

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**

На седници Наставно-научног већа Фармацеутског факултета, одржаној 14.05.2026. именована је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом **„Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“**, магистра фармације – медицинског биохемичара Сање Вујчић, докторанда на Катедри за медицинску биохемију, у следећем саставу:

1. Др сц. Александра Зељковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, председник Комисије (Ужа научна област: Медицинска биохемија)
2. Др сц. Ана Нинић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Медицинска биохемија)
3. Др сц. Ива Перовић Благојевић, научни сарадник, Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић – Дедиње“ (Ужа научна област: Медицинска биохемија)

Ментори докторске дисертације су:

1. Др сц. Јелена Векић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Медицинска биохемија)
2. Др сц. Миљанка Вуксановић, доцент, Универзитет у Београду – Медицински факултет (Ужа научна област: Интерна медицина – ендокринологија)

Чланови Комисије су прегледали приложену дисертацију и подносе Наставно-научном већу Фармацеутског факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Садржај докторске дисертације

Докторска дисертација написана је на 163 стране, садржи 63 табеле, 32 слике и 370 литературних навода. Садржај дисертације подељен је на поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Референце.

У **Уводу** дисертације описан је јавно-здравствени значај типа 2 дијабетес мелитуса (Т2ДМ), укључујући факторе ризика за развој, епидемиолошке податке и детаљан опис етиопатогенезе. Посебан осврт дат је на клинички профил и механизам развоја

микроваскуларних компликација: дијабетесне нефропатије (ДНФ), ретинопатије (ДР), неуропатије (ДН) и синдрома дијабетесног стопала (ДС), као и на клинички профил макроваскуларних компликација, са акцентом на кардиоваскуларне болести (КВБ), које представљају водећи узрок морбидитета и морталитета код пацијената са Т2ДМ. Затим су детаљно размотрени савремени концепти који објашњавају улогу оксидативног стреса, крајњих продуката неензимске гликације, инфламације ниског степена и дислипидемије у развоју компликација. У наставку је образложена улога епигенетских модификација, а затим су детаљно описани механизам и значај метилације ДНК, као и концепт метаболичке меморије, који пружа оквир за разумевање дугорочних последица неадекватне метаболичке контроле. На крају, дат је преглед савремених методолошких приступа у анализи глобалне и диференцијалне метилације ДНК.

Након уводног прегледа литературе, јасно су дефинисани предмет истраживања и **циљеви** дисертације. Први циљ ове дисертације био је увођење и оптимизација методе високоефикасне течне хроматографије са фотодиодном детекцијом (енгл. *ultra-high performance liquid chromatography with diode array detection, UHPLC-DAD*) за квантификацију 5-метилцитозина (5mC) у ДНК изолованој из моноклеарних ћелија периферне крви (енгл. *peripheral blood mononuclear cells, PBMC*). Наредни циљеви односили су се на испитивање разлике у степену глобалне метилације ДНК, параметрима редокс статуса, инфламаторним маркерима и липопротеинском профилу између пацијената са Т2ДМ и здравих испитаника, као и на евалуацију њихове међусобне повезаности. Додатни циљ био је испитивање разлике у наведеним биомаркерима у зависности од присуства хроничних компликација, те утврђивање кардиометаболичких фактора ризика који утичу на степен глобалне метилације ДНК код пацијената са Т2ДМ.

У поглављу **Материјал и методе** описане су карактеристике испитиваних група, примењени биолошки материјали, аналитичке методе и статистички тестови. У истраживање је укључено 107 пацијената са Т2ДМ из три здравствене установе: Клиничко-болничког центра „Звездара“, Клиничко-болничког центра „Др Драгиша Мишовић – Дедиње“ и Опште болнице у Пожаревцу. Контролна група (КГ) формирана је од 56 здравих добровољаца. Сви пацијенти имали су претходно потврђену дијагнозу Т2ДМ. Критеријуми за искључивање били су: присуство аутоимунских, малигних и хематолошких обољења, тешка бубрежна инсуфицијенција, болести јетре, акутна инфламаторна обољења, актуелна или прележана *COVID-19* инфекција. Демографски подаци прикупљени су путем упитника, а клинички подаци добијени од надлежних лекара.

Истраживање је планирано и спроведено поштујући етичке принципе Хелсиншке декларације, а сви учесници дали су добровољни писани информисани пристанак након упознавања с циљевима и протоколом истраживања. Истраживање је одобрено од стране

надлежних Етичких одбора свих укључених здравствених установа: Клиничко-болничког центра „Звездара“ (одлука од 15.10.2020.), Клиничко-болничког центра „Др Драгиша Мишовић – Дедиње“ (одлука бр. 01-5656/24, од 24.04.2019.) и Опште болнице у Пожаревцу (одлука бр. 7190/2020 од 30.12.2020.), као и Етичког комитета за биомедицинска истраживања Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета (одлука бр. 2566/3 од 19.11.2024.).

Као биолошки материјал коришћена је пуна венска крв, из које су издвојени серум, плазма и *PВМС*. Свим испитаницима одређени су параметри метаболичке контроле: концентрација глукозе стандардном ензимском методом, удео гликохемоглобина (*HbA_{1c}*) имунотурбидиметријском методом, те концентрација крајњих продуката узнапредовале гликације (енгл. *advanced glycation end-products, AGE*) спектрофлуориметријском методом. Концентрације укупних протеина, албумина, урее и креатинина су одређиване комерцијалним тестовима на аутоматском анализатору.

