

Факултет Фармацеутски

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

01 број 2260 /1-1
(Број захтева)Већу научних области медицинских наука
(Назив већа научне области коме се захтев упућује)10.09.2026.
(Датум)**ЗАХТЕВ**

за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовању комисије за одбрану

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

КАНДИДАТ САЊА (ЗОРАН) ВУЈЧИЋ
(име, име једног од родитеља и презиме)студент докторских студија на студијском програму ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ, ФАРМАЦЕУТСКЕ НАУКЕ, МЕДИЦИНСКА БИОХЕМИЈА

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“из научне области: МЕДИЦИНСКА БИОХЕМИЈАУниверзитет је дана 28.01.2025.године својим актом под бр. 02-01 број 61206-271/2-25 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:**„Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“**Име и презиме ментора :
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)Комисија за оцену докторске дисертације именована је на седници одржаној 14.05.2026.године одлуком факултета под бр. 01 бр.1059/2 , у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
---------------------------------	-------	---------------	---------------------------------

1. Др сц. Александра Зељковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (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)

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности: 18.06.2026.године.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације наследници одржаној дана 10.09.2026.године.

Комисија за одбрану докторске дисертације именована је на седници одржаној 14.05.2026.године

одлуком факултета под бр. 01 број 1059/2, у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1. <u>Др сц. Александра Зељковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Медицинска биохемија)</u>			
2. <u>Др сц. Ана Нинић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Медицинска биохемија)</u>			
3. <u>Др сц. Ива Перовић Благојевић, научни сарадник, Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић –Дедиње“ (Ужа научна област: Медицинска биохемија)</u>			

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

- Прилози:
1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације
 2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
 3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
11000 - БЕОГРАД
Ул. Војводе Степе 450.
01. број 2260/1
10.09.2026. године

На основу члана 28. Статута и предлога Комисије за последипломске студије – докторске студије, Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета на седници одржаној 10.09.2026.године, донело је

О Д Л У К У

ПРИХВАТА СЕ позитиван извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата **маг. фарм. - мед. биохем. Сање Вујчић** под насловом: **„Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“** и упућује Већу научних области медицинских наука на усвајање, а по добијеној писаној сагласности одобрава јавна одбрана пред Комисијом у саставу:

1. Др сц. Александра Зељковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (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)

Универзитет је дана 28.01.2025.године својим актом бр.: 02-01 бр: 61206-271/2-25 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Кандидат маг. фарм. - мед. биохем. Сања Вујчић, објавила је резултате из ове докторске дисертације у два рада категорије M21 у међународним часописима са СЦИ листе:

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.
IF(2022) = 2,6; 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.

IF(2024) = 4,9; Biochemistry & Molecular Biology (72/320) M21

Одлуку доставити: кандидату, Универзитету, члановима комисије, декану, секретару, продекану за последипломске студије, Одсеку за наставу и студентска питања, менторима (Проф. др Јелени Векић и Доц. др Миљанки Вуксановић), Одсеку за правне и опште послове, пословном секретару, председнику Комисије за последипломске студије – докторске студије (Проф. др Биљана Антонијевић) и архиви.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ФАРМАЦЕУТСКОГ
ФАКУЛТЕТА**

**Проф. др Наташа Богавац
Станојевић**

**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

микрооваскуларних 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 *PBMC*. Свим испитаницима одређени су параметри метаболичке контроле: концентрација глукозе стандардном ензимском методом, удео гликохемоглобина (*HbA_{1c}*) имунотурбидиметријском методом, те концентрација крајњих продуката узапредовале 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 узапредовале 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 оптимизована 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 оптимизован 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 профилима 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, анализиране 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™* 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 правиле 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 *Cuoreania* 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 узраставању 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. Alexović 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. 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.
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. Објављени резултати који чине део доктрске дисертације:

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

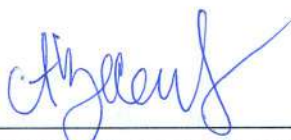
На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом „Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“ докторанда Сање Вујчић, Комисија сматра да је ова докторска дисертација урађена 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 предлагемо 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)

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У складу са чланом 20. Правилника о докторским академским студијама Факултет је извршио проверу оригиналности докторске дисертације под називом „Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије”, аутора магистра фармације – медицинског биохемичара Сање Вујчић, софтверским програмом који обезбеђује Универзитет.

