superoksidnog anjona, ecSOD se sekretuje u ekstracelularni prostor i predstavlja dominantnu izoformu u plazmi, gde štiti vaskularni endotel od štetnog delovanja ROS (285). Ukupna aktivnost SOD detektovana u sistemskoj cirkulaciji stoga pretežno odražava funkciju ekstracelularne izoforme, uz doprinos intracelularnih varijanti oslobođenih tokom normalnog metabolizma ili usled tkivnog oštećenja (286).

Analiza inflamatornih markera u našoj studiji potvrdila je prisustvo izraženog sistemskog proinflamatornog stanja kod pacijenata sa T2DM (Tabela 8). Koncentracija hsCRP, kao i vrednosti inflamatornih indeksa NLR, MLR, MWR, SII, SIRI i PIV bile su značajno više u grupi pacijenata u poređenju sa KG, ukazujući na aktivaciju urođenog imunskog odgovora i hroničnu inflamaciju niskog stepena. Relativna limfopenija u sklopu ovog proinflamatornog okruženja dodatno je potvrđena značajno nižim vrednostima LWR kod naših pacijenata. Nasuprot tome, indeksi PLR i NWR nisu se značajno razlikovali između posmatranih grupa, iako je u T2DM grupi zabeležen trend viših vrednosti PLR. Kompozitni indeksi, kao noviji biomarkeri inflamacije, sve više dobijaju na značaju kao praktični alati za procenu sistemske inflamacije i kardiometaboličkog rizika. Njihova glavna prednost ogleđa se u jednostavnosti izračunavanja na osnovu rutinskog nalaza kompletne krvne slike, što omogućava ekonomično praćenje inflamatornog statusa kod osoba sa metaboličkim i kardiovaskularnim poremećajima. Savremena istraživanja intenzivno ispituju dijagnostički i prognostički značaj ovih indeksa kod pacijenata sa T2DM, MASLD i KVB, što potvrđuje aktuelnost i relevantnost naše studije (287–289).

Okosnicu našeg istraživanja činilo je ispitivanje stepena globalne metilacije DNK, kao biomarkera ključne epigenetske modifikacije, odgovorne za održavanje stabilnosti i funkcije genoma (290). Centralni nalaz ovog istraživanja jeste globalna hipometilacija DNK kod pacijenata sa T2DM (Tabela 9). Iako je poznato da 5mC čini oko 1% genoma, referentne vrednosti udela 5mC u humanoj populaciji još uvek nisu standardizovane. Kod zdravih osoba u našoj KG udeo 5mC kretao se u rasponu od 3,47% do 6,63%. Pojedini autori, poput Yamaguchi i saradnika, utvrdili su da je udeo 5mC kod zdravih osoba oko 6% (291), dok Storebjerg i saradnici navode da većina literaturnih podataka ukazuje na prosečnu vrednost kod zdravih osoba približno 5% (292). Udeo 5mC kod naših pacijenata bio je niži u poređenju sa KG, nezavisno od starosti i pola. Ovakvi rezultati su u skladu sa istraživanjem Yuana i saradnika, koji su dokumentovali značajno niži udeo 5mC kod pacijenata sa T2DM u poređenju sa zdravim kontrolama (293). Luttmmer i saradnici su potvrdili hipometilaciju DNK kod osoba sa visokim koncentracijama glukoze našte (294), a Thongsroy i saradnici su utvrdili da je stepen globalne metilacije DNK u negativnoj korelaciji sa udelom HbA<sub>1c</sub> (295). Ipak, literaturni podaci u ovoj oblasti nisu konzistentni. Pinzón-Cortés i saradnici nisu detektovali razliku u udelu 5mC između pacijenata sa T2DM i zdravih osoba (296), što se delimično može objasniti karakteristikama njihove kohorte, koju su činili mlađi pacijenti sa boljom metaboličkom kontrolom u odnosu na naše ispitanike. Iako su sistematskim pregledom literature Muka i saradnici potvrdili nekonzistentnost dostupnih literaturnih podataka (297), naši rezultati su u potpunosti u skladu sa hipotezom da hronična hiperglikemija indukuje progresivan gubitak metil-grupa u genomu. Navedene diskrepance u literaturi mogu biti posledica primene različitih analitičkih metoda poput ELISA, Alu (engl. *Arthrobacter luteus*, Alu) i LUMA umesto hromatografskog pristupa, kao i korišćenja različitog biološkog materijala. Primena HPLC metode, koja se i dalje smatra zlatnim standardom u ovoj oblasti, dodatno ojačava analitičku pouzdanost dobijenih rezultata.

Uočena globalna hipometilacija (Slika 23) odražava destabilizaciju epigenoma u T2DM, koja se objašnjava reaktivacijom transpozabilnih elemenata i genomskom nestabilnošću, što posledično omogućava ekspresiju proinflamatornih gena koji su u fiziološkim uslovima utišani metilacijom (298). Detaljnom analizom potvrđeno je da je udeo 5mC ostao uniformno niži unutar T2DM grupe bez obzira na pol, ITM, prisustvo gojaznosti i hipertenzije, pušački status, suboptimalnu metaboličku kontrolu, kardiovaskularne faktore rizika i primenjene terapijske modalitete, dok je uočena značajna razlika u odnosu na trajanje T2DM (Tabele 10–12). Opisana doslednost epigenetskog profila ukazuje na to globalna hipometilacija predstavlja visoko konzerviranu karakteristiku T2DM koja ne podleže varijacijama pod uticajem kliničkih faktora i komorbiditeta. Ovakvi nalazi se mogu posmatrati u kontekstu epigenetske memorije, fenomena koji objašnjava da jednom uspostavljeni aberantni epigenetski obrasci mogu perzistirati i nakon postizanja adekvatne glikemijske kontrole (251). Ipak, imajući u vidu dizajn naše studije, za procenu stepena stabilnosti i potencijalne reverzibilnosti globalnog gubitka metil-grupa pod uticajem promene stila života i terapijskih intervencija neophodna su longitudinalna istraživanja.

Naredni korak u analizi obuhvatio je ispitivanje korelacija kliničkih i biohemijskih parametara sa udelom 5mC. Odsustvo značajne povezanosti između stepena globalne metilacije i osnovnih kliničkih parametara (starost, ITM, obim struka, krvni pritisak) u obe ispitivane grupe (Tabela 13) ukazuje na to da globalna metilacija DNK u našoj kohorti predstavlja relativno nezavisan entitet. Ovakve nalaze, međutim, neophodno je sagledati uz jasna metodološka ograničenja. Dobro je poznato da proces starenja predstavlja jednu od najvažnijih determinanti epigenetskog statusa, što je dokumentovano u brojnim studijama koje opisuju fenomen epigenetskog starenja (290). Odsustvo ove korelacije u našoj studiji može biti posledica specifične demografske strukture kohorte, relativno uskog raspona godina starosti ispitanika ili činjenice da izražen patofiziološki uticaj T2DM maskira blaže efekte fiziološkog

starenja na epigenom. U prilog ovakvom tumačenju govore i rezultati Pinzón-Cortésa i saradnika, koji takođe nisu utvrdili korelaciju između udela 5mC i starosti pacijenata (296).

Prilikom analize povezanosti stepena globalne metilacije DNK sa markerima metaboličke kontrole utvrđena je pozitivna korelacija između udela 5mC i HbA<sub>1c</sub> u KG, dok je kod pacijenata sa T2DM ova korelacija izostala (Tabela 14). Slično našim rezultatima, korelacija između ovih parametara nije potvrđena ni u istraživanju Zampieria i saradnika (299), niti u studiji Yuana i saradnika, koji su, za razliku od naših nalaza, dokumentovali pozitivnu korelaciju između koncentracije glukoze i udela 5mC (293). Imajući u vidu da je broj studija koje se bave ovom temom i dalje ograničen, razjašnjenje ove veze zahteva dalja istraživanja. Jedno od mogućih objašnjenja izostanka korelacije kod naših pacijenata sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom jeste da epigenetske alteracije u većoj meri odražavaju metaboličko pamćenje nego aktuelnu metaboličku kontrolu, što su u svojim istraživanjima sugerisali i drugi autori (300).

Naši rezultati izdvojili su oksidativni stres i sistemsku inflamaciju kao ključne faktore udružene sa epigenetskim statusom u T2DM. U grupi pacijenata utvrđena je pozitivna korelacija udela 5mC sa vrednostima AOPP, TOS i TAS, a negativna sa vrednostima PAB (Tabela 15), što sugeriše da narušena ravnoteža između prooksidanasa i antioksidanasa utiče na epigenetski profil. Ovakvi nalazi su u skladu sa rezultatima istraživanja koji pokazuju da prekomerna produkcija ROS može da inhibira aktivnost DNMT enzima putem direktne oksidativne modifikacije, kao i da dovede do oštećenja hromatinske strukture, što posledično onemogućava pravilno pozicioniranje i funkcionisanje DNK metilacionog sistema (301). Pored toga, u stanju oksidativnog stresa iscrpljuju se rezerve SAM, primarnog donora metil-grupa, čime se indirektno inhibira sam proces metilacije (262). Nasuprot supresivnom efektu na DNMT, ROS mogu delovati stimulatивно na aktivnost TET enzima. U uslovima oksidativnog stresa povećana je dostupnost molekularnog kiseonika, neophodnog kosupstrata za reakcije koje katalizuju TET enzimi, što podstiče njihovu aktivnost i posledičnu produkciju 5hmC. Dodatno, 5hmC može nastati i u direktnoj oksidaciji stabilnog 5mC pod dejstvom ROS, što suštinski predstavlja korak u procesu aktivne demetilacije genoma (302).

Posebno treba istaći da je kod pacijenata sa T2DM uočena negativna korelacija udela 5mC sa koncentracijom hsCRP i vrednostima PLR, što ukazuje da je niži stepen globalne metilacije udružen sa izraženijim proinflamatornim stanjem (Tabela 16). Kako metilacija DNK u fiziološkim uslovima ima ulogu u epigenetskom utišavanju gena, globalna hipometilacija može olakšati aberantnu ekspresiju proinflamatornih citokina koji potom, putem NF-κB signalne kaskade, dodatno inhibiraju aktivnost DNMT enzima (303). Imajući u vidu da proinflamatorno okruženje istovremeno doprinosi daljoj hiperprodukciji ROS, uspostavljaju se pozitivne povratne sprege koje oblikuju začarani krug, u kom oksidativni stres i inflamacija međusobno pojačavaju svoje efekte. Sličnu inverznu povezanost između stepena globalne metilacije i inflamatornih markera opisali su i Cucoreanu i saradnici (304), naglašavajući postojanje patološke povratne sprege između epigenetske disregulacije i hronične inflamacije niskog stepena.

Analiza korelacija 5mC sa biomarkerima lipidnog statusa kod ispitanika u KG pokazala je da je viši udeo 5mC povezan sa većim udelom ateroprotektivnih HDL2b čestica (Tabela 18) i nižom aktivnošću CETP (Tabela 17), što odražava regulisan metabolizam lipida u fiziološkim uslovima. Nasuprot tome, kod pacijenata sa T2DM ove korelacije nisu bile prisutne. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno opisanim kvalitativnim i kvantitativnim poremećajima lipoproteina kod pacijenata sa T2DM. Treba naglasiti da je u grupi pacijenata sa T2DM udeo 5mC korelirao sa koncentracijom TG, što se slaže sa rezultatima prethodnih studija (305). Pored toga, postoje dokazi da je stepen metilacije DNK povezan sa lipidnim sastavom i koncentracijom lipoproteinskih čestica (306), ali to prevazilazi okvire ovog istraživanja i naglašava potrebu za dodatnim studijama koje bi rasvetlile ulogu metilacije DNK u razvoju dijabetesne dislipidemije. Dobro je potvrđeno da dijabetesna dislipidemija predstavlja jedan od

glavnih mehanizama koji leže u osnovi razvoja KVB. Pacijenti sa T2DM imaju 2 do 4 puta veći rizik za razvoj KVB, koje se smatraju dominantnim uzrokom mortaliteta u toj populaciji (307). Iako novije studije pokazuju trend smanjenja incidencije KVB kod osoba sa T2DM tokom poslednje decenije, istraživanje koje su sprovedi Oo i saradnici (308) pokazuje da rizik ostaje posebno izražen kod pacijenata sa trajanjem bolesti dužim od 10 godina i pridruženom hipertenzijom, što u potpunosti odgovara profilu faktora rizika i učestalosti KVB u grupi naših ispitanika sa T2DM (Slika 19).