Параметри редокс статуса одређени су оптимизованим спектрофотометријским методама на аутоматском биохемијском анализатору и обухватили су прооксидативне биомаркере: продукте узнапредовале оксидације протеина (енгл. *advanced oxidation protein products, AOPP*), тотални оксидативни статус (енгл. *total oxidant status, TOS*), прооксидативно-антиоксидативни баланс (енгл. *prooxidant-antioxidant balance, PAB*), исхемијом модификован албумин (енгл. *ischemia-modified albumin, IMA*) и малондиалдехид (енгл. *malondialdehyde, MDA*), као и биомаркере антиоксидативне заштите: активност ензима параоксоназе 1 (енгл. *paraoxonase 1, PON1*) и супероксид-дисмутазе (енгл. *superoxide dismutase, SOD*), тотални антиоксидативни статус (енгл. *total antioxidant status, TAS*) и укупне сулфхидрилне групе (енгл. *sulfhydryl groups, SH*-групе).

Од биомаркера системске инфламације одређивана је концентрација *C*-реактивног протеина имунотурбидиметријском методом високе осетљивости (енгл. *high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP*) на биохемијском анализатору и параметри комплетне крвне слике на аутоматском хематолошком анализатору. На основу апсолутних бројева леукоцитних субпопулација и укупног броја тромбоцита израчунат је панел композитних инфламаторних индекса: однос броја неутрофила и лимфоцита (енгл. *neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR*), однос броја неутрофила и укупног броја леукоцита (енгл. *neutrophil-to-white blood cell ratio, NWR*), однос броја моноцита и лимфоцита (енгл. *monocyte-to-lymphocyte ratio, MLR*), однос броја моноцита и укупног броја леукоцита (енгл. *monocyte-to-white blood cell ratio, MWR*), однос броја лимфоцита и укупног броја леукоцита (енгл. *lymphocyte-to-white blood cell ratio, LWR*), као и однос броја тромбоцита и лимфоцита (енгл. *platelet-to-lymphocyte ratio, PLR*). Надаље, одређени су индекс системског инфламаторног одговора (енгл. *systemic inflammation response index, SIRI*), као умножак броја неутрофила и моноцита подељен бројем лимфоцита, системски имуно-

инфламаторни индекс (енгл. *systemic immune-inflammation index, SII*), као умножак броја тромбоцита и броја неутрофила подељен бројем лимфоцита и свеобухватна имуно-инфламаторна вредност, (енгл. *pan-immune-inflammation value, PIV*) као умножак броја неутрофила, тромбоцита и моноцита подељен бројем лимфоцита.

Од липидних параметара одређене су концентрације укупног холестерола (енгл. *total cholesterol, TC*), холестерола у липопротеинима високе густине (енгл. *high-density lipoprotein cholesterol, HDL-h*) и триглицерида (енгл. *triglycerides, TG*) стандардним ензимским методама на аутоматском биохемијском анализатору. Концентрација холестерола у липопротеинима ниске густине (енгл. *low-density lipoprotein cholesterol, LDL-h*) израчуната је *Friedewald*-овом једначином, а *non-HDL-h* из разлике концентрација укупног и *HDL-h*. Активности лецитин-холестерол ацилтрансферазе (енгл. *lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT*) и холестерол-естар трансферног протеина (енгл. *cholesteryl ester transfer protein, CETP*) одређене су кинетичким методама заснованим на праћењу кинетике естерификације холестерола и његовог трансфера између липопротеинских честица. Расподела *LDL* и *HDL* субфракција анализирана је методом вертикалне електрофорезе на неденатуришућем градијент (3-31%) гелу полиакриламида. Овом методом су одређени дијаметри и релативни удели четири *LDL* (*LDL I, II, III* и *IV*) и пет *HDL* субфракција (*HDL2b, 2a, 3a, 3b* и *3c*).

Одређивање степена глобалне метилације ДНК, изражене као удео *5mC* у укупном цитозину ДНК, обухватало је 5 фаза: изоловање *PBMC* из леукоцитног слоја, екстракцију геномске ДНК, проверу интегритета и квантификацију ДНК, ензимску хидролизу применом комерцијалног комплекса *DNA Degradase Plus™*, те саму квантификацију *5mC* и 2'-деоксицитидина (*dC*) оптимизованом *UHPLC-DAD* методом.

Статистичка анализа спроведена је у софтверском пакету *PASW Statistics 18* (*PASW Statistics*, Чикаго, САД), при нивоу статистичке значајности $p < 0,05$. Нормалност расподеле континуираних варијабли процењена је *Shapiro-Wilk* тестом. За анализирање разлика између посматраних група коришћен је *Student*-ов *t*-тест или *Mann-Whitney U* тест, односно једнофакторска анализа варијансе (енгл. *analysis of variance, ANOVA*) или *Kruskal-Wallis* тест, у зависности од типа расподеле података. Категоричке варијабле анализиране су *Chi*-квадрат тестом и *Fisher*-овим тестом. Корелације између варијабли анализиране су *Spearman*-овом корелационом анализом. За испитивање повезаности између анализираних параметара коришћена је мултиваријантна линеарна регресиона анализа. Дијагностичка тачност и дискриминативна способност параметара и модела процењене су анализом *ROC* криве (енгл. *receiver operating characteristic*), при чему су вредности површине испод криве (енгл. *area under the curve, AUC*) интерпретиране према *Hosmer-Lemeshow* критеријумима. Анализом главних компоненти (енгл. *principal component analysis, PCA*)

екстраховани су фактори, чија је повезаност са хипометилацијом геномске ДНК испитана применом бинарне логистичке регресионе анализе.