У извештају који је креирао програм *iThenticate* регистровано је 17% преклапања са 334 извора, са чиме су упознати чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације проф. др Александра Зељковић, проф. др Ана Нинић и др сц. Ива Перовић Благојевић.

Након детаљног разматрања целокупног извештаја дато је следеће образложење:

- 2% подударања са извором број 1 - *Bojanin, Dragana. "Early lipid and inflammatory markers of atherosclerosis in children with type 1 diabetes mellitus: effects of metabolic control and comorbidities", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2020* јавило се због тога што су оба истраживања проучавала биомаркере дислипидемије и инфламације у дијабетес мелитусу, услед униформног начина приказивања резултата и изражавања приликом описивања резултата, међутим у поменутом извору су испитивани педијатријски пацијенти са типом 1 дијабетес мелитуса и анализирани су други маркери инфламације
- 1% подударања са извором број 2 - *Gojković, Tamara. "The importance of cholesterol synthesis and absorption markers determination in healthy subjects and patients with ischemic heart disease.", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2018* јавило се због тога што су оба истраживања проучавала биомаркере дислипидемије, услед описивања методологије (коришћење расположиве апаратуре, реагенаса и софтвера), коришћења скраћеница и униформног приказивања резултата и начина изражавања приликом описивања резултата, међутим у поменутом извору су испитиване здраве особе и пацијенти са кардиоваскуларним болестима и анализирани су и други маркери дислипидемије
- < 1% подударања је пронађено са 332 извора услед употребе терминологије и униформног начина изражавања при приказивању поступака и тумачењу резултата наведених у овој докторској дисертацији.

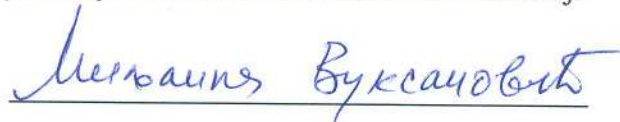
Узимајући у обзир све наведено, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

21.05.2026. године

Ментори:



др сц. Јелена Векић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
ужа научна област: медицинска биохемија



др сц. Миљанка Вуксановић, доцент
Универзитет у Београду – Медицински факултет
ужа научна област: ендокринологија – интерна медицина

»Zvezdara« - University Medical Center
Office for Human Research Protections I
Zvezdara University Medical Center IRB#1 (renewed) No IRB00009457, IORG0007877
Approved by Federalwide Assurance - FWA00024180

Etički odbor je konstituisan i funkcioniše u skladu sa načelima ICH-GCP i lokalnom zakonskom regulativom.

Dimitrija Tucovića 161, 11000 Belgrade, Serbia
Tel: +381 11 30 88 672, fax: +381 11 30 88 673, e-mail: etikain@mts.rs

Members of the Ethics Board:

Prof. Dr Nebojša Despotović, Cardiologist, Chairman LEC
Prof. dr Nataša Marković-Nikolić, Cardiologist, member
Prof. dr Teodora Beljić-Živković, Endocrinologist, member
Dr Srdjan Marković, Gastroenterologist, member
Ass. dr Radoslav Aščerić, Surgery, member
Nenad Radić, Lawyer, external member
Slavko Babić, Lawyer, external member
Suzana Nedelkov, Bachelor economist, Secretary LEC

ODLUKA ETIČKOG ODBORA

Mr ph Sanja Vujčić,
student doktorskih akademskih studija,
asistent na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

U periodu od 09. - 15. Okt 2020. god. održana je elektronska sednica Etičkog odbora KBC "Zvezdara" tako što je svim članovima Etičkog odbora prosledjen materijal dostavljen za razmatranje i odobrenje sprovođenja dole navedenih projekata.