Iako je poznato da neadekvatna metabolička kontrola primarno utiče na rizik od mikrovaskularnih komplikacija, podaci prospektivnih studija, poput istraživanja Sarwara i saradnika, potvrđuju da su koncentracije glukoze naše  $> 7$  mmol/L povezane sa povećanim rizikom od koronarne bolesti srca (309). Dobro je potvrđeno i da udeo HbA<sub>1c</sub> iznad 5,7%, kojim se definiše predijabetes, predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak KVB (310). Prema savremenim preporukama, ciljna terapijska vrednost HbA<sub>1c</sub> za pacijente sa T2DM je niža od 7%, mada je ova granica često fleksibilnija kod starijih pacijenata sa dugogodišnjim dijabetesom i uznapredovalim komplikacija (311). U našoj studiji, pacijenti sa KVB imali su značajno više koncentracije glukoze i udela HbA<sub>1c</sub> u odnosu na KG, dok razlike u poređenju sa pacijentima bez KVB nisu bile značajne (Tabela 19). Ovakav nalaz ukazuje na to da u uslovima dugotrajnog i loše regulisanog T2DM tradicionalni markeri nisu dovoljno osetljivi da razlikuju pacijente sa i bez makrovaskularnih komplikacija. Izostanak značajne razlike u vrednostima AGE između pacijenata sa i bez KVB dodatno oslikava kompleksnost ovih procesa i može biti posledica prelaska AGE produkata iz cirkulacije u tkiva.

U lipoproteinskom profilu naših pacijenata sa KVB dominirao je viši udeo LDL I, uz istovremeno niži udeo LDL III, LDL IV i sdLDL čestica u poređenju sa KG (Tabela 23). Ovaj naizgled paradoksalan nalaz smanjenog udela sdLDL čestica kod pacijenata sa KVB odražava efekat primenjene farmakoterapije. Pacijenti sa KVB zahtevaju intenzivnu terapiju statinima, koji smanjuju sintezu holesterola inhibicijom 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*, HMG-CoA), povećavaju ekspresiju LDL receptora i stimulišu klirens LDL čestica, zbog čega, pored smanjenja koncentracije LDL-h, dolazi i do redukcije udela sdLDL čestica (312). Analiza HDL subfrakcija potvrđuje nalaze prethodnih istraživanja koji ukazuju na disfunkcionalnost HDL čestica kod pacijenata sa KVB (278). Iako se viša koncentracija HDL-h tradicionalno smatra kardioprotektivnim efektom, velike prospektivne studije nisu potvrdile uzročno-posledičnu vezu između povišenog HDL-h i nižeg kardiovaskularnog rizika. Takođe, rezultati randomizovanih kliničkih studija, koje su ispitivale primenu CETP inhibitora i niacina sa ciljem povećanja koncentracije HDL-h, nisu potvrdili očekivane kardioprotektivne efekte (312). U ovom istraživanju je uočena akumulacija malih HDL3b čestica kod pacijenata sa KVB, koja ukazuje na poremećaj procesa reverznog transporta holesterola, što je potvrđeno i u ranijim studijama (313). Reverzni transport holesterola podrazumeva preuzimanje holesterola iz perifernih tkiva i makrofaga posredstvom interakcije apoA-I i ABCA1 transportera na ćelijama, njegovu sledstvenu esterifikaciju delovanjem LCAT enzima, što omogućava sazrevanje manjih u veće HDL čestice, koje zatim direktno ili indirektno, preko VLDL čestica i njihovih remanata, transportuju holesterol estere do jetre (138). U uslovima hipertrigliceridemije (Tabela 22) dolazi do obogaćivanja HDL čestica trigliceridima, čime one postaju podložne delovanju hepatične lipaze. Kao posledica, velike HDL čestice se ubrzano katabolišu i konvertuju u manje subfrakcije, što prati progresivni gubitak njihovog antiaterogenog potencijala. U skladu sa odsustvom razlika u odnosu na KG, aktivnosti LCAT i CETP nisu pokazale značajne razlike ni između pacijenata sa i bez KVB (Tabela 22). Ovakav nalaz sugerise da u uznapredovalom stadijumu T2DM aktivnost ovih enzima ne predstavlja ključni faktor za nastanak vaskularnih komplikacija. Umesto toga, progresija ka manifestnoj KVB kod ovih pacijenata prevashodno zavisi od interakcije već prisutne dislipidemije sa

drugim, dominantnijim patofiziološkim mehanizmima, dok specifične promene u aktivnosti LCAT i CETP nisu od primarnog značaja.

Analiza parametara redoks statusa i inflamatornih biomarkera jasno pozicionira oksidativni stres i inflamaciju kao važne procese koji doprinose vaskularnom oštećenju u T2DM. Iako je redoks disbalans prisutan kod svih pacijenata sa dijabetesom, značajno viša vrednost TOS isključivo kod pacijenata sa KVB (Tabela 20) izdvaja ovaj parametar kao potencijalni biomarker, što je u saglasnosti sa istraživanjem Klisić i saradnika, koji su potvrdili značaj integracije TOS u statističke modele za predviđanje kardiovaskularnog rizika (314). Istovremeno, vrednosti NLR i SII bile su značajno više, a vrednosti LWR i MWR značajno niže u grupi sa KVB u poređenju sa ispitanicima u KG (Tabela 21). U prethodnim studijama, NLR je istaknut kao značajan prediktor KVB kod pacijenata sa T2DM, a He i saradnici su utvrdili da su više vrednosti ovog indeksa povezane sa lošijim kliničkim ishodom (315). U istraživanju koje su sprovedi Hu i saradnici više vrednosti SII indeksa u T2DM bile su povezane sa skoro dvostruko većim rizikom od smrtnog ishoda usled KVB (316). Niže vrednosti LWR prethodno su dovedene u vezu sa lošijim ishodom inflamatornih bolesti, što dodatno naglašava nepovoljan inflamatorni profil naših pacijenata sa KVB (317).

Korelaciona analiza potvrdila je da međusobna povezanost ispitivanih patofizioloških procesa doprinosi razvoju KVB u T2DM (Tabela 24). Uočena korelacija između povišenih koncentracija glukoze i MDA govori u prilog hipotezi da hiperglikemija potencira proces lipidne peroksidacije, dok pozitivna korelacija inflamatornih indeksa SII i PIV sa PAB vrednostima potvrđuje interaktivnu ulogu oksidativnog stresa i inflamacije u razvoju KVB. U tom smislu, aktivan doprinos aterogene dislipidemije može se sagledati kroz pozitivnu korelaciju između koncentracije TG i TOS vrednosti, kao i kroz uočenu povezanost PLR indeksa sa aktivnošću LCAT i relativnim udelom LDL III subfrakcija (307). Klinički potencijal analiziranih parametara potvrđen je ROC analizom, koja je izdvojila hsCRP, AOPP i TOS kao parametre sa najvećom diskriminativnom sposobnošću (Tabela 25), ukazujući na njihovu potencijalnu primenu u stratifikaciji kardiovaskularnog rizika, što je u saglasnosti sa navodima iz novije literature (318,319).

Pored kardiovaskularnih komplikacija, T2DM nosi i visok rizik od mikrovaskularnih oštećenja, među kojima DNF zauzima posebno mesto zbog svojih dalekosežnih kliničkih posledica. Razvoj DNF predstavlja vodeći uzrok terminalnog stadijuma bubrežne bolesti kod pacijenata sa T2DM, koja se dijagnostikuje na osnovu ispunjavanja jednog ili više kriterijuma: eGFR < 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, mikroalbuminurija (30–300 mg/24h) ili albumin/kreatinin odnos ≥ 3 mg/mmol (320). Iako se parametri metaboličke kontrole kod naših pacijenata sa DNF nisu značajno razlikovali u odnosu na pacijente bez ove komplikacije, uočeno povećanje vrednosti AGE produkata u grupi sa DNF (Tabela 26) u saglasnosti je sa novijim istraživanjima koja ističu centralnu ulogu ovih jedinjenja u mikrovaskularnom oštećenju bubrega (321,322). Akumulacija AGE produkata i njihovo vezivanje za RAGE receptore u bubrežnom tkivu rezultuju zadebljanjem i oštećenjem glomerularne bazalne membrane, mezengijalnom hipertrofijom i gubitkom podocita (323). Interakcija AGE-RAGE pokreće inflamatorne kaskade, uključujući JAK-STAT signalni put, što dovodi do produkcije faktora rasta poput TGF-β i PDGF-β, koji dalje amplifikuju inflamatorne procese putem NF-κB signalizacije, uzrokujući hiperprodukciju ROS i pojačanu ekspresiju RAGE u bubrežnom tkivu (324). Visok stepen ekspresije RAGE na podocitima i mezengijalnim ćelijama čini ih posebno osetljivim na štetne efekte glikacije (325).

U skladu sa navedenim mehanizmima, kod naših pacijenata sa DNF utvrđene su visoke vrednosti PAB i TOS, kao i biomarkera oksidativnih oštećenja AOPP i IMA, uz izrazito snižene vrednosti TAS i koncentracije SH-grupa (Tabela 27). Koncentracija hsCRP nije se razlikovala između pacijenata sa i bez DNF, što ukazuje na potrebu za specifičnijim markerima inflamacije u ovom kontekstu. Detaljna analiza hematoloških i kompozitnih inflamatornih indeksa (Tabela

28) pokazala je više vrednosti MLR i MWR uz niže vrednosti LWR kod pacijenata sa DNF, kao obrazac koji odražava ćelijsko remodelovanje u vidu monocitose i limfocitopenije, karakteristično za uznapredovale stadijume mikrovaskularnih komplikacija u kojima inflamatorni odgovor postaje predominantno lokalizovan i ćelijski posredovan (324). Detaljnija analiza subfrakcija lipoproteina (Tabela 29) ukazala je na pomeranje distribucije HDL subfrakcija ka manjim česticama kod pacijenata sa DNF, što je u skladu sa nalazima karakterističnim za hronične bubrežne bolesti (326,327). S obzirom na to da nisu utvrđene značajne razlike u parametrima lipidnog profila između pacijenata sa i bez DNF (Tabela 29 i Tabela 30), može se pretpostaviti da progresija ka DNF zavisi od interakcije dislipidemije sa drugim patofiziološkim mehanizmima. U skladu sa prethodnim, kod pacijenata sa DNF utvrđena je pozitivna korelacija TOS i koncentracije TG, odnosno koncentracije MDA sa koncentracijom LDL-h i veličinom LDL čestica, što ukazuje na visok potencijal za lipidnu peroksidaciju (Tabela 31). Takođe, pozitivna korelacija aktivnosti PON1 sa koncentracijom HDL-h, kao i koncentracije SH-grupa sa dijametrom HDL čestica, potvrđuje da prethodno opisane promene u distribuciji HDL čestica utiču na njihov antioksidativni kapacitet. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja Miljković i saradnika, koji su pokazali da je kod pacijenata sa hroničnim bubrežnim bolestima smanjena aktivnost PON1 praćena oslabljenom antioksidativnom funkcijom HDL čestica i povećanom podložnošću lipoproteina oksidativnim modifikacijama (328). Klinički potencijal analiziranih parametara u kontekstu bubrežnog oštećenja potvrđen je ROC analizom (Tabela 32), koja je izdvojila AOPP kao marker sa izuzetnom diskriminativnom sposobnošću u identifikaciji pacijenata sa DNF. Ovaj marker je ranije prepoznat kao značajan prediktor progresije IgA nefropatije (329).

Iako analiza pacijenata sa T2DM stratifikovanih prema prisustvu DR nije utvrdila razlike u koncentraciji glukoze i udelu HbA<sub>1c</sub>, grupa sa DR imala je značajno više koncentracije AGE jedinjenja u odnosu na grupu bez DR (Tabela 33). Prethodno opisani mehanizmi aktivacije RAGE receptora i inflamatornih signalnih puteva, koji stimulišu hiperprodukciju ROS i faktora rasta, na analogni način doprinose i oštećenju retine. Posledično, VEGF i ROS povećavaju permeabilnost krvno-retinalne barijere i podstiču angiogenezu disfunkcionalnih krvnih sudova, koji su skloni rupturi, dok aktivacija inflamatornih puteva dodatno stimuliše apoptozu pericita, endotelnih ćelija i neurona retine (330). Kod obe grupe pacijenata utvrđene su povišene vrednosti PAB, TOS, AOPP i IMA (Tabela 34), što odražava stanje pojačanog oksidativnog stresa u T2DM sa komplikacijama. Izdvaja se nalaz značajno nižih vrednosti TAS kod pacijenata bez DR, dok se vrednosti ovog parametra kod pacijenata sa DR nisu razlikovale u odnosu na KG. Interpretacija ovih rezultata je otežana zbog malog broja pacijenata sa DR u našem istraživanju, kao i činjenice da vrednosti redoks parametara u serumu ne odražavaju uvek pouzdano intenzitet lokalnog oksidativnog stresa. U prilog ovoj tvrdnji govore rezultati studije koju su sproveli Yilmaz i saradnici, u kojoj su ispitivani TOS i TAS u očnoj vodici zdravih osoba sa senilnom kataraktom i kod T2DM pacijenata bez DR, pacijenata sa neproliferativnom i pacijenata sa proliferativnom DR (331). Autori su pokazali da je TOS bio značajno viši kod pacijenata sa T2DM, nezavisno od prisustva DR, dok je TAS bio značajno niži kod pacijenata sa proliferativnom i neproliferativnom DR u odnosu na zdrave ispitanike sa senilnom kataraktom. Rezultati ove studije ukazuju na aktivaciju specifičnih adaptivnih kompenzatornih mehanizama u kasnijim stadijumima mikrovaskularnog oštećenja, kao odgovor na hroničnu produkciju prooksidanasa i inflamatornih medijatora (332). Analiza biomarkera inflamacije (Tabela 35) je utvrdila značajno više vrednosti PIV indeksa kod pacijenata bez DR u poređenju sa KG. Za razliku od naših rezultata, Candan i saradnici su ukazali na potencijalnu primenu PIV indeksa kao markera proliferativne DR (333). Navedeni kontradiktorni nalazi najverovatnije su posledica ograničene veličine uzorka, ali mogu da odražavaju i kompleksnu prirodu imunskog odgovora, uključujući moguću iscrpljenost određenih leukocitnih subpopulacija usled dugotrajne sistemske inflamacije, čemu dodatno doprinosi visoka učestalost istovremenog prisustva više hroničnih komplikacija u našoj kohorti. Procena dijagnostičke tačnosti

biomarkera redoks statusa i inflamacije za predikciju DR izdvojila je TOS kao parametar koji ima najveću dijagnostičku osetljivost, sa potencijalom za primenu u skriningu DR (Tabela 39), što bi trebalo potvrditi u budućim istraživanjima. Ukupno uzevši, naši rezultati potvrđuju hipotezu koju su postavili Al-Shabrawey i Smith, da bi ispitivanje biomarkera oksidativnog stresa kod pacijenata sa T2DM moglo doprineti dijagnostici i prevenciji DR (334).