У првом делу поглавља **Резултати** детаљно је описана оптимизација *UHPLC-DAD* методе. Анализирани су параметри интегритета и чистоће геномске ДНК, наведени су оптимизовани услови ензимске хидролизе у погледу односа ензима и ДНК, времена и температуре инкубације. Приказани су параметри валидације методе: утврђени лимити детекције и квантификације, прецизност унутар и између серија, селективност и специфичност методе. Представљене су одговарајуће калибрационе криве и резултати анализе степена глобалне метилације ДНК у реалним узорцима.

У наставку су приказане демографске и клиничке карактеристике пацијената и КГ, уз анализу разлика у биохемијским и хематолошким параметрима између група. Такође су анализирани терапијски приступи и учесталост хроничних компликација у испитиваној групи пацијената са Т2ДМ. Потом су анализирани параметри метаболичке контроле, редокс статуса, хроничне инфламације и липидног профила у обе групе испитаника.

У наредном делу поглавља Резултати приказана је анализа степена глобалне метилације ДНК код пацијената са Т2ДМ и КГ, те испитана њена варијабилност унутар Т2ДМ групе у односу на пол, индекс телесне масе (ИТМ), трајање Т2ДМ, пушачки статус, присуство артеријске хипертензије, постигнуту метаболичку контролу, липидни статус и примењену терапију. Корелационом анализом испитана је повезаност степена глобалне метилације ДНК са демографским и клиничким карактеристикама (старост, обим струка, ИТМ, систолни и дијастолни притисак), као и са параметрима метаболичке контроле, редокс статуса, инфламације и липидног профила.

У следећем одељку приказани су резултати анализе параметара метаболичке контроле, редокс статуса, инфламације и липидног профила у зависности од присуства појединачних хроничних компликација Т2ДМ (КВБ, ДНФ, ДР, ДН и ДС). Такође су приказани резултати корелационе анализе, као и процене дијагностичке тачности испитиваних параметара у предвиђању сваке од наведених компликација.

Затим су приказани резултати анализе степена глобалне метилације ДНК у односу на присуство појединачних компликација Т2ДМ, као и дијагностичка тачност овог епигенетског биомаркера у њиховом предвиђању. Такође су детаљно приказани резултати корелационе анализе, који омогућавају сагледавање повезаности параметара редокс статуса, инфламације и дислипидемије са степеном глобалне метилације ДНК унутар сваке групе пацијената са компликацијама.

Напослетку су приказани резултати *РСА* анализе која је омогућила идентификацију кардиометаболичких фактора ризика са значајним утицајем на степен глобалне метилације ДНК.

У поглављу **Дискусија** свеобухватно су размотрени добијени резултати у светлу актуелних литературних налаза, након чега су изведени одговарајући **Закључци**.

Б. Опис добијених резултата

У оквиру ове докторске дисертације уведена је и оптимизирана реверзно-фазна *UHPLC-DAD* метода за одређивање степена глобалне метилације ДНК. У односу на полазну методу описану у литератури, модификацијом хроматографских услова постигнуто је скраћење аналитичког циклуса. Претходно је оптимизиран и поступак припреме узорка, који је обухватио протокол изолације *PBMC* и услове ензимске хидролизе, укључујући однос ензимског комплекса и ДНК, време инкубације и потребну количину ДНК по узорку. Валидација *UHPLC-DAD* методе је спроведена у складу са међународним смерницама, при чему је постигнута оптимална линеарност. Селективност и специфичност потврђене су потпуним раздвајањем свих дезоксирибонуклеозида ДНК и анализом спектралне чистоће пикова, док је прецизност методе показана коефицијентом варијације < 5% за ретенциона времена и површине пикова. На основу утврђених лимита детекције и квантификације потврђена је одговарајућа осетљивост и клиничка применљивост методе.

Анализа демографских карактеристика је показала већу заступљеност мушкараца, старијих и гојазних испитаника, као и пушача у групи пацијената са Т2ДМ у односу на КГ. Пацијенти су имали значајно више концентрације урее, мокраћне киселине и креатинина, уз ниже вредности јачине гломеруларне филтрације, као и повећан број леукоцита, неутрофила и моноцита. Медијана трајања болести износила је 10 година, а већина пацијената имала је неадекватну метаболичку контролу и као терапију користила метформин и/или инсулин, док је мањи број користио *SGLT2* (енгл. *sodium/glucose cotransporter 2*) и *DPP4* (енгл. *dipeptidyl peptidase-4*) инхибиторе, као и статине. Анализа учесталости хроничних компликација показала је најмање један облик васкуларног оштећења код приближно две трећине пацијената и већу учесталост микроваскуларних компликација. Најзаступљенија компликација била је ДН (47,7%) праћена ДНФ (15,9%) и ДР (7,5%), док је учесталост синдрома ДС износила 23,4%.

Пацијенти су имали значајно ниже концентрације *HDL-h*, а више концентрације *TG*. Иако су концентрације *TC*, *LDL-h* и *non-HDL-h* биле ниже него у КГ, свега 10,3% пацијената достигло је циљну концентрацију *LDL-h* < 1,4 mmol/L. Није било разлике у активности ензима *LCAT* и *CETP*. Анализа липопротеинских субфракција у групи са Т2ДМ указала је на повољнији профил *LDL* честица (већи удео *LDL I* и *II*, а мањи удео *LDL III* и *IV*), уз неповољнији профил *HDL* честица, са смањеним уделом *HDL2b* и

доминацијом мањих, гушћих субфракција. Поред тога, пацијенти су имали значајно више вредности прооксидативних параметара *TOS*, *PAB*, *IMA* и *AOPP*, уз значајно снижене параметаре антиоксидативне заштите *PON1*, *TAS* и *SH*-групе. Такође су забележене и значајно више концентрације *hsCRP* и вредности инфламаторних индекса *NLR*, *MLR*, *MWR*, *SII*, *SIRI* и *PIV*, уз ниже вредности *LWR* индекса.