Zaključno sa 15.10.2020. god, Predsednik Etičkog odbora, Prof. dr Nebojša Despotović i članovi Etičkog odbora: Prof. dr Teodora Beljić-Živković, Prof. dr Nataša Marković-Nikolić, Dr Srdjan Marković i Slavko Babić, dipl.pravnik, dostavili su svoja pozitivna mišljenja i jednoglasno odobrili sprovođenje dole navedenog projekta.

Ass. dr Radoslav Aščerić i Nenad Radić, dipl. pravnik, nisu dostavili svoja mišljenja u ostavljenom roku.

Članovi Etičkog odbora razmatrali su molbu **Mr ph Sanje Vujčić**, studenta doktorskih akademskih studija i asistenta na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, za odobrenje sprovođenja naučnog istraživanja u cilju izrade doktorske disertacije pod nazivom: "Značaj ispitivanja epigenetskih promena i njihove veze sa biomarkerima oksidativnog stresa dislipidemije i inflamacije u proceni rizika za razvoj komplikacija dijabetes melitusa".

Istraživanje se sprovodi u saradnji sa lekarima Odeljenja za endokrinologiju KBC "Zvezdara", Ass dr Milica Marjanović Petković i Ass dr Miljanka Vuksanović.
Mentori su dr sc Jelena Vekić i dr sc Jelena Kotur-Stevuljević, profesori Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na uvid i razmatranje dostavljena je kompletna dokumentacija koja je članovima Etičkog odbora pružila sve informacije potrebne za donošenje ispravne odluke o etičkoj podobnosti i sprovođenju predmetne studije: molba sa detaljnim obrazloženjem same metodologije sprovođenja ovog istraživanja, obrazac pisane saglasnosti i informacija za pacijente, Saglasnost Načelnika Odeljenja za endokrinologiju, Prof. dr Teodore Beljić Živković, da se studija može sprovesti u okviru Odeljenja za endokrinologiju i Upitnik za pacijente učesnike.

Lokalni Etički odbor koji je konstituisan i radi po načelima i principima ICH-GCP, predmetno kliničko istraživanje je ocenio etički podobnim i odobrio sprovođenje istog.

Datum: 15.10.2020.g


Predsednik Etičkog odbora
Prof. dr Verojša Despotović



1831

ОПШТА БОЛНИЦА ПОЖАРЕВАЦ

12000 Пожаревац; Братства и Јединства 135

Tel: +381 12 550 111; Fax: +381 12 550 585

e-mail: bolpo@ptt.rs web: www.obp.rs

Општа болница Пожаревац

Бр. 7190

30. 12. 2019.

Пожаревац

КОМПЛЕТАН ЗАХТЕВ ПРЕДАН 19.12.2019. _____

ODLUKA: Na sednici EO Opšte bolnice Požarevac održanoj 25.12.2019.g, a na osnovu čl. 4 i čl. 5 Pravilnika o radu Etičkog odbora Opšte bolnice Požarevac doneo je sledeću odluku. Zahtev je: odobren; odbijen; suspendovan

ETIČKI ODBOR BOLNICE POŽAREVAC

Sprovođenje epidemiološkog upitnika i prikupljanje uzoraka venske krvi u cilju istraživanja faktora rizika za razvoj dijabetesnog stopala

I: Naziv istraživanja: „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“

II: Dokumentacija za: a) novu studiju
b) amandman za studiju u toku (Amandman I)
c) ostalo

V: Sponzor-Proizvođač: Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

VI: Glavni istraživač: Mr ph Tatjana Stefanović i Prim Dr Srećko Bosić – Opšta bolnica Požarevac
Mr ph Sanja Vujčić i Prof Dr Jelena Vekić – Farmaceutski fakultet, Beograd

VII: Zemlje u kojima se studija sprovodi: Republika Srbija

VIII: Mesta u kojima se studija sprovodi: Opšta bolnica Požarevac i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Predsednik Etičkog odbora Opšte bolnice Požarevac

Dr Miodrag Milić



МММ
СПЕЦИЈАЛНИ
МЕДИЦИНИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
Војводе Степе 450
11000 Београд
Бр. 2566/3
Датум: 19.11.2024.