Nedavne studije su pokazale da dislipidemija, posebno niske koncentracije HDL-h, korelira sa težinom DR, što sugerše da HDL čestice imaju aktivnu ulogu u razvoju ove komplikacije. S druge strane, neka istraživanja ukazuju na nelinearni odnos (U-zavisnost), pri čemu se rizik od DR povećava i pri niskim i pri visokim koncentracijama HDL-h (335). Analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija ukazala je na trend smanjenja HDL dijametra i udela velikih, zrelih HDL2b čestica kod pacijenata sa DR (Tabela 37). U skladu sa ovim nalazom bila je i niža aktivnost PON1 (Tabela 34). Imajući u vidu povećanu produkciju AGE produkata kod pacijenata sa DR (Tabela 33), može se pretpostaviti da je glikacija HDL čestica povezana sa inhibicijom aktivnosti PON1, čije antioksidativno dejstvo ima ključnu ulogu u očuvanju protektivnog kapaciteta čestica (336). Dodatno, negativna korelacija vrednosti AGE sa udelom HDL3c subfrakcija (Tabela 38) ukazuje da su najmanje HDL čestice najpodložnije neenzimskoj glikaciji. Ovi rezultati ističu potrebu za dodatnim proučavanjem funkcionalnih svojstava HDL čestica u DR, uzimajući u obzir prethodno navedena ograničenja naše studije.

Na osnovu dobro potvrđene uloge neenzimske glikacije u oštećenju neurona i razvoju DN (337), savremena istraživanja su usmerena na identifikaciju biomarkera i potencijalnih terapijskih mogućnosti sa ciljem unapređenja predviđanja i prevencije ove komplikacije. U našem istraživanju, koncentracije AGE produkata u serumu nisu se značajno razlikovale između pacijenata sa i bez DN (Tabela 40). Ovaj nalaz je u skladu sa zapažanjem koje su izneli drugi autori, da određivanje fluorescirajućih AGE produkata u serumu ima ograničenu sposobnost da predvidi DN u poređenju sa AGE koji se akumuliraju u tkivima (338). Među dostupnim metodama, autofluorescencija kože ističe se kao pouzdana i neinvazivna metoda za procenu akumulacije AGE produkata, a rezultati epidemioloških studija pokazuju da viši nivoi AGE u koži koreliraju sa težinom DN (339).

Kao i u slučaju drugih komplikacija, u grupi pacijenata sa DN potvrdili smo izražen redoks disbalans i povećanje markera inflamacije (Tabela 41 i Tabela 42). Više vrednosti PAB-a isključivo u grupi sa DN ukazuju na posebnu osetljivost nervnog tkiva na oštećenje posredovano ROS, što se može dovesti u vezu sa nižim nivoima glutaciona i ostalih komponenti antioksidativne zaštite u perifernim nervima (340). Ispitivanjem promena u lipidnom profilu ustanovili smo značajano niže aktivnosti CETP kod pacijenata sa DN. Iako u dostupnoj literaturi nema podataka o ulozi CETP u razvoju DN, raspoloživi podaci iz randomizovanih kliničkih studija pokazuju da primena CETP inhibitora u terapiji dislipidemije smanjuje rizik za pojavu dijabetesa kod pacijenata koji ga ranije nisu imali (341). Sa druge strane, niža aktivnost CETP u skladu je sa dominacijom većih HDL2b čestica uz istovremeni pad udela manjih HDL3a i HDL3b subfrakcija u serumu pacijenata sa DN (Tabela 44). Ovakav povoljniji profil HDL subfrakcija ukazuje na kompenzatorno povećanje kapaciteta procesa reverznog transporta holesterola u uslovima intenzivnog oksidativnog stresa, što je dodatno potvrđeno nalazom pozitivne korelacije između PAB vrednosti i udela većih HDL2b čestica (Tabela 45). Rezultati ROC analize (Tabela 46) izdvojili su hsCRP i AOPP kao markere sa značajnim dijagnostičkim potencijalom u identifikaciji DN, potvrđujući da su oksidativni stres i inflamacija centralni procesi u razvoju ove komplikacije.

Grupa pacijenata sa DS, koji predstavlja uznapredovalu fazu ishemijsko-neuropatskih oštećenja, odlikovala se najizraženijim promenama ispitivanih parametara. Najpre treba pomenuti uočeni klinički paradoks u kojem su vrednosti HbA<sub>1c</sub> bile značajno niže kod pacijenata sa DS u odnosu na pacijente bez ove komplikacije (Tabela 47). Ovaj nalaz može se objasniti visokim prevalencijom anemije u grupi sa DS. Naime, u stanjima teške hronične

inflamacije i ishemije karakterističnim za DS, sekrecija proinflamatornih citokina inhibira produkciju eritropoetina, dok ushodna regulacija hepcidina ometa apsorpciju gvožđa (342). Posledično, dolazi do inhibicije eritropoeze i skraćenja životnog veka eritrocita, usled čega je vreme izloženosti hemoglobina procesu neenzimske glikacije znatno kraće, što rezultuje lažno sniženim udelom HbA<sub>1c</sub>. (343) U ovom kontekstu, udeo HbA<sub>1c</sub> ne odražava poboljšanu metaboličku kontrolu, već je direktna posledica anemije hroničnih bolesti.

U pogledu redoks statusa, kod pacijenata sa DS zabeležene su najviše vrednosti PAB uz istovremeno značajno smanjenje aktivnosti SOD (Tabela 48), što je u skladu sa težinom tkivnih oštećenja. Rezultati ranijih istraživanja ukazuju na centralnu ulogu akumulacije superoksidnog anjona, usled smanjene aktivnosti SOD, u otežanom zarastanju rana i razvoju ulceracija (344). Stoga ovaj nalaz dobija dodatni značaj u kontekstu DS, jer kompromitovan sistem antioksidativne zaštite može pojačati oksidativni stres i doprineti poremećaju fiziološkog zarastanja rana, čime se povećava rizik od amputacije. Profil inflamatornih biomarkera u skladu je sa prirodom oštećenja, pri čemu više vrednosti SII u odnosu na pacijente bez DS (Tabela 49) odražavaju dominaciju neutrofila i trombocita, karakterističnu za pacijente sa visokim rizikom od amputacije (345). Kao i u slučaju DN, kod pacijenata sa DS uočen je atipičan pad aktivnosti CETP, praćen preraspodelom HDL čestica ka većim subfrakcijama (Tabela 51). Međutim, u uslovima izraženog inflamatornog okruženja i redoks disbalansa, akumulacija većih HDL čestica u cirkulaciji pacijenata sa DS ne odražava njihovu funkcionalnost, što potvrđuje nalaz snižene aktivnosti PON1 (Tabela 48). Rezultati ROC analize izdvojili su PAB kao parametar koji ima najveću diskriminativnu sposobnost u identifikaciji DS (Tabela 53).

Relevantnost uočenih razlika postala je jasnija nakon što je inicijalna analiza ponovljena poređenjem pacijenata sa DS i pacijenata koji nemaju komplikacije dijabetesa (Slika 25). Posebno se izdvaja nalaz značajno viših vrednosti PAB kod pacijenata koji su podvrgnuti amputaciji, dok su koncentracije SH-grupa bile značajno niže u odnosu sa pacijente kojima je DS lečeno konzervativnim pristupom. Ovi rezultati ukazuju na još intenzivniji oksidativni stres i slabiji antioksidativni kapacitet kod pacijenata sa težim oblikom DS, koji doprinose progresiji oštećenja tkiva i povećanom riziku od amputacije. Ova analiza je takođe ukazala na značaj NLR indeksa u evaluaciji DS. Inflamatorni indeks NLR obuhvata glavne komponente hroničnog inflamatornog odgovora, pri čemu povećan udeo neutrofila ukazuje na aktivan inflamatorni proces, dok smanjen udeo limfocita odražava neadekvatnu odbrambenu reakciju imunskog sistema. Povišen NLR indeks kod naših pacijenata sa DS u skladu je sa rezultatima nedavnih studija kod pacijenata sa perifernom neuropatijom i ulceracijama stopala (346,347). Iako nismo uočili dodatno povećanje NLR indeksa kod pacijenata koji su podvrgnuti amputaciji, podaci iz literature sugerišu da određivanje ovog markera može imati značaj u predviđanju ishoda ove komplikacije (348), što zahteva potvrdu u budućim istraživanjima sa većim brojem ispitanika. Važno je istaći da su u ROC analizi PAB i NLR pokazali prihvatljivu dijagnostičku tačnost, koja se dodatno poboljšava njihovim simultanim određivanjem (Slika 26).

Drugi deo istraživanja bio je usmeren na analizu epigenetskih promena u odnosu na prisustvo mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, kao i na ispitivanje povezanosti stepena globalne metilacije DNK sa biomarkerima redoks statusa, inflamacije i dislipidemije. Utvrdili smo da globalna hipometilacija DNK predstavlja univerzalni epigenetski nalaz kod pacijenata sa T2DM, prisutan nezavisno od vrste razvijene komplikacije (Tabela 56). Ovakav nalaz ukazuje na to da gubitak metil-grupa na nivou celokupnog genoma nije posledica specifičnog oštećenja ciljnog organa, već odražava metabolički disbalans svojstven za T2DM (349). U prilog ovoj tezi govore istraživanja Luttmerna i saradnika koji su dokumentovali globalnu hipometilaciju DNK kod osoba sa metaboličkim sindromom i pacijenata sa T2DM u poređenju sa normoglikemičnim ispitanicima (294). Naime, poznato je da se u osnovi metaboličkog sindroma i T2DM nalaze isti patofiziološki procesi, u koje se ubrajaju insulinska rezistencija, dislipidemija, abdominalna gojaznost i hipertenzija (29). Ipak, podaci o globalnoj

hipometilaciji DNK u kontekstu T2DM su ograničeni i nekonzistentni, za razliku od kancera gde je ovaj fenomen dobro potvrđen (350).

Kada se razmatraju promene metilacije DNK u odnosu na prisustvo specifičnih komplikacija, uočava se izostanak značajne razlike između pacijenata sa i bez KVB (Tabela 56). Niske vrednosti AUC u ROC analizi (Tabela 60) potvrđuju da stepen globalne metilacije nema zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost za otkrivanje KVB kod pacijenata sa T2DM. Literaturne podatke o globalnoj metilaciji DNK u KVB karakteriše izuzetna heterogenost, što dodatno potvrđuje kompleksnost ovih epigenetskih promena. Dok određene studije povezuju globalnu hipometilaciju sa povišenim rizikom od KVB, razvojem ishemijske bolesti srca i infarktom miokarda, druga istraživanja beleže prisustvo globalne hipermetilacije kod pacijenata sa manifestnom koronarnom arterijskom bolešću (351–353). Ovi kontradiktorni nalazi ukazuju na to da pravac epigenetskih promena zavisi od specifičnog patofiziološkog mehanizma i stadijuma vaskularnog oštećenja, ali i od pola pacijenata, s obzirom na to da su pojedine studije pokazale da je sistemska hipometilacija značajan prediktor rizika isključivo kod muškaraca (354,355). Dodatni izazov u interpretaciji ovih nalaza predstavlja primena različitih analitičkih metoda za kvantifikaciju globalne metilacije DNK, što značajno otežava standardizaciju i direktno poređenje dobijenih rezultata (356). Na osnovu rezultata korelacione analize (Tabela 57) može se pretpostaviti da su promene u metilaciji DNK kod pacijenata sa KVB u najvećoj meri posredovane redoks disbalansom.