Централни налаз овог истраживања представља значајно смањење степена глобалне метилације ДНК код пацијената са Т2ДМ. Надаље, анализа је показала да је једино трајање болести дуже од 10 година имало значајан утицај на степен метилације ДНК, док остали испитивани демографски и клинички фактори нису показали значајну повезаност. Додатно, утврђена је негативна корелација удела *5mC* са концентрацијама *hsCRP* и вредностима *PLR*, а позитивна корелација са концентрацијама *TOS*, *TAS*, *AOPP* и *TG*. У КГ удео *5mC* је позитивно корелирао са уделом *HbA_{1c}*, *HDL2b* и *LDL IV* субфракција, а негативно са активношћу *CETP* и концентрацијом *TOS*.

У наставку је испитан утицај хроничних компликација на вредности параметара метаболичке контроле, редокс статуса, инфламације и дислипидемије. Поред тога, спроведена је корелациона анализа испитиваних параметара, као и анализа дијагностичке тачности одабраних параметара за сваку од појединачних компликација. У односу на КГ, код пацијената са КВБ, ДНФ, ДР, ДН и ДС конзистентно се уочавао поремећај метаболичке контроле, изражен редокс дисбаланс и појачана системска инфламација. Липидни профил је у већини група био окарактерисан сниженим концентрацијама *TC*, *LDL-h*, *HDL-h* и *non-HDL-h*, уз повећање концентрације *TG*. Поред тога, уочене су значајне промене у профилу липопротеинских субфракција, које су се огледале у смањењу дијаметра *HDL* честица и удела већих, атеропротективних *HDL2b* субфракција, уз померање дистрибуције ка мањим и гушћим *HDL* честицама. Истовремено, промене у расподели *LDL* субфракција указивале су на смањен удео малих густих *LDL* честица (енгл. *small dense LDL*, *sdLDL*). Упркос бројним заједничким обележјима, појединачне компликације Т2ДМ испољиле су и специфичне карактеристике. Конкретно, код пацијената са КВБ забележена је изражена оксидативна и инфламаторна активност, при чему су *hsCRP*, *AOPP* и *TOS* издвојени као најпоузданији предиктори ове компликације. У случају ДНФ, најбољу дискриминативну способност показали су *AOPP* и *hsCRP*. Присуство ДР је било повезано са израженијим повећањем *AGE* у односу на пацијенте без ове компликације, а као најпоузданији маркер за предвиђање ДР издвојен је *AOPP*. Код пацијената са ДН утврђена је значајно нижа активност *CETP* у односу на КГ, као и померање дистрибуције *HDL* субфракција ка већим честицама у поређењу са пацијентима без ове компликације. Анализа дијагностичке тачности издвојила је *hsCRP* и *AOPP* као најпоузданије биомаркере за предвиђање ДН. Најизраженије промене забележене су код пацијената са ДС, где су повишене вредности *NLR* и *PAB* идентификоване као независни предиктори ове компликације, док је њихова комбинована примена у моделу додатно

унапредила дијагностичку тачност предвиђања ДС. Корелациона анализа је показала да у свакој групи са компликацијама постоји значајна повезаност између параметара оксидативног стреса, инфламације и липидног статуса, што указује на међусобну повезаност наведених процеса током развоја компликација.

Анализа степена глобалне метилације ДНК у односу на присуство хроничних компликација показала је изражену хипометилацију ДНК код свих група пацијената са компликацијама у поређењу са КГ, осим код пацијената са ДР. Међусобно поређење пацијената са и без појединачних компликација није показало значајне разлике у степену глобалне метилације ДНК, изузев код синдрома ДС, где је утврђен значајно нижи удео *5mC* у односу на пацијенте без ове компликације. Корелациона анализа указала је на доследну негативну повезаност степена глобалне метилације ДНК са вредностима *PAB* у свим групама пацијената са компликацијама. Осим тога, уочене су значајне корелације између степена метилације ДНК и параметара редокс статуса, инфламације и липидног профила, које су биле најизраженије код пацијената са ДС и ДН. Највећи број значајних корелација забележен је у групи са ДС, где је нижи степен метилације био повезан са израженијим оксидативним стресом и инфламацијом, што указује на потенцијалну улогу епигенетских механизма у развоју и прогресији ове компликације.

Даља анализа обухватила је процену дијагностичке тачности степена глобалне метилације ДНК, као биомаркера епигенетских модификација, у предвиђању хроничних компликација Т2ДМ. Степен глобалне метилације ДНК показао је највећу дијагностичку тачност у предикцији ДС, док је за ДН постигнута висока осетљивост, уз ниску специфичност. Дијагностичка тачност за ДНФ није била задовољавајућа, а за КВБ и ДР је била ограничена. Интеграција степена глобалне метилације ДНК са редокс параметрима *PAB* и *SOD* у мултимаркерски модел значајно је унапредила дијагностичку тачност у предвиђању ДС.