На основу члана 19. Правилника о раду Етичког комитета за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду, Етички комитет за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду на седници одржаној 18.11.2024. године, донео је

ОДЛУКУ

ДАЈЕ СЕ САГЛАСНОСТ за спровођење истраживања под називом: „Испитивање степена глобалне метилације ДНК код болесника са типом 2 дијабетес мелитуса: повезаност са биомаркерима оксидативног стреса, инфламације и дислипидемије“, у циљу израде докторске дисертације.

Ментор докторске дисертације је проф. др Јелена Векић, редовни професор на Катедри за медицинску биохемију, Универзитета у Београду-Фармацеутског факултета.

Молбу за давање сагласности поднела је магистар фармације – медицински биохемичар Сања Вујчић.

Одлуку доставити: подносиоцу захтева, ментору, председнику Комитета, секретару, шефу Одсека за правне и опште послове, Одсеку за наставу и студентска питања и Архиви.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ КОМИТЕТА
ЗА БИОМЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА

Проф. др Александра Стефановић



KBC „DR DRAGIŠA MIŠOVIĆ-DEDINJE“
Heoja Milana Tepića 1
Broj: 01-5656/24
Datum: 24.04.2019.godine

Na osnovu odredbe člana 148a Zakona o zdravstvenoj zaštiti („Službeni glasnik RS“ 107/2005, 88/2010, 99/2010 i 57/2011) i odredbe člana 38-39 Statuta KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ Etički odbor na sednici održanoj 24.04.2019.godine sa početkom u 12:00 časova u prostorijama Biblioteke Ustanove doneo je sledeću

O D L U K U

Usvaja se **Molba za odobrenje naučnog istraživanja**

Obrazloženje

Naučno istraživanje će se sprovediti u saradnji KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ i Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ovo istraživanje bi se odvijalo u sklopu naučnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“ (broj projekta 175035), a u svrhu izrade doktorskih disertacija mr ph Sanje Vujčić, studenta doktorskih akademskih studija i istraživača pripravnika na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i mr sc. med. dr Branke Koprivice Uzelac sa Odeljenja endokrinologije Klinike za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“. Studija bi bila sprovedena u skladu sa smernicama dobre kliničke prakse, dobre laboratorijske prakse, Helsinškom deklaracijom i važećom lokalnom regulativom. Pacijenti bi najpre bili detaljno upoznati sa ciljevima i protokolom istraživanja, a u studiju bi se uključili nakon potpisane saglasnosti. Za učešće pacijenata u studiji nije predviđena novčana nadoknada.

Glavni istraživači iz KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“

Dr sc. med. dr Sanja Ilić-Mijailović, spec. interne medicine, subspecijalista endokrinologije, načelnik Odeljenja endokrinologije, Klinike za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“

Mr sc. med. dr Branka Koprivica Uzelac, spec. interne medicine, subspecijalista endokrinologije, Odeljenje endokrinologije, Klinike za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“

Dr sc. med. Iva Perović-Blagojević, spec. medicinske biohemije, šef Odseka biohemije, Službe za laboratorijsku dijagnostiku KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“

Glavni istraživači sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Mr ph Sanja Vujčić, student doktorskih akademskih studija, istraživač pripravnik na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jelena Vekić, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Obrazloženje

Prema aktuelnim epidemiološkim podacima, dijabetes mellitus spada u najučestalija hronična oboljenja i predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, 2016. godine u svetu je od dijabetesa bolovalo 415 miliona ljudi, a procenjuje se da će taj broj do 2040. godine dostići 642 miliona. Najveći porast broja obolelih očekuje se u zemljama u razvoju, u koje se ubraja i Srbija. Na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje Srbije za 2016. godinu, u našoj zemlji od dijabetesa boluje približno 750 000 osoba, odnosno 13,2% stanovništva (*Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji, Beograd 2016.*). Broj obolelih od dijabetesa melitusa tip 2 je višestruko veći u odnosu na broj pacijenata sa tipom 1. S obzirom na to da je potvrđeno da su rano dijagnostikovanje i pravovremena terapija u cilju postizanja adekvatne metaboličke kontrole ključni faktori za prevenciju razvoja komplikacija u dijabetesu, posebno zabrinjava činjenica da veliki broj osoba sa tipom 2 dijabetesa nema postavljenu dijagnozu i ne zna za svoju bolest.