Izraženije smanjenje stepena globalne metilacije DNK u odnosu na KG uočeno je kod pacijenata sa DNF, iako razlika u odnosu na pacijente bez ove komplikacije nije bila statistički značajna (Tabela 56). Moguće objašnjenje leži u pretežno tkivno specifičnoj prirodi epigenetskih promena, lokalizovanih u bubrežnom parenhimu, koje se ne reflektuju sa dovoljnom osetljivošću na epigenetski profil leukocita u perifernoj krvi, ali ne treba zanemariti ni efekat male veličine uzorka na statističku značajnost (357). Rezultati studija sprovedenih na uzorcima bubrežnog tkiva pacijenata sa DN ukazuju da promene u metilaciji DNK indukuju ekspresiju gena povezanih sa metaboličkim funkcijama i imunskim odgovorom, poput gena za TNF. Povišeni nivoi TNF bili su povezani sa pojačanim oštećenjem epitela glomerulnih kapilara i pojavom proteinurije, što sugeriše da varijacije u metilaciji *TNF* gena mogu imati ključnu ulogu u razvoju DN. Osim toga, u animalnom modelu DNF dokazana je povećana ekspresija DNMT1 i sledstvena metilacija supresornih proteina koji regulišu mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) signalni put, što je povezano sa pojačanom aktivnošću imunskih ćelija u bubrežnom tkivu (358).

Stratifikacijom pacijenata u odnosu na prisustvo DR utvrđena je tendencija smanjenja stepena globalne metilacije DNK isključivo u grupi pacijenata bez ove komplikacije, dok su vrednosti kod pacijenata sa DR bile bliske vrednostima u KG (Tabela 56). Zanimljivo je da su ovi naizgled kontradiktorni rezultati u saglasnosti sa istraživanjima Maghbolija i saradnika, koji su poređenjem pacijenata sa i bez DR pokazali da je globalna hipermetilacija DNK nezavisan prediktor za razvoj DR, kao i njeno povećanje tokom progresije ove komplikacije (359). Ovaj fenomen može biti posledica dinamične prirode epigenetskih modifikacija, koje se mogu javiti u različitim stadijumima vaskularnih oštećenja. U tom smislu, u ranoj fazi uočava se globalna hipometilacija, dok prelazak u aktivnu fazu angiogeneze i proliferacije, karakterističan za DR, podrazumeva reaktivaciju većeg broja signalnih puteva koji rezultuju ciljanom hipermetilacijom specifičnih gena, što se manifestuje kao prividna normalizacija globalnog nivoa metilacije DNK ili čak kao njeno povećanje (360). Grupa pacijenata sa DR se izdvojila i po odsustvu značajnih korelacija između stepena globalne metilacije DNK i biomarkera redoks statusa, inflamacije i dislipidemije. U literaturi se navodi da u razvoju DR dominiraju histonske modifikacije, što ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima u cilju razumevanja interakcije različitih epigenetskih mehanizama i prisutnih faktora rizika (361).

Za razliku od prethodno razmatranih grupa pacijenata sa komplikacijama, u kojima dominira redoks–epigenetska patofiziološka osovina, kod pacijenata sa DN stepen globalne metilacije DNK bio je u inverznoj korelaciji sa vrednostima inflamatornih indeksa (Tabela 58). Kao što je već objašnjeno, hipometilacija DNK u tesnoj je vezi sa pojačanom ekspresijom proinflamatornih gena. U tom kontekstu, nalaz povećanih vrednosti inflamatornih indeksa kod pacijenata sa DN može se tumačiti kao odraz aktivacije proinflamatornih signalnih puteva usled smanjenja stepena metilacije DNK. Treba naglasiti da to ne implicira uzročno–posledičnu vezu, već ukazuje na kompleksnu interakciju između epigenetskih mehanizama i inflamatornog odgovora u razvoju DN. U ovoj grupi pacijenata uočena je i negativna korelacija stepena globalne metilacije DNK sa dijametrima LDL čestica, što ukazuje na potencijalnu aktivaciju gena koji utiču na intravaskularno remodelovanje ovog lipoproteina ka malim, gustim LDL česticama. Ukupno uzevši, opisani procesi mogu dovesti do stvaranja mikrookruženja koje narušava neurovaskularni integritet i pogoduje razvoju DN (362). Ovakav koncept podržan je u nedavnim studijama koje potvrđuju da je sistemska hipometilacija DNK u leukocitima značajno izraženija kod pacijenata sa DN, pri čemu stepen gubitka metil-grupa direktno korelira sa težinom kliničke slike i dužinom trajanja bolesti (363). Guo i saradnici su utvrdili da je promena u obrascima metilacije uočena u promotorima gena uključenih u imunski odgovor, regulaciju oksidativnog stresa i rast aksona, čime se kompromituje funkcija Švanovih ćelija (364). Pored toga, Kwiatkowska i saradnici su dokumentovali izraženu promenu u obrascima metilacije kod bolne dijabetesne neuropatije (365). Pad stepena globalne metilacije kod ovih pacijenata stoga odražava aktivan proces koji trajno narušava regenerativni kapacitet perifernog nervnog sistema.

Najveći stepen smanjenja globalne metilacije DNK utvrđen je kod pacijenata sa DS (Tabela 56). Pored toga, u ovoj grupi pacijenata utvrđena je najsnažnija povezanost između globalne metilacije DNK sa markerima oksidativnog stresa (MDA, PAB), kao i sa gotovo svim ispitivanim inflamatornim indeksima (Tabela 59). Ovi nalazi potkrepljuju tezu da u uznapredovalim stadijumima ishemijsko-neuropatskih oštećenja sinergističko dejstvo oksidativnog stresa, inflamacije i tkivne hipoksije dodatno suprimira proces metilacije DNK. Rezultati nedavno publikovane studije ukazuju da pomenuti procesi predstavljaju ključne faktore koji onemogućavaju fiziološko zarastanje ulceracija (337). Na celularnom nivou, otežana reparacija oštećenog tkiva kod pacijenata sa DS može se objasniti konceptom metaboličke memorije. Pokazano je da fibroblasti, izolovani iz hroničnih rana pacijenata sa DS, zadržavaju obrazac globalne hipometilacije iniciran hiperglikemijom čak i nakon višenedelnog izlaganja normalnim koncentracijama glukoze (366). Ovaj perzistentni epigenetski potpis karakteriše se visoko specifičnom diferencijalnom metilacijom gena koji promovišu razgradnju i regeneraciju tkiva. U tom smislu, geni ključni za proliferaciju i zarastanje rana, poput *FGF1*, koji je odgovoran za sintezu fibroblastnog faktora rasta, *COL4A1* (engl. *collagen type IV alpha 1 chain*), koji kodira sintezu kolagena tip IV i *PLAU* (engl. *plasminogen activator, urokinase*), koji kodira sintezu aktivatora plazminogena urokinaznog tipa, podležu supresivnoj hipermetilaciji. Sa druge strane, geni koji kontrolišu sintezu enzima uključenih u degradaciju tkiva, poput matriksne metaloproteinaze-9, bivaju aktivirani usled demetilacije posredovane TET enzimima (367). Posledično, ovakvo opsežno epigenetsko remodelovanje onemogućava angiogenezu i obnavljanje ekstracelularnog matriksa, predstavljajući barijeru za oporavak tkiva, koja ne zavisi od trenutne metaboličke kontrole.

U ovom istraživanju po prvi put je procenjena dijagnostička tačnost stepena globalne metilacije DNK za predviđanje komplikacija T2DM. Utvrdili smo da ovaj epigenetski biomarker pokazuje najveću dijagnostičku tačnost za predikciju DS (AUC = 0,630), pri čemu optimalnoj graničnoj vrednosti od 3,51% odgovara osetljivost od 64% i specifičnost od 59,3% (Tabela 60). Iako stepen globalne metilacije DNK kao samostalni test pokazuje skromne performanse za kliničku identifikaciju DS, integracija ovog biomarkera u kombinovani model sa parametrima

redoks statusa, PAB i SOD povećava ukupnu diskriminativnu sposobnost modela (Slika 32). Na ovaj način ističe se značaj multimarkerskog pristupa, koji omogućava sveobuhvatnu analizu većeg broja biomarkera različitih patofizioloških procesa koji leže u osnovi razvoja i progresije kompleksnih poremećaja, kao što je T2DM (368). Definisanje multimarkerskih strategija predstavljaju ključni korak ka personalizovanoj medicini, koja omogućava prilagođavanje preventivnih i terapijskih intervencija individualnom profilu pacijenta. Aktuelna istraživanja potvrđuju da je kombinovanjem epigenetskih, genetskih i metaboličkih biomarkera moguće poboljšati prevenciju, dijagnostiku, praćenje toka bolesti i terapijskog odgovora (369).

Primena PCA analize omogućila je prepoznavanje dominantnih patofizioloških mehanizama kroz profilisanje pet klastera kardiometaboličkih faktora rizika specifičnih za ispitivanu grupu pacijenata sa T2DM. Izdvajanje „proinflatornog faktora“ kao dominantne komponente, koja integriše markere sistemske inflamacije (hsCRP, NLR) sa specifičnim pokazateljima oksidativnog stresa (PAB, IMA i SOD) potvrđuje da se ovi procesi *in vivo* ne odvijaju izolovano, već međusobno obrazuju pozitivne povratne sprege, čime se uspostavlja začarani krug. Grupisanje parametara ukupnog oksidativnog opterećenja (TOS, AOPP) zajedno sa ITM u zaseban „prooksidativni faktor“ biološki je koherentno, imajući u vidu da disfunkcija adipoznog tkiva predstavlja jedan od glavnih izvora sistemske hiperprodukcije ROS i hroničnog oksidativnog stresa (370). Faktori povezani sa starenjem i dužim trajanjem bolesti, kao i sa hiperglikemijom i antioksidativnom zaštitom, jasno su formirali nezavisne klustere, što potkrepljuje biološku utemeljenost primenjene PCA analize. Primena ovakvog multimarkerskog pristupa u binarnoj logističkoj regresionoj analizi identifikovala je „prooksidativni faktor“ kao ključni činilac koji skoro petostruko povećava rizik od sistemske hipometilacije DNK (Tabela 63). Kada se ovako integrisani kardiometabolički faktori rizika sagledaju u kontekstu epigenetskih modifikacija, proizilazi da oksidativni stres ima ključnu ulogu u smanjenju globalne metilacije DNK u ispitivanom uzorku pacijenata sa T2DM.

Sumirajući rezultate istraživanja, može se zaključiti da globalna hipometilacija DNK predstavlja rani i univerzalni epigenetski događaj u razvoju i progresiji T2DM, koji je primarno posredovan efektima hroničnog oksidativnog stresa. U odsustvu komplikacija i kod pojedinih mikrovaskularnih oštećenja dominantna je veza između narušenog redoks statusa i smanjenja globalne metilacije DNK. Progresija ka težim neurovaskularnim i ishemijskim komplikacijama, poput DN i DS, stvara mikrookruženje u kom se sistemska inflamacija i oksidativni stres međusobno potenciraju, dodatno menjajući epigenetske obrasce. Iako naši rezultati ukazuju na ograničenu prediktivnu sposobnost stepena globalne metilacije DNK, integracijom ovog biomarkera sa direktnim pokazateljima redoks disbalansa u multimarkerski panel postiže se poboljšana procena rizika za razvoj komplikacija. Na kraju, važno je istaći da su za validaciju ovih rezultata i njihovu potencijalnu primenu u kliničkom kontekstu neophodna dalja prospektivna istraživanja na većim kohortama, koja bi pratila dinamiku ispitivanih parametara tokom dužeg vremenskog perioda.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Uspešno je uvedena i optimizovana osetljiva, specifična i selektivna UHPLC-DAD metoda za simultano određivanje dC i 5mC, čime je omogućena precizna kvantifikacija stepena globalne metilacije DNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.
2. Utvrđeni su optimalni uslovi enzimske hidrolize genomske DNK (2h, 37 °C, 5U/L) i najmanja polazna količina DNK (6 µg) neophodna za analizu globalne metilacije DNK.
3. Pacijenti sa T2DM imaju značajno niži stepen globalne metilacije DNK u poređenju sa zdravim ispitanicima kontrolne grupe, što ukazuje na ulogu sistemskih epigenetskih modifikacija u razvoju i progresiji ovog oboljenja.
4. Globalna hipometilacija DNK kod pacijenata T2DM ne zavisi od starosti, pola, primenjenih terapijskih režima, metaboličke kontrole i prisustva tradicionalnih faktora rizika poput gojaznosti, hipertenzije i pušenja.
5. Pacijenti sa T2DM odlikuju se stanjem hroničnog oksidativnog stresa, inflamacije niskog stepena i aterogene dislipidemije. Prisustvo hroničnih komplikacija povezano je sa dodatnim sniženjem stepena globalne metilacije DNK i izraženijim poremećajima biomarkera redoks statusa, dislipidemije i inflamacije u odnosu na pacijente bez komplikacija.
6. Stepen globalne metilacije DNK pokazuje specifične obrasce povezanosti sa biomarkerima redoks statusa, inflamacije i dislipidemije u zavisnosti od prisutne mikrovaskularne komplikacije. Profili pacijenata sa DN i DS bili su slični, pri čemu je smanjenje stepena globalne metilacije DNK koreliralo sa porastom vrednosti parametara oksidativnog stresa i inflamacije, a sve je praćeno sniženjem koncentracije triglicerida. U grupi pacijenata sa DNF niži nivoi globalne metilacije DNK bili su povezani sa višim vrednostima prooksidanasa u serumu, dok je kod pacijenata sa KVB smanjenje metilacije DNK koreliralo sa porastom ukupnog oksidativnog potencijala plazme i smanjenjem antioksidativne zaštite. Nasuprot tome, kod pacijenata sa DR nije utvrđena međusobna povezanost stepena globalne metilacije DNK i biomarkera redoks statusa, inflamacije i dislipidemije.
7. Stepen globalne metilacije DNK ima najveću najveću dijagnostičku tačnost za predikciju komplikacije DS. Integracija ovog epigenetskog biomarkera u multimarkerski panel sa parametrima redoks statusa povećava ukupnu diskriminativnu sposobnost modela u odnosu na pojedinačne parametre.
8. Kod pacijenata sa T2DM identifikovano je 5 klastera kardiometaboličkih faktora rizika, od kojih je „prooksidativni faktor“ jedini nezavisni prediktor globalne hipometilacije DNK.
9. Globalna hipometilacija DNK je rani epigenetski događaj u T2DM, posredovan hroničnim oksidativnim stresom, pri čemu se epigenetski obrasci dodatno modifikuju sa razvojem komplikacija.