Да би се сагледала повезаност епигенетских промена са општим метаболичким статусом, анализирале су корелације између степена глобалне ДНК метилације и биомаркера инфламације и редокс статуса у укупној испитиваној популацији. Нижи степен глобалне метилације ДНК корелирао је са вишим концентрацијама инфламаторних маркера *hsCRP* и *MLR* и параметара оксидативног стреса *PAB*, *IMA* и *AOPP*, те нижим вредностима параметара антиоксидативне заштите *TAS* и *SH*-група. Мултиваријантном линеарном регресионом анализом је утврђено да старост има негативан, док концентрације *TAS* и *SH*-група имају позитиван независан утицај на степен глобалне метилације ДНК.

У оквиру ове докторске дисертације посебна пажња посвећена је идентификацији фактора који утичу на смањење степена глобалне ДНК метилације код пацијената са Т2ДМ. У том смислу, примена *PCA* анализе омогућила је издвајање пет кластера

кардиометаболичких фактора ризика, чиме су дефинисани доминантни патофизиолошки механизми у испитиваној групи пацијената са Т2ДМ. Ова анализа је издвојила „проинфламаторни фактор“, који обједињује показатеље системске инфламације (*hsCRP*, *NLR*) и оксидативног стреса (*PAB*, *IMA*, *SOD*), „прооксидативни фактор“ кроз удруживање *TOS*, *AOPP* и ИТМ, „фактор старења“ који укључује старост и трајање дијабетеса, „хипергликемијски фактор“ ког су формирали глукоза, *AGE* и пол, те „антиоксидативни фактор“ који је обухватио *SH*-групе. Примена мултимаркерског приступа у бинарној логистичкој регресионој анализи идентификовала је „прооксидативни фактор“ као најзначајнији предиктор, који је повезан са приближно петоструко већим ризиком за глобалну хипометилацију ДНК.

В. Упоредна анализа резултата докторске дисертације са подацима из литературе

У овој докторској дисертацији спроведена је свеобухватна евалуација степена глобалне метилације ДНК и других одабраних параметара оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије као биомаркера прогресије Т2ДМ и развоја васкуларних компликација овог обољења. Додатно, испитана је могућност интеграције епигенетских маркера са класичним биохемијским параметрима у предиктивне и дијагностичке моделе значајне за Т2ДМ. Добијени резултати су у значајној мери у сагласности са литературним налазима, уз одређена одступања која доприносе унапређењу и проширењу постојећих сазнања у овој области.

Током израде ове докторске дисертације уведена је и оптимизована осетљива, специфична и селективна *UHPLC-DAD* метода за истовремено одређивање *dC* и *5mC*, чиме је омогућена прецизна квантификација степена глобалне ДНК метилације у *PBMC*. Примењена *UHPLC-DAD* метода представља адаптацију протокола *Crescentija* и сарадника, који је прилагођен специфичностима узорака коришћених у овом истраживању (1). Избор *PBMC* као биолошког материјала заснован је на њиховој доступности, минимално инвазивном узорковању и доброј корелацији резултата са променама у циљним ткивима (2). Употреба ензимског комплекса *DNA Degradase Plus*TM за хидролизу ДНК до нуклеозида оцењује се као методолошки оправдан избор, будући да је у литератури документовано да класична киселинска хидролиза може довести до губитка лабилних модификованих база (3). Верификација потпуне дигестије одсуством размаза на агарозном гелу представља додатни квалитативни критеријум усклађен са важећим стандардима у овој области (4). Хроматографски приступ, као технички захтевнији, у литератури се наводи као златни стандард због веће поузданости у поређењу са алтернативним методама (5). Као посебан методолошки значај истиче се раздвајање *5mC* од 5-хидроксиметилцитозина, биолошки активног интермедијера у процесу деметилације

ДНК, чиме се овај приступ разликује од бројних претходних студија које нису правилне ову дистинкцију.

Налаз глобалне хипометилације ДНК код испитиваних пацијената са Т2ДМ у сагласности је са резултатима претходних истраживања која су показала смањен степен глобалне метилације ДНК код особа са повишеним концентрацијама глукозе у крви (6), као и постојање инверзне корелације између степена глобалне метилације и удела HbA_{1c} (7). Чињеница да је хипометилација била присутна код свих испитиваних пацијената, без значајних разлика између подгрупа са различитим компликацијама, указује на то да она представља опште епигенетско обележје Т2ДМ, а не биомаркер који је специфичан за појединачне компликације ове болести. Интерпретација добијених резултата у складу је са концептом епигенетске меморије, према коме метаболички поремећаји, као што је дуготрајна изложеност високим концентрацијама глукозе, могу довести до настанка стабилних епигенетских промена, које перзистирају и након успостављања адекватне метаболичке контроле (8). Ипак, треба истаћи да резултати досадашњих истраживања о променама глобалне метилације ДНК код особа са Т2ДМ нису у потпуности конзистентни. Поједини аутори, попут *Pinzón-Cortés* и сарадника, нису утврдили значајну разлику у степену метилације ДНК између пацијената са Т2ДМ и здравих испитаника (9). Оваква неусаглашеност резултата у литератури делом се може приписати примени различитих аналитичких метода за испитивање метилације ДНК, као и хетерогености испитиваних популација пацијената у погледу клиничких карактеристика, трајања болести, степена метаболичке контроле и присуства хроничних компликација (10). Додатно, стандардизоване референтне вредности за удео $5mC$ у здравој популацији још увек нису дефинисане. Поједини аутори наводе просечне вредности од приближно 6% (11), док други аутори наводе ниже просечне вредности, од око 5% (12). У том контексту, примена *UHPLC-DAD* методе у овој дисертацији представља значајну методолошку предност, будући да омогућава добијање резултата који су директно упоредиви са налазима других студија заснованих на хроматографским приступима.