Dijabetes melitus je udružen sa razvojem mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Iako centralno mesto zauzima hiperglikemija, veliki broj studija je doveo u vezu razvoj komplikacija u dijabetesu sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i smanjenom antioksidativnom zaštitom. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na čvrstu vezu između hiperglikemije i oksidativnog stresa, mada molekularni mehanizmi odgovorni za nastanak komplikacija u dijabetesu nisu u potpunosti rasvetljeni. U tom smislu, rezultati predloženog istraživanja doprineli bi rasvetljavanju uloge oksidativnog stresa u razvoju komplikacija, a analiza koncentracija krajnjih proizvoda uznapredovale glikacije, kao i proizvoda uznapredovale oksidacije proteina i drugih markera redoks statusa kod pacijenata sa i bez komplikacija mogla bi da ukaže na prognostički potencijal ovih biomarkera (*Park S, Kang HJ, Jeon JH, et al. Recent advances in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. Arch. Pharm. Res. 2019;42:252-62.*).

Na osnovu međunarodnih preporuka, pacijenti sa dijabetesom se svrstavaju u kategoriju visokog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (ekvivalent koronarne bolesti), a ovaj stav podržava i Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje dijabetesa melitusa. Iako su mehanizmi koji povezuju identifikovane faktore rizika sa razvojem kardiovaskularnih bolesti još uvek nepotpuno razjašnjeni, raspoloživi dokazi upućuju na zaključak da poremećaji lipidne homeostaze, inflamacija i oksidativni stres udruženo deluju u procesu aterogeneze. U skladu sa prethodnim, razumevanje biohemijske osnove i rana identifikacija potencijalnih serumskih biomarkera korisnih u proceni rizika za razvoj ateroskleroze je važan deo strategije za prevenciju razvoja budućih kardiovaskularnih komplikacija u dijabetesu. Stoga bi jedan od ciljeva predloženog istraživanja bio i identifikacija biomarkera dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije, kao i definisanje multimarkerskih pristupa, koji bi omogućili predviđanje rizika za razvoj mikrovaskularnih komplikacija i kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa dijabetesom.

Kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 javljaju se karakteristične promene u strukturi lipoproteinskih čestica, te se nalaz malih, gustih LDL čestica smatra jednom od komponenti tzv. dijabetesne dislipidemije. Kvalitativne i kvantitativne promene LDL i HDL subfrakcija u tipu 1 dijabetes melitusa ispitivane su u manjem obimu, a raspoloživi podaci sugerišu da se profil lipoproteinskih subfrakcija u plazmi značajno razlikuje u zavisnosti od toga da li su pacijenti na konvencionalnom ili intenzivnom režimu insulinske terapije, što otvara mogućnosti za dalja istraživanja. Distribucija pojedinačnih HDL subfrakcija u plazmi je prevashodno rezultat aktivnosti enzima lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT) i holesterol-estar transfernog proteina (CETP). Određivanje aktivnosti LCAT i CETP, enzima koji utiču na remodelovanje HDL čestica u plazmi, i aktivnosti paraoksonaze 1, enzima koji je odgovoran za antioksidativna svojstva HDL čestica, ukazalo bi na potencijalnu disfunkciju HDL čestice, što je trenutno najaktuelnija oblast u istraživanjima ovog lipoproteina. Dodatno, izmerena aktivnost CETP pružila bi uvid i u stepen remodelovanja LDL subfrakcija u plazmi, imajući u vidu da je CETP ključni činilac koji dovodi do njihove redistribucije ka malim, gustim LDL česticama (*Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? Diabetologia 2015; 58: 886–99.*).