## 7. REFERENCE

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes\*, Bajaj M, McCoy RG, et al. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2026. *Diabetes Care*. 2026;49(Supplement\_1):S27-S49.
2. Duncan BB, Magliano DJ, Boyko EJ. IDF Diabetes Atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2025;41(1):7-9.
3. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(5):361-369.
4. Ahlqvist E, Prasad RB, Groop L. Subtypes of Type 2 Diabetes Determined From Clinical Parameters. *Diabetes*. 2020;69(10):2086-2093.
5. Tanabe H, Sato M, Miyake A, et al. Machine learning-based reproducible prediction of type 2 diabetes subtypes. *Diabetologia*. 2024;67(11):2446-2458.
6. Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2022;400(10365):1803-1820.
7. McCarthy MI. Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. Feero WG, Guttmacher AE, eds. *N Engl J Med*. 2010;363(24):2339-2350.
8. Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. Epigenetic Changes in Diabetes and Cardiovascular Risk. *Circ Res*. 2016;118(11):1706-1722.
9. Gregg EW, Li Y, Wang J, et al. Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990–2010. *N Engl J Med*. 2014;370(16):1514-1523.
10. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):643-648.
11. Zhang J, Zhang Z, Zhang K, Ge X, Sun R, Zhai X. Early detection of type 2 diabetes risk: limitations of current diagnostic criteria. *Front Endocrinol*. 2023;14:1260623.
12. World Health Organization. *Global Report on Diabetes*. World Health Organization; 2016.
13. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses. Nerurkar PV, ed. *PLOS ONE*. 2018;13(3):e0194127.
14. Baumblatt J, Fryar C, Gu Q, Ashman J. *Prevalence of Total, Diagnosed, and Undiagnosed Diabetes in Adults: United States, August 2021–August 2023*. National Center for Health Statistics (U.S.); 2024.
15. Magliano DJ, Sacre JW, Harding JL, Gregg EW, Zimmet PZ, Shaw JE. Young-onset type 2 diabetes mellitus — implications for morbidity and mortality. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(6):321-331.

16. Wu H, Patterson CC, Zhang X, et al. Worldwide estimates of incidence of type 2 diabetes in children and adolescents in 2021. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;185:109785.
17. Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo NC, et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109118.
18. Owens DavidR, Gurudas S, Sivaprasad S, et al. IDF diabetes Atlas: A worldwide review of studies utilizing retinal photography to screen for diabetic retinopathy from 2017 to 2024 inclusive. *Diabetes Res Clin Pract.* 2025;226:112346.
19. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut." Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2023. Published online 2024.
20. Republička komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje diabetes mellitus-a. Published online 2013.
21. Bonnefond A, Froguel P. Rare and Common Genetic Events in Type 2 Diabetes: What Should Biologists Know? *Cell Metab.* 2015;21(3):357-368.
22. Lu X, Xie Q, Pan X, et al. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):262.
23. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature.* 2016;536(7614):41-47.
24. Dimas AS, Lagou V, Barker A, et al. Impact of Type 2 Diabetes Susceptibility Variants on Quantitative Glycemic Traits Reveals Mechanistic Heterogeneity. *Diabetes.* 2014;63(6):2158-2171.
25. Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med.* 2014;6(7):60.
26. Min T, Stephens JW. Targeting abdominal obesity in diabetes. *Diabetes Manag.* 2015;5(4):301-309.
27. Narayan KMV, Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Williamson DF. Effect of BMI on Lifetime Risk for Diabetes in the U.S. *Diabetes Care.* 2007;30(6):1562-1566.
28. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(2):12.
29. Asghar S, Asghar S, Shahid S, Fatima M, Bukhari SMH, Nadeem Siddiqui S. Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: Prevalence, Risk Factors, and Associated Microvascular Complications. *Cureus.* 2023;15(5):e39076.
30. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 2016;126(1):12-22.
31. Bodhini D, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Rao MRS, Mohan V. *GLUT4* Gene Polymorphisms and Their Association with Type 2 Diabetes in South Indians. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(9):913-920.

32. Nirmalan N, Nirmalan M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesth Intensive Care Med.* 2023;24(10):618-623.
33. Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A. Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(8):597-611.
34. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2011;75(1):50-83.
35. Sylow L, Tokarz VL, Richter EA, Klip A. The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metab.* 2021;33(4):758-780.
36. Gowda D, Shekhar C, B. Gowda SG, Chen Y, Hui SP. Crosstalk between Lipids and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Livers.* 2023;3(4):687-708.
37. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133-2223.
38. Vithian K, Hurel S. Microvascular complications: pathophysiology and management. *Clin Med.* 2010;10(5):505-509.
39. Kropp M, Golubnitschaja O, Mazurakova A, et al. Diabetic retinopathy as the leading cause of blindness and early predictor of cascading complications-risks and mitigation. *EPMA J.* 2023;14(1):21-42.
40. Al-Kharashi AS. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy. *Saudi J Ophthalmol Off J Saudi Ophthalmol Soc.* 2018;32(4):318-323.
41. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2016;51:156-186.
42. Wallsh JO, Gallemore RP. Anti-VEGF-Resistant Retinal Diseases: A Review of the Latest Treatment Options. *Cells.* 2021;10(5):1049.
43. American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes\*. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Care in Diabetes-2026. *Diabetes Care.* 2026;49(Supplement\_1):S261-S276.
44. Habli MM. Comprehensive insights into diabetic nephropathy: pathophysiology, clinical features, and emerging treatments. *J Egypt Soc Nephrol Transplant.* 2024;24(4):163-168.
45. Hoogeveen EK. The Epidemiology of Diabetic Kidney Disease. *Kidney Dial.* 2022;2(3):433-442.
46. Lin B, Ma YY, Wang JW. Nano-Technological Approaches for Targeting Kidney Diseases With Focus on Diabetic Nephropathy: Recent Progress, and Future Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:870049.
47. Zhou L, Liu Y. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and renin-angiotensin system in chronic kidney disease: *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016;25(2):100-106.

48. Bichu P, Nistala R, Khan A, Sowers JR, Whaley-Connell A. Angiotensin receptor blockers for the reduction of proteinuria in diabetic patients with overt nephropathy: results from the AMADEO study. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):129-140.
49. Tanios BY, Ziyadeh FN. Emerging therapies for diabetic nephropathy patients: beyond blockade of the Renin-Angiotensin system. *Nephron Extra.* 2012;2(1):278-282.
50. Yang Y, Zhao B, Wang Y, et al. Diabetic neuropathy: cutting-edge research and future directions. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):132.
51. Zakir M, Ahuja N, Surksha MA, et al. Cardiovascular Complications of Diabetes: From Microvascular to Macrovascular Pathways. *Cureus.* Published online September 24, 2023.
52. Çakici N, Fakkal TM, Van Neck JW, Verhagen AP, Coert JH. Systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med.* 2016;33(11):1466-1476.
53. Yagihashi S, Matsunaga M. Ultrastructural Pathology of Peripheral Nerves in Patients with Diabetic Neuropathy. *Tohoku J Exp Med.* 1979;129(4):357-366.
54. Martinez L, Zahra T. Chronic Complications of Diabetes. *EMJ Diabetes.* Published online April 25, 2022.
55. Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, et al. The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med.* 2002;19(5):377-384.
56. Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM. Pathways to Diabetic Limb Amputation: Basis for Prevention. *Diabetes Care.* 1990;13(5):513-521.
57. Astasio-Picado Á, Jurado-Palomo J, Pozo-Aranda B, Cobos-Moreno P. Comparative Evidence on Negative Pressure Therapy and Hyperbaric Oxygen Therapy for Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review of Independent Effectiveness and Clinical Applicability. *Medicina (Mex).* 2026;62(1):109.
58. Kerr M, Rayman G, Jeffcoate WJ. Cost of diabetic foot disease to the National Health Service in England. *Diabet Med.* 2014;31(12):1498-1504.
59. Dawi J, Tumanyan K, Tomas K, et al. Diabetic Foot Ulcers: Pathophysiology, Immune Dysregulation, and Emerging Therapeutic Strategies. *Biomedicines.* 2025;13(5):1076.
60. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-1625.
61. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(9):689-709.
62. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med.* 2021;171(2):179-189.
63. Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem.* 2023;299(2):102838.

64. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:656-662.
65. Makino A, Scott BT, Dillmann WH. Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2010;53(8):1783-1794.
66. Chandel NS. NADPH—The Forgotten Reducing Equivalent. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2021;13(6):a040550.
67. Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):96-106.
68. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12222-12226.
69. Pan D, Xu L, Guo M. The role of protein kinase C in diabetic microvascular complications. *Front Endocrinol.* 2022;13:973058.
70. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998;47(6):859-866.
71. Zhang Z, Huang Q, Zhao D, Lian F, Li X, Qi W. The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular complications. *Front Endocrinol.* 2023;14:1112363.
72. Gautieri A, Passini FS, Silván U, et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol.* 2017;59:95-108.
73. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114(6):597-605.
74. Jia W, Guo A, Zhang R, Shi L. Mechanism of natural antioxidants regulating advanced glycosylation end products of Maillard reaction. *Food Chem.* 2023;404:134541.
75. Federico G, Gori M, Randazzo E, Vierucci F. Skin advanced glycation end-products evaluation in infants according to the type of feeding and mother's smoking habits. *SAGE Open Med.* 2016;4:2050312116682126.
76. de Vos LC, Mulder DJ, Smit AJ, et al. Skin autofluorescence is associated with 5-year mortality and cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):933-938.
77. Genuth S, Sun W, Cleary P, et al. Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015;64(1):266-278.
78. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003;21(1):3-12.

79. Fishman SL, Sonmez H, Basman C, Singh V, Poretzky L. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. *Mol Med Camb Mass*. 2018;24(1):59.
80. Zhang J, Ren S, Sun D, Shen GX. Influence of glycation on LDL-induced generation of fibrinolytic regulators in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(7):1140-1148.
81. Bahmani F, Bathaie SZ, Aldavood SJ, Ghahghaei A. Inhibitory Effect of Crocin(s) on Lens  $\alpha$ -Crystallin Glycation and Aggregation, Results in the Decrease of the Risk of Diabetic Cataract. *Mol Basel Switz*. 2016;21(2):143.
82. Pugliese G. Do advanced glycation end products contribute to the development of long-term diabetic complications? *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2008;18(7):457-460.
83. Adamopoulos C, Farmaki E, Spilioti E, Kiaris H, Piperi C, Papavassiliou AG. Advanced glycation end-products induce endoplasmic reticulum stress in human aortic endothelial cells. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(1):151-160.
84. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011;13(3):184-190.
85. Akhter F, Chen D, Akhter A, et al. High Dietary Advanced Glycation End Products Impair Mitochondrial and Cognitive Function. *J Alzheimers Dis JAD*. 2020;76(1):165-178.
86. Akhter F, Chen D, Akhter A, Yan SF, Yan SS. Age-dependent accumulation of dicarbonyls and advanced glycation endproducts (AGEs) associates with mitochondrial stress. *Free Radic Biol Med*. 2021;164:429-438.
87. Dodington DW, Desai HR, Woo M. JAK/STAT – Emerging Players in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(1):55-65.
88. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*. 2012;42(4):1151-1161.
89. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-429.
90. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003;370(3):1097-1109.
91. Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2022;13:931473.
92. Ninić A, Bojanin D, Sopić M, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Expression and Protein Levels in Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2021;13(1):61-71.
93. Prasad K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Mol Cell Biochem*. 2019;451(1-2):139-144.