Резултати ове докторске дисертације указују на оксидативни стрес и системску инфламацију као кључне факторе повезане са епигенетским статусом код пацијената са Т2ДМ. То је у складу је описаним механизмима према којима реактивна кисеоникова једињења (енгл. *reactive oxygen species, ROS*) могу инхибирати активност ДНК метилтрансфераза (енгл. *DNA methyltransferases, DNMT*) и истовремено довести до смањења доступности *S*-аденозилметионина, главног донора метил-група у процесу метилације ДНК (13). Стимулативни ефекат *ROS* на *TET* ензиме (енгл. *ten eleven ten translocation*), са последичним повећањем деметилације ДНК, представља додатни механизам посредством кога оксидативни стрес доприноси смањењу удела $5mC$ (14). Паралелно, активирају се сигналне каскаде које резултују појачаном продукцијом проинфламаторних цитокина и инхибицијом активности *DNMT* ензима (15), чиме се

успоставља позитивна повратна спрега у овим процесима. Слична повезаност метилације ДНК и инфламаторних маркера описана је и у истраживању *Cucoreania* и сарадника (16), а резултати ове дисертације ту повезаност додатно потврђују у специфичном клиничком окружењу типичном за Т2ДМ.

У овом истраживању спроведена је опсежна анализа параметара редокс статуса, инфламаторних биомаркера и параметара липидног статуса, уз испитивање расподеле липопротеинских субфракција и активности ензима *LCAT* и *CETP*, као кључних регулатора метаболизма липопротеинских честица у плазми. Пацијенти са Т2ДМ имали су повећане прооксидативне, а снижене антиоксидативне параметре, што је у складу са налазима других аутора који указују на системски редокс дисбаланс у Т2ДМ (17). Одступање од овог обрасца уочено је у случају концентрација *MDA*, маркера липидне пероксидације, што се може објаснити смањеном расположивошћу супстрата услед нижих концентрација холестерола, као и високом реактивношћу овог алдехида са протеинима и нуклеинским киселинама, чиме се смањује његова концентрација у серуму (18). Профил дислипидемије утврђен у групи пацијената одговара фенотипу дијабетесне дислипидемије, који се карактерише сниженим концентрацијама *HDL-h* и повишеним концентрацијама *TG*. Квалитативне промене у структури и функцији липопротеина, које конвенционална евалуација липидног статуса не обухвата (19), потврђене су анализом субфракција. Међутим, нижи удео *sdLDL* честица, као и снижене концентрације *TC* и *LDL-h* код пацијената са Т2ДМ представљају налаз супротан бројним публикованим студијама, што се делом може објаснити повећаном пропустљивошћу ендотела, услед које долази до транслокације *LDL* честица из циркулације у субендотелни простор (20). Додатно објашњење може се довести у везу са терапијским режимом, узимајући у обзир високу заступљеност метформина и инсулина, који могу довести до појачане активности липопротеинске липазе, убрзаног катаболизма липопротеинских честица, као и промена у њиховој величини, што је описана последица инсулинске терапије (21). Анализа *HDL* субфракција потврдила је структурне и функционалне промене ових честица у условима хипергликемије, у складу са публикованим налазима о губитку атеропротективног капацитета дисфункционалних *HDL* честица (22,23). Изостанак значајних разлика у активности *LCAT* и *CETP* у односу на КГ представља налаз супротан подацима из литературе и може бити последица додатних утицаја других фактора на развој дислипидемије код испитиваних пацијената. Анализа инфламаторних маркера потврдила је присуство израженог системског проинфламаторног стања код пацијената са Т2ДМ. У оквиру овог истраживања анализиран је већи број композитних индекса као новијих економичних биомаркера и потврђен је њихов значај за процену системске инфламације и кардиометаболичког ризика.

Посебан допринос ове докторске дисертације представља анализа степена глобалне метилације ДНК у односу на присуство специфичних компликација. Утврђен је налаз

глобалне хипометилације ДНК код свих пацијената са компликацијама у поређењу са КГ, изузев у случају ДР. Наиме, нижи степен глобалне метилације ДНК утврђен је у групи пацијената без ове компликације, док су вредности код пацијената са ДР биле блиске вредностима у КГ. Овај резултат је у складу са публикованим налазима о двофазном обрасцу промене степена метилације ДНК током прогресије ДР, при чему у раним стадијумима доминира глобална хипометилација, док са преласком у пролиферативну фазу ДР хиперметилација одређених локуса може допринети привидној нормализацији степена глобалне метилације ДНК (24,25). Такође, у развоју ДР значајну улогу имају и хистонске модификације, а не само промена у степену метилације ДНК (26), што може објаснити изостанак очекиваног обрасца у овој подгрупи. Иако метилација ДНК није показала задовољавајућу дијагностичку тачност, *AOPP* се издвојио као маркер са највећом тачношћу за предикцију ДР, што потврђује хипотезу да биомаркери оксидативног стреса имају потенцијал у дијагностици и превенцији ДР (29).