Neprekidan porast prevalencije dijabetesa sugeriše da način života i faktori sredine imaju ulogu u razvoju i progresiji ove bolesti, kao i da bi njihovo bolje razumevanje značajno doprinelo poboljšanju postojećih i razvoju novih terapijskih strategija. Stoga će okosnicu ovog istraživanja činiti ispitivanje epigenetskih promena kod pacijenata sa dijabetesom. Danas je već dobro utvrđeno da epigenetske modifikacije DNK, koje nastaju kao rezultat interakcije sa faktorima sredine, dovode do promena u ekspresiji različitih gena. Analiza globalne metilacije DNK u leukocitima periferne krvi omogućava sveobuhvatni uvid u efekat interakcije prisutnih faktora rizika i faktora sredine na gensku ekspresiju, ali je ova epigenetska modifikacija do danas nedovoljno istražena u dijabetesu. Na osnovu do sada sprovedenih studija, ustanovljeno je da određene promene u obrascima metilacije DNK (hipermetilacija ili hipometilacija) leže u osnovi razvoja dijabetesa, a novije studije ukazuju da bi metilacija DNK mogla da bude i jedan od mehanizama odgovornih za razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, a shodno tome, i potencijalno ciljno mesto terapije. Rezultati planirane studije doprineli bi boljem razumevanju značaja globalne metilacije DNK u etiopatogenezi dijabetesa i ukazali na važnosti ispitivanja interakcije epigenetskih sa drugim faktorima rizika u dijabetesu za razvoj njegovih komplikacija (*Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. Pediatr Diabetes 2017 ;18:167-177.*). Novija istraživanja pokazuju da se u dijabetesu, pored epigenetskih, mogu javiti i promene u sistemu telomere-telomeraze. Naime, skraćenje dužine telomeraze smatra se jednim od markera starenja ćelija, ali je ovaj mehanizam do sada ispitivan u manjem obimu kod pacijenata sa dijabetesom. Eksperimentalni dokazi i rezultati kliničkih studija ukazuju da je dužina telomera i aktivnost enzima telomerase u leukocitima periferne krvi u korelaciji sa vrednostima dužine telomera i aktivnosti telomeraze u drugim ciljnim tkivima i organima (*Dudinskaya EN, Tkacheva ON, Shestakova MV, et al. Short telomere length is associated with arterial aging in patients with type 2 diabetes mellitus. Endocr Connect 2015;4:136-43.*). Rezultati ovog dela istraživanja

doprineli bi razjašnjenju još uvek nedovoljno poznatih mehanizama interakcije oksidativnog stresa, epigenetskih modifikacija, dislipidemije i inflamacije u razvoju i progresiji dijabetesa. Ovakvo opsežno istraživanje koje uključuje dovoljan broj ispitanika sa i bez komplikacija za relevantnu statističku analizu podataka, te određivanje većeg broja indikatora različitih nivoa poremećaja homeostaze prisutnih u tipu 1 i 2 dijabetes melitusa, trebalo bi da doprinese boljem razumevanju biohemijskih promena koje se javljaju u dijabetesu, čime bi se unapredile mere prevencije. Kroz zajedničko učešće u ovom istraživanju dve istaknute ustanove, KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, unaprediće već postojeću stručnu i naučnu saradnju. Takođe, planirano publikovanje rezultata istraživanja u priznatim naučnim časopisima i prezentacije na istaknutim naučnim konferencijama, doprinelo bi poboljšanju naučnog renomea i prepoznatljivosti obe ustanove u internacionalnoj naučnoj zajednici. Na taj način bi se otvorile mogućnosti za obe ustanove da zajednički ili samostalno apliciraju za buduće domaće i međunarodne naučne projekte.

Plan istraživanja

Istraživanje bi obuhvatilo 150 pacijenata sa Odeljenja endokrinologije Klinike za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ sa dijagnozom tip 1 i tip 2 dijabetes melitus. U istraživanje bi bili uključeni pacijenti sa i bez mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija.