94. Dong H, Sun Y, Nie L, et al. Metabolic memory: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):38.
95. Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R. Unraveling the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3393.
96. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808.
97. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):463-478.
98. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001;107(1):7-11.
99. Pilon G, Charbonneau A, White PJ, et al. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO<sup>-</sup> induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One.* 2010;5(12):e15912.
100. Karamitsos K, Oikonomou E, Theofilis P, et al. The Role of NLRP3 Inflammasome in Type 2 Diabetes Mellitus and Its Macrovascular Complications. *J Clin Med.* 2025;14(13):4606.
101. Mohamed IN, Li L, Ismael S, Ishrat T, El-Remessy AB. Thioredoxin interacting protein, a key molecular switch between oxidative stress and sterile inflammation in cellular response. *World J Diabetes.* 2021;12(12):1979-1999.
102. Xiang Y, Wang Z, Hui Q, Gwinn M, Vaccarino V, Sun YV. DNA Methylation of TXNIP Independently Associated with Inflammation and Diabetes Mellitus in Twins. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud.* 2021;24(5):273-280.
103. Li X, Shao X, Bazzano LA, et al. Blood DNA methylation at TXNIP and glycemic changes in response to weight-loss diet interventions: the POUNDS lost trial. *Int J Obes.* 2022;46(6):1122-1127.
104. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity.* 2022;55(1):31-55.
105. Sheu ML, Ho FM, Yang RS, et al. High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(3):539-545.
106. Chaurasia SS, Lim RR, Parikh BH, et al. The NLRP3 Inflammasome May Contribute to Pathologic Neovascularization in the Advanced Stages of Diabetic Retinopathy. *Sci Rep.* 2018;8(1):2847.
107. Gurung M, Li Z, You H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine.* 2020;51:102590.

108. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(3):207-215.
109. Pradhan AD. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327.
110. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine.* 2016;86:100-109.
111. Buyken AE, Von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G. Type 2 diabetes mellitus and risk of coronary heart disease: results of the 10-year follow-up of the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14(2):230-236.
112. Anand SS, Islam S, Rosengren A, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J.* 2008;29(7):932-940.
113. Leon BM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes.* 2015;6(13):1246.
114. Tonyan ZN, Nasykhova YA, Danilova MM, Glotov AS. Genetics of macrovascular complications in type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2021;12(8):1200-1219.
115. McEvoy JW, McCarthy CP, Bruno RM, et al. 2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension. *Eur Heart J.* 2024;45(38):3912-4018.
116. Iwasaki K, Matsumoto T, Aono H, Furukawa H, Samukawa M. Prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic diabetic patients by 64-slice computed tomography. *Coron Artery Dis.* 2008;19(3):195-201.
117. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, et al. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. *Int J Stroke.* 2025;20(2):132-144.
118. Martin SS, Aday AW, Allen NB, et al. 2025 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation.* 2025;151(8).
119. Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet.* 2018;50(4):524-537.
120. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2008;64(4):402-409.
121. Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, et al. A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet.* 2009;41(8):876-878.
122. Akalu Y, Birhan A. Peripheral Arterial Disease and Its Associated Factors among Type 2 Diabetes Mellitus Patients at Debre Tabor General Hospital, Northwest Ethiopia. *J Diabetes Res.* 2020;2020:9419413.
123. Hirsch AT. Peripheral Arterial Disease Detection, Awareness, and Treatment in Primary Care. *JAMA.* 2001;286(11):1317.

124. American Diabetes Association. Peripheral Arterial Disease in People With Diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(12):3333-3341.
125. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):e139-e596.
126. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006;368(1-2):1-19.
127. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(2):142-148.
128. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-229.
129. Miyashita Y, Shirai K, Itoh Y, et al. Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;56(3):181-187.
130. Bahiru E, Hsiao R, Phillipson D, Watson KE. Mechanisms and Treatment of Dyslipidemia in Diabetes. *Curr Cardiol Rep*. 2021;23(4):26.
131. Reaven GM, Chen YD, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest*. 1993;92(1):141-146.
132. Toft-Petersen AP, Tilsted HH, Aarøe J, et al. Small dense LDL particles - a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case-control study. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1):21.
133. Superko HR. Small, dense, low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2(3):226-231.
134. Gao S, Liu J. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic Dis Transl Med*. 2017;3(2):89-94.
135. Haase CL, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. HDL Cholesterol and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomization Study. *Diabetes*. 2015;64(9):3328-3333.
136. Schmidt MI, Duncan BB, Bang H, et al. Identifying individuals at high risk for diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes Care*. 2005;28(8):2013-2018.
137. Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet*. 2010;19(14):2877-2885.
138. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport: *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(3):229-238.
139. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1881-1888.

140. Nguyen SD, Jeong TS, Sok DE. Apolipoprotein A-I-mimetic peptides with antioxidant actions. *Arch Biochem Biophys*. 2006;451(1):34-42.
141. Farbstein D, Levy AP. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10(3):353-361.
142. van Deursen D, Jansen H, Verhoeven AJM. Glucose increases hepatic lipase expression in HepG2 liver cells through upregulation of upstream stimulatory factors 1 and 2. *Diabetologia*. 2008;51(11):2078-2087.
143. Lewis GF, Murdoch S, Uffelman K, et al. Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes*. 2004;53(11):2893-2900.
144. Baynes C, Henderson AD, Anyaoku V, et al. The role of insulin insensitivity and hepatic lipase in the dyslipidaemia of type 2 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1991;8(6):560-566.
145. Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1999;286(1-2):145-161.
146. Passarelli M, Tang C, McDonald TO, et al. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005;54(7):2198-2205.
147. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, et al. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13348-13355.
148. Curtiss LK, Witztum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glycosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes*. 1985;34(5):452-461.
149. Nobécourt E, Tabet F, Lambert G, et al. Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):766-772.
150. Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):421-429.
151. Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(2):175-186.
152. Bošković A, Rando OJ. Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annu Rev Genet*. 2018;52(1):21-41.
153. Huang C, Xu M, Zhu B. Epigenetic inheritance mediated by histone lysine methylation: maintaining transcriptional states without the precise restoration of marks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1609):20110332.
154. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(19):2145-2156.

155. Tan M, Luo H, Lee S, et al. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell*. 2011;146(6):1016-1028.
156. Tamaru H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: *jumonji* crosses the line. *Genes Dev*. 2010;24(14):1465-1478.
157. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2024;25(3):211-232.
158. Sriraman A, Debnath TK, Xhemalce B, Miller KM. Making it or breaking it: DNA methylation and genome integrity. *Essays Biochem*. 2020;64(5):687-703.
159. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-492.
160. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):204-220.
161. Angeloni A, Bogdanovic O. Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands. *Biochem Soc Trans*. 2021;49(3):1109-1119.
162. Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods San Diego Calif*. 2021;187:28-43.
163. Suelves M, Carrió E, Núñez-Álvarez Y, Peinado MA. DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. *Brief Funct Genomics*. 2016;15(6):443-453.
164. Fournier A, Sasai N, Nakao M, Defossez PA. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief Funct Genomics*. 2012;11(3):251-264.
165. Teif VB, Beshnova DA, Vainshtein Y, et al. Nucleosome repositioning links DNA (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development. *Genome Res*. 2014;24(8):1285-1295.
166. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins: Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem*. 2001;268(1):1-6.
167. Gong W, Yang R, Wang Z. DNA methylation regulator-based signature for predicting clear cell renal cell carcinoma prognosis. *Am J Transl Res*. 2023;15(4):2443-2459.
168. Veland N, Lu Y, Hardikar S, et al. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(1):152-167.
169. Chen Z xia, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18347-18353.
170. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-1068.
171. Sharif J, Muto M, Takebayashi S ichiro, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 2007;450(7171):908-912.

172. Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science*. 2007;317(5845):1760-1764.
173. Svedružić ŽM. Dnmt1 structure and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;101:221-254.
174. Lai J, Chen L, Li Q, et al. tRNA methyltransferase DNMT2 promotes hepatocellular carcinoma progression and enhances Bortezomib resistance through inhibiting TNFSF10. *Cell Signal*. 2025;127:111533.
175. Chédin F. The DNMT3 Family of Mammalian De Novo DNA Methyltransferases. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 101. Elsevier; 2011:255-285.
176. Kubo N, Uehara R, Uemura S, Ohishi H, Shirane K, Sasaki H. Combined and differential roles of ADD domains of DNMT3A and DNMT3L on DNA methylation landscapes in mouse germ cells. *Nat Commun*. 2024;15(1):3266.
177. Moarefi AH, Chédin F. ICF Syndrome Mutations Cause a Broad Spectrum of Biochemical Defects in DNMT3B-Mediated De Novo DNA Methylation. *J Mol Biol*. 2011;409(5):758-772.
178. Feng Z, Tan Z, Lu D. Mitochondrial bioenergetics dysfunction in T2DM: linking oxidative stress to insulin resistance. *Front Endocrinol*. 2025;16:1674477.
179. Cai G, Zhang X, Jiao J, Du W, Yan M. Targeting the cGAS-STING Pathway to Modulate Immune Inflammation in Diabetes and Cardiovascular Complications: Mechanisms and Therapeutic Insights. *Curr Issues Mol Biol*. 2025;47(9):750.
180. Short NJ, Kantarjian H. Hypomethylating agents for the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: Past discoveries and future directions. *Am J Hematol*. 2022;97(12):1616-1626.
181. Liu J, Lang G, Shi J. Epigenetic Regulation of PDX-1 in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2021;14:431-442.
182. Kim DJ. The Role of the DNA Methyltransferase Family and the Therapeutic Potential of DNMT Inhibitors in Tumor Treatment. *Curr Oncol*. 2025;32(2):88.
183. Zhang X, Zhang Y, Wang C, Wang X. TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):297.
184. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4841-4849.
185. Endicott JL, Nolte PA, Shen H, Laird PW. Cell division drives DNA methylation loss in late-replicating domains in primary human cells. *Nat Commun*. 2022;13(1):6659.
186. Zhou W, Dinh HQ, Ramjan Z, et al. DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nat Genet*. 2018;50(4):591-602.
187. Tibben BM, Rothbart SB. Mechanisms of DNA Methylation Regulatory Function and Crosstalk with Histone Lysine Methylation. *J Mol Biol*. 2024;436(7):168394.

188. Cortellino S, Xu J, Sannai M, et al. Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair. *Cell*. 2011;146(1):67-79.
189. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. 1999;401(6750):301-304.
190. Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Williams M, Murrell A, Balasubramanian S. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem*. 2014;6(12):1049-1055.
191. Ross SE, Bogdanovic O. TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(3):875-885.
192. Huang Y, Chavez L, Chang X, et al. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(4):1361-1366.
193. Lazarenkov A, Sardina JL. Dissecting TET2 Regulatory Networks in Blood Differentiation and Cancer. *Cancers*. 2022;14(3):830.
194. Ahmed I, Chakraborty R, Faizy AF, Moin S. Exploring the key role of DNA methylation as an epigenetic modulator in oxidative stress related islet cell injury in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. *J Diabetes Metab Disord*. 2024;23(2):1699-1718.
195. Huang H, Li G, He Y, et al. Cellular succinate metabolism and signaling in inflammation: implications for therapeutic intervention. *Front Immunol*. 2024;15:1404441.
196. Simar D, Verstehey S, Donkin I, et al. DNA methylation is altered in B and NK lymphocytes in obese and type 2 diabetic human. *Metabolism*. 2014;63(9):1188-1197.
197. Wang X, Zhu H, Snieder H, et al. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med*. 2010;8(1):87.
198. Yang X, Wang X, Liu D, Yu L, Xue B, Shi H. Epigenetic Regulation of Macrophage Polarization by DNA Methyltransferase 3b. *Mol Endocrinol*. 2014;28(4):565-574.
199. You D, Nilsson E, Tenen DE, et al. Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. *eLife*. 2017;6:e30766.
200. Dayeh T, Volkov P, Salö S, et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. Greally JM, ed. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004160.
201. The PLOS Genetics Staff. Correction: Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *PLoS Genet*. 2014;10(12):e1004886.
202. Nilsson E, Matte A, Perfilyev A, et al. Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(11):E1491-E1501.
203. Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, et al. Increased Hepatic PDGF-AA Signaling Mediates Liver Insulin Resistance in Obesity-Associated Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2018;67(7):1310-1321.

204. Kirchner H, Sinha I, Gao H, et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol Metab.* 2016;5(3):171-183.
205. Barrès R, Osler ME, Yan J, et al. Non-CpG Methylation of the PGC-1 $\alpha$  Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. *Cell Metab.* 2009;10(3):189-198.
206. Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, et al. Impact of an Exercise Intervention on DNA Methylation in Skeletal Muscle From First-Degree Relatives of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2012;61(12):3322-3332.
207. Arner P, Sahlqvist AS, Sinha I, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia.* 2016;59(11):2393-2405.
208. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, et al. Altered DNA Methylation and Differential Expression of Genes Influencing Metabolism and Inflammation in Adipose Tissue From Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2014;63(9):2962-2976.
209. Ronn T, Volkov P, Gillberg L, et al. Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet.* Published online April 10, 2015:ddv124.
210. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* 2015;16(1):8.
211. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-986.
212. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care.* 1999;22(1):99-111.
213. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359(15):1577-1589.
214. Tewari S, Zhong Q, Santos JM, Kowluru RA. Mitochondria DNA Replication and DNA Methylation in the Metabolic Memory Associated with Continued Progression of Diabetic Retinopathy. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2012;53(8):4881.
215. Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):244-250.
216. Magri-Tomaz L, Melbouci L, Mercier J, et al. Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. *Cell Biochem Funct.* 2018;36(7):387-393.
217. Suter MA, Ma J, Vuguin PM, et al. In utero exposure to a maternal high-fat diet alters the epigenetic histone code in a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;210(5):463.e1-463.e11.