Ово истраживање није утврдило значајну разлику у степену глобалне метилације ДНК између Т2ДМ пацијената са и без КВБ. Литературни подаци о глобалној метилацији ДНК у КВБ су хетерогени, што одражава сложеност епигенетских промена и указује да њихов правац зависи од патофизиолошког механизма и стадијума болести. Код пацијената са ДНФ уочено је израженије смањење степена глобалне метилације ДНК у односу на КГ, иако разлика у односу на пацијенте без ове компликације није била статистички значајна. Могуће објашњење лежи у ткивно специфичној природи епигенетских промена, као и ограниченој осетљивости леукоцита периферне крви за детекцију промена у бубрежном ткиву, уз додатни утицај мале величине узорка. Нижи степен глобалне метилације ДНК утврђен је и у групи са ДН, а значајно је корелирао са вишим вредностима параметара редокс статуса и инфламације. Овакав налаз указује на то да у патогенези ДН редокс дисбаланс и хронична инфламација делују синергистички у супресији метилационог капацитета ДНК, што је у складу са публикованим подацима о кључној улози оксидативног стреса у типичном нарушавању регулације епигенетских механизма у овој компликацији (27,28). Најизраженије смањење степена глобалне метилације ДНК забележено је код пацијената са ДС, код којих је уједно утврђена и најснажнија повезаност са биомаркерима оксидативног стреса и инфламације. Тиме је потврђено да у узрапредовалом стадијуму исхемијско-неуропатске болести синергистичко деловање оксидативног стреса, инфламације и ткивне хипоксије додатно супримира процес метилације ДНК (29,30). Такође, треба истаћи да је овај епигенетски биомаркер показао највећу дијагностичку тачност у предикцији ДС, а интеграцијом са *PAB* и *SOD* у мултимаркерски панел укупна дискриминативна способност модела је додатно унапређена, што је у складу са актуелним препорукама о примени мултимаркерских стратегија у персонализованој процени ризика за настанак компликација Т2ДМ (31).

Резултати представљени у овој дисертацији дају значајан допринос у домену методолошке стандардизације и клиничке примене степена глобалне метилације ДНК као маркера епигенетских модификација. Документована хипометилација ДНК, као универзални епигенетски налаз у Т2ДМ, потврђује допринос епигенетског памћења у настанку нежељених последица хроничне хипергликемије. Идентификација прооксидативног фактора као јединог независног предиктора глобалне хипометилације, те валидација мултимаркерског панела за предикцију ДС, представљају конкретне доприносе унапређењу клиничке стратификације ризика код пацијената са Т2ДМ. Одређена одступања у налазима за поједине компликације, нарочито у случају ДР, не умањују научну вредност добијених резултата, већ их смештају у шири оквир сложених епигенетских механизма карактеристичних за ову компликацију, истовремено указујући на потребу за даљим истраживањима у овој области.

Г. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације проверена је у складу са Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду.

Према извештају који је креирао програм *iThenticate* регистровано је 17% преклапања са 334 извора. Преклапање са једним извором износило је 2%, са једним 1%, а са свим осталим појединачним изворима < 1%. Детаљним увидом у материјал утврђено је да је подударност текста последица униформног начина приказивања резултата, стручне терминологије, библиографских података, као и описивања метода, те општих места и података у вези са темом дисертације.

На основу резултата провере сматрамо да је докторска дисертација Сање Вујчић у потпуности оригинална, као и да су поштована академска правила цитирања.

Д. Закључак – образложење научног доприноса докторске дисертације

Епидемиолошки подаци недвосмислено потврђују глобални пандемијски карактер Т2ДМ, који у Републици Србији обухвата око 12% одрасле популације, уз напомену да значајан удео оболелих остаје недијагностикован до клиничке манифестације васкуларних оштећења. Ова дисертација пружа значајан научни допринос кроз свеобухватну анализу значаја епигенетских модификација, оксидативног стреса и системске инфламације у патогенези хроничних компликација Т2ДМ. Централни допринос истраживања

представља идентификација степена глобалне хипометилације ДНК као раног и универзалног биомаркера болести, чија се дијагностичка вредност одржава независно од старости, пола или специфичног типа васкуларне компликације.

Посебну научну вредност истраживања представља примена *UHPLC-DAD* методе високе осетљивости за прецизну квантификацију *5mC*, чиме је постављен висок аналитички стандард у епигенетским истраживањима у нашој популацији. Рад додатно расветљава сложену мрежу интеракција оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије, у оквиру које прооксидативни фактори директно детерминишу степен глобалне хипометилације ДНК. Креирање мултимаркерског панела, који интегрише епигенетски статус и биомаркере редокс статуса, представља оригиналан и методолошки утемељен допринос унапређењу дијагностичке тачности за предвиђање компликација Т2ДМ, међу којима се издваја ДС. Добијени налази имају значајан транслациони потенцијал и могу наћи примену у персонализованом праћењу прогресије Т2ДМ и правовременој превенцији иреверзибилних васкуларних оштећења.

Литература

1. 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.
2. Alexovič M, Uličná C, Sabo J, et al. 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.
3. 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.
4. Armstrong KM, Bermingham EN, Bassett SA, et al. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnol J*. 2011;6(1):113-117.
5. 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.
6. Luttmner R, Spijkerman AM, Kok RM, et al. Metabolic syndrome components are associated with DNA hypomethylation. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(2):e106-e115.
7. Thongsroy J, Mutirangura A. Decreased ALU methylation in type 2 diabetes mellitus patients increases HbA_{1c} levels. *J Clin Lab Anal*. 2023;37(17-18):e24966.
8. Chen Z, Natarajan R. Epigenetic modifications in metabolic memory: what are the memories, and can we erase them? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022;323(2):C570-C582.
9. 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.