218. Aranyi T, Susztak K. Cytosine Methylation Studies in Patients with Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep.* 2019;19(10):91.
219. Whitelaw NC, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(3):273-279.
220. Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R, Ehrlich M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(20):4763-4776.
221. Alexovič M, Uličná C, Sabo J, Davalieva K. Human peripheral blood mononuclear cells as a valuable source of disease-related biomarkers: Evidence from comparative proteomics studies. *PROTEOMICS – Clin Appl.* 2024;18(2):2300072.
222. Le T, Kim KP, Fan G, Faull KF. A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Anal Biochem.* 2011;412(2):203-209.
223. So MY, Tian Z, Phoon YS, et al. Gene Expression Profile and Toxic Effects in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Zearalenone. Minna JD, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e96404.
224. Karimi M, Johansson S, Stach D, et al. LUMA (LUminometric Methylation Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res.* 2006;312(11):1989-1995.
225. Lisanti S, Omar WAW, Tomaszewski B, et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One.* 2013;8(11):e79044.
226. Parrish RR, Day JJ, Lubin FD. Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Curr Protoc Neurosci.* 2012;Chapter 7:Unit 7.24.
227. Rauch TA, Pfeifer GP. Methods for Analyzing DNA Cytosine Modifications Genome-wide. In: *Handbook of Epigenetics.* Elsevier; 2023:123-135.
228. Wang Y, Liu J, Wang Z, Zhang M, Zhang Y. The Research Progress of Single-Molecule Sequencing and Its Significance in Nucleic Acid Metrology. *Biosensors.* 2024;15(1):4.
229. Kaur C, Adams S, Kibirige CN, Asquith B. Absolute quantification of rare gene targets in limited samples using crude lysate and ddPCR. *Sci Rep.* 2025;15(1):9744.
230. England R, Pettersson M. Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nat Methods.* 2005;2(10):i-ii.
231. Rizvi AA, Kathuria A, Al Mahmeed W, et al. Post-COVID syndrome, inflammation, and diabetes. *J Diabetes Complications.* 2022;36(11):108336.
232. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002;51(6):597-604.

233. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-1313.
234. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103-1111.
235. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem.* 2007;40(3-4):248-254.
236. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med.* 2000;19(4):311-315.
237. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-421.
238. Richter RJ, Jampsa RL, Jarvik GP, Costa LG, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status and genotypes at specific polymorphic sites. *Curr Protoc Toxicol.* 2004;Chapter 4:Unit4.12.
239. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-285.
240. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-77.
241. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175.
242. Ginsberg HN, Rosenson RS, Hovingh GK, et al. LDL-C calculated by Friedewald, Martin-Hopkins, or NIH equation 2 versus beta-quantification: pooled alirocumab trials. *J Lipid Res.* 2022;63(1):100148.
243. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, et al. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2405-2412.
244. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res.* 2004;45(4):773-775.
245. Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem.* 2007;40(5-6):310-316.
246. Crescenti A, Solà R, Valls RM, et al. Cocoa Consumption Alters the Global DNA Methylation of Peripheral Leukocytes in Humans with Cardiovascular Disease Risk Factors: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One.* 2013;8(6):e65744.
247. Quinlivan EP, Gregory JF. DNA digestion to deoxyribonucleoside: a simplified one-step procedure. *Anal Biochem.* 2008;373(2):383-385.

248. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(8):2709-2721.
249. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462(7271):315-322.
250. Mach F, Koskinas KC, Roeters Van Lennep JE, et al. 2025 Focused Update of the 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2025;46(42):4359-4378.
251. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med.* 2008;205(10):2409-2417.
252. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology.* 2016;5(1):3.
253. Liu Q, Helmin KA, Dortzbach ZD, et al. Novel enzyme-based reduced representation method for DNA methylation profiling with low inputs. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(12):gkaf558.
254. Armstrong KM, Bermingham EN, Bassett SA, Treloar BP, Roy NC, Barnett MPg. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnol J.* 2011;6(1):113-117.
255. Panpraneecharoen S, Chatrakoon T, Sansenya S, Chumanee S. Optimization and validation of HPLC/DAD method for the determination of adenosine and cordycepin in cordyceps products. *Anal Sci Technol.* 2023;36(4):152-160.
256. Kisil O, Sergeev A, Bacheva A, Zvereva M. Methods for Detection and Mapping of Methylated and Hydroxymethylated Cytosine in DNA. *Biomolecules.* 2024;14(11):1346.
257. Huang Q, Xu S, Mo M, et al. Quantification of DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease mouse model using LC-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2018;53(7):590-594.
258. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321(7258):405-412.
259. Jialal I, Singh G. Management of diabetic dyslipidemia: An update. *World J Diabetes.* 2019;10(5):280-290.
260. Marttila S, Kananen L, Häyrynen S, et al. Ageing-associated changes in the human DNA methylome: genomic locations and effects on gene expression. *BMC Genomics.* 2015;16(1):179.
261. Naidoo DP. The link between microalbuminuria, endothelial dysfunction and cardiovascular disease in diabetes. *Cardiovasc J South Afr Off J South Afr Card Soc South Afr Soc Card Pract.* 2002;13(4):194-199.

262. Kruglova MP, Ivanov AV, Virus ED, et al. Urine S-Adenosylmethionine are Related to Degree of Renal Insufficiency in Patients with Chronic Kidney Disease. *Lab Med*. 2021;52(1):47-56.
263. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1543-1548.
264. Liu R, Zhang M, Xu L, et al. Fluorescent advanced glycation end products in type 2 diabetes and its association with diabetes duration, hemoglobin A1c, and diabetic complications. *Front Nutr*. 2022;9:1083872.
265. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziółkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 2022;11(8):1312.
266. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(1):198-202.
267. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, et al. Reduction of the Accumulation of Advanced Glycation End Products by ACE Inhibition in Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2002;51(11):3274-3282.
268. Zeng G, Zhang C, Song Y, et al. The potential impact of inflammation on the lipid paradox in patients with acute myocardial infarction: a multicenter study. *BMC Med*. 2024;22(1):599.
269. Wang TY, Chang WL, Wei CY, Liu CH, Tzeng RC, Chiu PY. Cholesterol Paradox in Older People with Type 2 Diabetes Mellitus Regardless of Lipid-Lowering Drug Use: A Cross-Sectional Cohort Study. *Nutrients*. 2023;15(14):3270.
270. de Vries R, Borggreve SE, Dullaart RPF. Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2003;49(11-12):601-613.
271. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015;58(5):886-899.
272. Nakhjavani M, Rajab A, Rabizadeh S, et al. Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity is lower in patients with type 2 diabetes in the presence of metabolic syndrome. *Bioact Compd Health Dis*. 2020;3(4):66.
273. Dogné S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(7):1427-1439.
274. Ohira M, Miyashita Y, Ebisuno M, et al. Effect of metformin on serum lipoprotein lipase mass levels and LDL particle size in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;78(1):34-41.
275. Kocer D, Bayram F, Diric H. The effects of metformin on endothelial dysfunction, lipid metabolism and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2014;30(5):367-371.

276. Hayashi T, Hirano T, Yamamoto T, Ito Y, Adachi M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. *Metabolism*. 2006;55(7):879-884.
277. Mora S, Otvos JD, Rosenson RS, Pradhan A, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein Particle Size and Concentration by Nuclear Magnetic Resonance and Incident Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes*. 2010;59(5):1153-1160.
278. Cardner M, Yalcinkaya M, Goetze S, et al. Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight*. 2020;5(1):e131491.
279. Škvařilová M, Bulava A, Stejskal D, Adamovská S, Bartek J. INCREASED LEVEL OF ADVANCED OXIDATION PRODUCTS (AOPP) AS A MARKER OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME. *Biomed Pap*. 2005;149(1):83-87.
280. Lyons TJ, Jenkins AJ. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev*. 1997;5(4):365-391.
281. Zinellu A, Paliogiannis P, Usai MF, Carru C, Mangoni AA. Effect of statin treatment on circulating malondialdehyde concentrations: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319862714.
282. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118.
283. Bandeira S de M, Guedes G da S, da Fonseca LJS, et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:819310.
284. Herder C, Kannenberg JM, Huth C, et al. Myeloperoxidase, superoxide dismutase-3, cardiometabolic risk factors, and distal sensorimotor polyneuropathy: The KORA F4/FF4 study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018;34(5):e3000.
285. Yan Z, Spaulding HR. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. *Redox Biol*. 2020;32:101508.
286. Gómez-Marcos MA, Blázquez-Medela AM, Gamella-Pozuelo L, Recio-Rodríguez JI, García-Ortiz L, Martínez-Salgado C. Serum Superoxide Dismutase Is Associated with Vascular Structure and Function in Hypertensive and Diabetic Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9124676.
287. Wei Q, Shen N, Chen X, Cai J. Association of Systemic Inflammatory Indices with Metabolic Dysfunction–Associated Fatty Liver Disease and Liver Fibrosis. *Turk J Gastroenterol*. Published online February 12, 2026.
288. Bi W, Liu Y, Wu W, et al. Association of nine composite inflammatory indices with cardiovascular diseases in US adults: national health and nutrition examination survey (NHANES, 2005-2018). *J Health Popul Nutr*. 2026;45(1):55.
289. Bulu A, Keser S. The relationship between pan-immune inflammation value and different stages of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2025;25(1):184.

290. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384.
291. Yamaguchi S, Hong K, Liu R, et al. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res.* 2013;23(3):329-339.
292. Storebjerg TM, Strand SH, Høyer S, et al. Dysregulation and prognostic potential of 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC), and 5-carboxylcytosine (5caC) levels in prostate cancer. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1):105.
293. Yuan EF, Yang Y, Cheng L, et al. Hyperglycemia affects global 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in blood genomic DNA through upregulation of SIRT6 and TETs. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):63.
294. Luttmer R, Spijkerman AM, Kok RM, et al. Metabolic syndrome components are associated with DNA hypomethylation. *Obes Res Clin Pract.* 2013;7(2):e106-e115.
295. Thongsroy J, Mutirangura A. Decreased Alu methylation in type 2 diabetes mellitus patients increases HbA1c levels. *J Clin Lab Anal.* 2023;37(17-18):e24966.
296. Pinzón-Cortés JA, Perna-Chaux A, Rojas-Villamizar NS, et al. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. *Endocr Connect.* 2017;6(8):708-725.
297. Olsen AS, Sarras MP, Leontovich A, Intine RV. Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Diabetes.* 2012;61(2):485-491.
298. Anwar S, Wulaningsih W, Lehmann U. Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):974.
299. Zampieri M, Bacalini MG, Barchetta I, et al. Increased PARylation impacts the DNA methylation process in type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):114.
300. Keating ST, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes. *Clin Genet.* 2013;84(1):1-10.
301. Rubio K, Hernández-Cruz EY, Rogel-Ayala DG, et al. Nutriepigenomics in Environmental-Associated Oxidative Stress. *Antioxid Basel Switz.* 2023;12(3):771.
302. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1533-1554.
303. Yi YS. Functional Interplay between Methyltransferases and Inflammasomes in Inflammatory Responses and Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7580.
304. Cucoreanu C, Tigu AB, Nistor M, et al. Epigenetic and Molecular Alterations in Obesity: Linking CRP and DNA Methylation to Systemic Inflammation. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;46(7):7430-7446.
305. Ouidir M, Zeng X, Workalemahu T, et al. Early pregnancy dyslipidemia is associated with placental DNA methylation at loci relevant for cardiometabolic diseases. *Epigenomics.* 2020;12(11):921-934.