10. Olsen AS, Sarras MP, Leontovich A, et al. Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Diabetes*. 2012;61(2):485-491.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, et al. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1533-1554.
15. Yi YS. Functional interplay between methyltransferases and inflammasomes in inflammatory responses and diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7580.
16. 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.
17. Bellanti F, Coda ARD, Trecca MI, et al. Redox imbalance in inflammation: the interplay of oxidative and reductive stress. *Antioxidants*. 2025;14(6):656.
18. Zinellu A, Paliogiannis P, Usai MF, et al. Effect of statin treatment on circulating malondialdehyde concentrations: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319862714.
19. Zhang X, Van Der Vorst EPC. High-density lipoprotein modifications: causes and functional consequences in type 2 diabetes mellitus. *Cells*. 2024;13(13):1113.
20. 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.
21. Dettlaff-Pokora A, Swierczynski J. The molecular mechanisms of metformin's action on blood lipid profile in diabetic patients. *Int J Mol Sci*. 2026;27(10):4635.
22. Mora S, Otvos JD, Rosenson RS, et al. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes*. 2010;59(5):1153-1160.
23. 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.
24. Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Larijani B, et al. Global DNA methylation as a possible biomarker for diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015;31(2):183-189.
25. Miller RG, Mychaleckyj JC, Onengut-Gumuscu S, et al. An epigenome-wide association study of DNA methylation and proliferative retinopathy over 28 years in type 1 diabetes. *Ophthalmol Sci*. 2024;4(4):100497.

26. 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.
27. Singh I, Issar T, Poynten AM, et al. Evaluation of the impact of advanced glycation end-products on peripheral neuropathy outcomes in type 2 diabetes. *Biomedicines*. 2024;12(11):2518.
28. Zhao XW, Yue WX, Zhang SW, et al. Correlation between the accumulation of skin glycosylation end products and the development of type 2 diabetic peripheral neuropathy. *BMC Endocr Disord*. 2022;22(1):106.
29. Razi FB, Ashraf H, Singhal S, et al. Hyperglycaemia-induced metabolic stress and epigenetic imprinting in the inflammatory pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2026;234:113172.
30. Sanusi KO, Asiwe JN, Sulaimon FA, et al. Diabetic neuropathy and wound healing: an update on epigenetic crosstalk. *World J Diabetes*. 2025;16(11):110428.
31. 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.

E. Objavljeni rezultati koji cine deo doktorske disertacije:

1. **Vujčić 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. (IF₂₀₂₂= 2,6; у категорији Medicine, General & Internal (91/328); M21)
2. **Vujcic S**, Kotur-Stevuljevic J, Vujcic Z, Stojanovic S, Beljic Zivkovic T, Vuksanovic M, Marjanovic Petkovic M, Perovic Blagojevic I, Koprivica-Uzelac B, Ilic-Mijailovic S, Rizzo M, Zeljkovic A, Stefanovic T, Bosic S, Vekic 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. (IF₂₀₂₄ = 4,9; у категорији Biochemistry & Molecular Biology (72/320); M21)

Ж. Одлуке локалних Етичких одбора за спровођење истраживања

Истраживање које је спроведено у овој докторској дисертације одобрено је од стране Етичког одбора Клиничко-болничког центра „Звездара“ (одлука од 15.10.2020.), Етичког одбора Клиничко-болничког центра „Др Драгиша Мишовић – Дедиње“ (одлука бр. 01-5656/24, од 24.04.2019.), Етичког одбора Опште болнице у Пожаревцу (одлука бр. 7190/2020 од 30.12.2020.) и Етичког комитета за биомедицинска истраживања Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета (одлука бр. 2566/3 од 19.11.2024.).

3. Мишљење и предлог

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом „Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“ докторанда Сање Вујчић, Комисија сматра да је ова докторска дисертација урађена према одобреној пријави, да је оригинално и самостално научно дело и да су се стекли услови за њену јавну одбрану.

Истраживање је методолошки прецизно конципирано, а добијени резултати су систематично анализирани и критички сагледани у односу на актуелна достигнућа савремене научне литературе. Изведени закључци у потпуности произилазе из резултата истраживања. Имплементација *UHPLC-DAD* методе за квантификацију степена глобалне метилације ДНК, свеобухватна евалуација епигенетског профила оболелих од Т2ДМ у контексту редокс статуса, системске инфламације и липидног статуса, те идентификација оксидативног стреса као примарног предиктора хипометилације ДНК сврставају ову дисертацију међу истраживања од вишеструког методолошког и клиничког значаја. Посебно значајан допринос огледа се у верификацији дијагностичког потенцијала степена глобалне метилације ДНК за предикцију дијабетесног стопала, као и оригиналној интеграцији епигенетских маркера у мултимаркерске панеле, чиме се значајно унапређује процена ризика. Наведени налази указују на потенцијал за увођење овог епигенетског биомаркера у оквиру персонализованог приступа Т2ДМ. Укупно узевши, резултати ове дисертације доприносе проширењу постојећих знања у области медицинске биохемије и ендокринологије, те поседују потенцијал за практичну примену у унапређењу дијагностичких и прогностичких стратегија у клиничкој пракси.

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у оквиру два научна рада у међународним часописима категорије M21, што потврђује научни квалитет и допринос спроведеног истраживања.

На основу свега изложеног, Комисија сматра да докторска дисертација испуњава све критеријуме прописане Законом о високом образовању и правилницима Универзитета у Београду за стицање академског назива доктора наука. Стога предлажемо Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета да прихвати овај извештај и упути га Већу научних области медицинских наука ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације под називом „Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“, докторанда магистра фармације – медицинског биохемичара Сање Вујчић.

У Београду
08.06.2026.



Др сц. Александра Зељковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
(Ужа научна област: Медицинска биохемија)



Др сц. Ана Нинић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
(Ужа научна област: Медицинска биохемија)



Др сц. Ива Перовић Благојевић, научни сарадник
Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић – Дедиње“
(Ужа научна област: Медицинска биохемија)