306. Gomez-Alonso MDC, Kretschmer A, Wilson R, et al. DNA methylation and lipid metabolism: an EWAS of 226 metabolic measures. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):7.
307. Ma CX, Ma XN, Guan CH, Li YD, Mauricio D, Fu SB. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: progress toward personalized management. *Cardiovasc Diabetol*. 2022;21(1):74.
308. Oo MM, Tan Chung Zhen I, Ng KS, et al. Observational study investigating the prevalence of asymptomatic stage B heart failure in patients with type 2 diabetes who are not known to have coronary artery disease. *BMJ Open*. 2021;11(1):e039869.
309. The Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*. 2010;375(9733):2215-2222.
310. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. Published online November 23, 2016:i5953.
311. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 6. Glycemic Targets: *Standards of Medical Care in Diabetes—2022*. *Diabetes Care*. 2022;45(Supplement\_1):S83-S96.
312. Stoicescu C, Vacarescu C, Cozma D. HDL Function Versus Small Dense LDL: Cardiovascular Benefits and Implications. *J Clin Med*. 2025;14(14):4945.
313. Lee JJ, Chi G, Fitzgerald C, et al. Cholesterol Efflux Capacity and Its Association With Adverse Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:774418.
314. Klisic A, Bozovic M, Ostanek B, et al. Relationship Between Oxidative Stress and Cardiovascular Risk in Adolescents in Montenegro. *Int J Mol Sci*. 2025;26(15):7650.
315. He J, Bian X, Song C, et al. High neutrophil to lymphocyte ratio with type 2 diabetes mellitus predicts poor prognosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a large-scale cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2022;21(1):156.
316. Hu B, Liu T, Sun Y, Sun J, Feng L, Li F. Association between systemic immune-inflammation index and all-cause and CVD mortality in non-elderly diabetic adults. *Clinics*. 2025;80:100739.
317. Zhang Y, Chen P, Zhu X. Lymphocyte-to-white blood cell ratio is associated with outcome in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *World J Gastroenterol*. 2023;29(23):3678-3687.
318. Bellanti F, Coda ARD, Trecca MI, Lo Buglio A, Serviddio G, Vendemiale G. Redox Imbalance in Inflammation: The Interplay of Oxidative and Reductive Stress. *Antioxidants*. 2025;14(6):656.
319. Lee HS, Lee JH. Early elevation of high-sensitivity C-reactive protein as a predictor for cardiovascular disease incidence and all-cause mortality: a landmark analysis. *Sci Rep*. 2023;13(1):14118.

320. Persson F, Rossing P. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. *Kidney Int Suppl.* 2018;8(1):2-7.
321. Nishad R, Tahaseen V, Kavvuri R, et al. Advanced-Glycation End-Products Induce Podocyte Injury and Contribute to Proteinuria. *Front Med.* 2021;8:685447.
322. Koska J, Gerstein HC, Beisswenger PJ, Reaven PD. Advanced Glycation End Products Predict Loss of Renal Function and High-Risk Chronic Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2022;45(3):684-691.
323. Wu XQ, Zhang DD, Wang YN, Tan YQ, Yu XY, Zhao YY. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. *Free Radic Biol Med.* 2021;171:260-271.
324. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2002;59(7):1117-1128.
325. Sun H, Yuan Y, Sun Z. Update on Mechanisms of Renal Tubule Injury Caused by Advanced Glycation End Products. *BioMed Res Int.* 2016;2016:5475120.
326. Miljkovic M, Stefanovic A, Vekic J, et al. Activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL2 and HDL3 subclasses in renal disease. *Clin Biochem.* 2018;60:52-58.
327. Vekic J, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N, et al. Cox proportional hazard model analysis of survival in end-stage renal disease patients with small-sized high-density lipoprotein particles. *Clin Biochem.* 2011;44(8-9):635-641.
328. Miljkovic M, Stefanovic A, Simic-Ogrizovic S, et al. Association of Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation With Redox Status in VLDL, LDL, and HDL Lipoproteins in Patients With Renal Disease. *Angiology.* 2018;69(10):861-870.
329. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, et al. Early prediction of IgA nephropathy progression: Proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. *Kidney Int.* 2004;66(4):1606-1612.
330. Wu MY, Yiang GT, Lai TT, Li CJ. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3420187.
331. Yilmaz M, Koktekir BE, Bozkurt B, Akyurek F, Okudan S, Unlu A. Evaluation of total oxidant status, total antioxidant capacity and oxidative stress levels in humor aqueous of diabetic cataract patients. *J Retina-Vitr.* 2020;29(1):25.
332. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol.* 2020;37:101799.
333. Candan O, Orman G, Ünlü N, Uney G. Assessment of pan-immune-inflammation value as a novel marker of proliferative diabetic retinopathy stage. *Int J Ophthalmol.* 2026;19(3):517-525.
334. Al-Shabrawey M, Smith S. Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers. *EPMA J.* 2010;1(1):56-72.

335. Xu W, Xu X, Zhang M, Sun C. Association between HDL cholesterol with diabetic retinopathy in diabetic patients: a cross-sectional retrospective study. *BMC Endocr Disord*. 2024;24(1):65.
336. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol*. 2001;38(4):163-169.
337. King RH. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol MP*. 2001;54(6):400-408.
338. Singh I, Issar T, Poynten AM, Milner KL, Krishnan AV, Dhanapalaratnam R. Evaluation of the Impact of Advanced Glycation End-Products on Peripheral Neuropathy Outcomes in Type 2 Diabetes. *Biomedicines*. 2024;12(11):2518.
339. Meerwaldt R, Links TP, Graaff R, et al. Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2005;48(8):1637-1644.
340. Romero FJ, Monsalve E, Hermenegildo C, et al. Oxygen toxicity in the nervous tissue: Comparison of the antioxidant defense of rat brain and sciatic nerve. *Neurochem Res*. 1991;16(2):157-161.
341. Dangas K, Navar AM, Kastelein JJP. The effect of CETP inhibitors on new-onset diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2022;8(6):622-632.
342. Begum S, Latunde-Dada GO. Anemia of Inflammation with An Emphasis on Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2019;11(10):2424.
343. Gezawa ID, Ugwu ET, Ezeani I, Adeleye O, Okpe I, Enamino M. Anemia in patients with diabetic foot ulcer and its impact on disease outcome among Nigerians: Results from the MEDFUN study. Serra R, ed. *PLOS ONE*. 2019;14(12):e0226226.
344. Salvemini D, Cuzzocrea S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3(6):886-895.
345. Huang Z, Zheng X, Liang H, Zhong SY, Meng J, Yao J. Association of Systemic Immune-Inflammatory Index with Risk of Foot Ulcer Amputation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Insights from a Cross-Sectional Study. *J Inflamm Res*. 2025;18:8295-8304.
346. Khandare SA, Chittawar S, Nahar N, Dubey TN, Qureshi Z. Study of Neutrophil-lymphocyte Ratio as Novel Marker for Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017;21(3):387-392.
347. Serban D, Papanas N, Dascalu AM, et al. Significance of Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet Lymphocyte Ratio (PLR) in Diabetic Foot Ulcer and Potential New Therapeutic Targets. *Int J Low Extrem Wounds*. 2024;23(2):205-216.
348. Vatankhah N, Jahangiri Y, Landry GJ, et al. Predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in diabetic wound healing. *J Vasc Surg*. 2017;65(2):478-483.

349. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
350. Friso S, Udali S, Guarini P, et al. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2013;22(3):348-355.
351. Castro R, Rivera I, Struys EA, et al. Increased Homocysteine and S-Adenosylhomocysteine Concentrations and DNA Hypomethylation in Vascular Disease. *Clin Chem.* 2003;49(8):1292-1296.
352. Sharma P, Kumar J, Garg G, et al. Detection of Altered Global DNA Methylation in Coronary Artery Disease Patients. *DNA Cell Biol.* 2008;27(7):357-365.
353. Baccarelli A, Wright R, Bollati V, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiol Camb Mass.* 2010;21(6):819-828.
354. Lin RT, Hsi E, Lin HF, Liao YC, Wang YS, Juo SH. LINE-1 Methylation is Associated with an Increased Risk of Ischemic Stroke in Men. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(1):4-9.
355. Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk. Bader JS, ed. *PLoS ONE.* 2010;5(3):e9692.
356. Willmer T, Mabasa L, Sharma J, Muller CJF, Johnson R. Blood-Based DNA Methylation Biomarkers to Identify Risk and Progression of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5):2355.
357. Sagy N, Meyrom N, Beckerman P, Pleniceanu O, Bar DZ. Kidney-specific methylation patterns correlate with kidney function and are lost upon kidney disease progression. *Clin Epigenetics.* 2024;16(1):27.
358. Cheng Y, Liu P, Xie G, et al. DNA methylation in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2025;26(1):455.
359. Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Larijani B, Amini M, Keshtkar A. Global DNA methylation as a possible biomarker for diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015;31(2):183-189.
360. Miller RG, Mychaleckyj JC, Onengut-Gumuscu S, Orchard TJ, Costacou T. An Epigenome-Wide Association Study of DNA Methylation and Proliferative Retinopathy over 28 Years in Type 1 Diabetes. *Ophthalmol Sci.* 2024;4(4):100497.
361. Syreeni A, El-Osta A, Forsblom C, et al. Genetic Examination of SETD7 and SUV39H1/H2 Methyltransferases and the Risk of Diabetes Complications in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2011;60(11):3073-3080.
362. Razi FB, Ashraf H, Singhal S, Qamar Z, Moin S. Hyperglycaemia-induced metabolic stress and epigenetic imprinting in the inflammatory pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2026;234:113172.
363. Sanusi KO, Asiwe JN, Sulaimon FA, Bashar F, Yusuf SK, Abdulkadir HO. Diabetic neuropathy and wound healing: An update on epigenetic crosstalk. *World J Diabetes.* 2025;16(11):110428.

364. Guo K, Elzinga S, Eid S, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of human diabetic peripheral neuropathy in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics*. 2019;14(8):766-779.
365. Kwiatkowska KM, Garagnani P, Bonafé M, et al. High-Resolution Whole-Genome DNA Methylation Revealed Unique Signatures of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes*. 2025;74(4):640-650.
366. Park LK, Maione AG, Smith A, et al. Genome-wide DNA methylation analysis identifies a metabolic memory profile in patient-derived diabetic foot ulcer fibroblasts. *Epigenetics*. 2014;9(10):1339-1349.
367. Bauer TM, Moon JY, Shadiow J, Buckley SD, Gallagher KA. Mechanisms of Impaired Wound Healing in Type 2 Diabetes: The Role of Epigenetic Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2025;45(5):632-642.
368. García-Giménez JL, Seco-Cervera M, Tollefsbol TO, et al. Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(7-8):529-550.
369. Zeljkovic A, Mihajlovic M, Vujcic S, et al. The Prospect of Genomic, Transcriptomic, Epigenetic and Metabolomic Biomarkers for The Personalized Prevention of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2023;21(3):185-196.
370. Ruskovska T, Bernlohr DA. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *J Proteomics*. 2013;92:323-334.

## 8. BIOGRAFIJA

Sanja Vujčić rođena je 14. oktobra 1993. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Branko Ćopić“ završila je kao đak generacije i nosilac diplome „Vuk Stefanović Karadžić“, a „XIII beogradsku gimnaziju“ sa odličnim uspehom. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu (smer magistar farmacije – medicinski biohemičar) završila je 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,39. Tokom studija bila je dobitnik Godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta za najbolje studente, kao i stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Zadužbine „Dragoljub Marinković“.

Doktorske akademske studije, modul Medicinska biohemija, upisala je 2017. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položila sve predviđene predmete sa prosečnom ocenom 9,91.

Specijalističke akademske studije na studijskom programu Biohemijska dijagnostika upisala je 2019. a završila 2021. godine sa prosečnom ocenom 9,90.

Od aprila 2018. do novembra 2022. godine bila je angažovana kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175035, pod nazivom: Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri. Takođe, učestvovala je u međunarodnom projektu bilateralne saradnje Republike Srbije i Crne Gore.

Kao autor i koautor publikovala je 17 radova u međunarodnim i 2 rada u domaćim stručnim časopisima, a učestvovala je i na brojnim nacionalnim i međunarodnim stručnim skupovima. Rezultati istraživanja iz ove teze publikovani su u okviru dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21).

U periodu od novembra 2019. do novembra 2022. godine bila je zaposlena kao asistent za užu naučnu oblast Medicinska biohemija na Katedri za medicinsku biohemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Od novembra 2022. godine zaposlena je u kompaniji PPD Serbia d.o.o. kao lokalni koordinator kliničkih ispitivanja, dok od aprila 2024. godine radi na poziciji asistenta saradnika u kliničkim ispitivanjima.

Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije, Srpskog biohemijskog društva i EFLM Akademije.

## Publikovani radovi koji čine sastavni deo doktorske disertacije

1. **Vučjić S**, Kotur-Stevuljević J, Vekić J, Perović-Blagojević I, Stefanović T, Ilić-Mijailović S, Koprivica Uzelac B, Bosić S, Antonić T, Guzonjić A, Mastilović AM, Marković Z, Rizzo M. Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in Patients with Diabetic Foot. *Medicina (Kaunas)* 2022; 58(12):1866; DOI: 10.3390/medicina58121866. (IF<sub>2022</sub>= 2,6 rang časopisa M21 u kategoriji Medicine, General & Internal)
2. **Vujčić S**, Kotur-Stevuljević J, Vujčić Z, Stojanović S, Beljić Zivković T, Vuksanović M, Marjanović Petković M, Perović Blagojević I, Koprivica-Uzelac B, Ilić-Mijailović S, Rizzo M, Zeljković A, Stefanović T, Bosić S, Vekić J. Global DNA Methylation in Poorly Controlled Type 2 Diabetes Mellitus: Association with Redox and Inflammatory Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2025; 26(14):6716; DOI: 10.3390/ijms26146716. (IF<sub>2025</sub> = 4,9 rang časopisa M21 u kategoriji Biochemistry & Molecular Biology)