Planirano je prikupljanje sledećih demografskih podataka: starost, pol, telesna masa i visina, obim struka i kukova, sistolni i dijastolni pritisak, životne navike (ishrana, fizička aktivnost, pušenje), kao i kliničkih podataka: dužina trajanja bolesti, terapija dijabetesa, prisustvo mikrovaskularnih komplikacija (nefropatija, retinopatija, neuropatija), prisustvo kardiovaskularnih bolesti, drugih komorbiditeta, primena ostalih vidova terapije (antihipertenzivi, statini, ACE inhibitori, lekovi za regulaciju srčanog rada) i porodična istorija kardiovaskularnih bolesti.

Za istraživanja koja bi se radila na Farmaceutskom fakultetu uzimala bi se puna venska krv iz periferne vene nakon noćnog gladovanja. Pacijentima bi ukupno bilo uzeto 13 mL krvi prema sledećem protokolu: 1 vakutainer sa EDTA antikoagulansom od 3 mL i 1 serumski vakutainer sa serum separator gelom od 10 mL. Svi uzorci bi nakont ransporta na Farmaceutski fakultet bili obrađeni i skladišteni na -80°C do daljeg analiziranja. Osnovni biohemijski i hematološki profil pacijenata bio bi određen u laboratoriji Službe za laboratorijsku dijagnostiku KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ u okviru redovnog kontrolnog pregleda pacijenata koji se leče na Odeljenju endokrinologije, a koji budu prihvatili učešće u istraživanju.

U biohemijskoj laboratoriji KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ vršilo bi se određivanje: parametara za praćenje metaboličke kontrole i procenu insulinske rezistencije (glukoza, HbA_{1c} , insulin), parametara lipidnog statusa (ukupan holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol, trigliceridi), parametara za procenu bubrežne funkcije (kreatinin, mokraćna kiselina, mikroalbuminurija), enzimskog profila jetre (AST, ALT, LDH, GGT), ukupnih proteina, hsCRP i kompletne krvne slike.

U laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta radile bi se sledeće analize:

- stepen globalne DNK metilacije u leukocitima periferne krvi
- dužina telomera i aktivnost telomerase u leukocitima periferne krvi,
- biomarkeri dislipidemije: veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija,
- aktivnost lipidnih transfernih proteina u serumu: LCAT i CETP,
- biomarkeri oksidativnog stresa: TOS (totalni oksidativni status), PAB (prooksidativno-antioksidativni balans), MDA (malondialdehid), IMA (ishemijom modifikovan albumin), TAS (totalni antioksidativni status), SH-grupe (sulfhidrilne grupe), SOD (superoksid dismutaza), PON1 (paraoksonaza 1),
- biomarkeri uznapredovale glikacije i oksidacije proteina (AGE, AOPP).

U donošenju predmetne odluke učestvovali su, posle glasanja, sledeći članovi Etičkog odbora

- Mr sci med Milena Pavlović Kleut, zamenik predsednika, Klinika za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Odeljenje kardiologije
- Prim.dr sci med Dragana Kuljić-Obradović, član, Upravnik Bolnice za neurologiju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“
- Dr Miroslav Cvetanović, Klinika za hirurgiju, Šef odseka kolorektalne hirurgije, član
- Dr Vladislav Pešić, član, Klinika za urologiju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Stacionarno I odeljenje
- Jovanka Zečević, advokat
- Mirko Mrkić, član, advokat

Etički odbor KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ radi po principima GCP/ICH.

ZAPISNIK VODILA,
Ljiljana Marčetić

Ljiljana Marčetić



ZAMENIK PREDSEDNIKA ETIČKOG ODBORA,
Mr sci med Milena Pavlović Kleut

Milena Pavlović Kleut



Article

Global DNA Methylation in Poorly Controlled Type 2 Diabetes Mellitus: Association with Redox and Inflammatory Biomarkers

Sanja Vujcic ¹, Jelena Kotur-Stevuljevic ¹, Zoran Vujcic ², Sanja Stojanovic ³, Teodora Beljic Zivkovic ^{4,5} , Miljanka Vuksanovic ^{4,5}, Milica Marjanovic Petkovic ^{4,5} , Iva Perovic Blagojevic ⁶ , Branka Koprivica-Uzelac ⁶, Sanja Ilic-Mijailovic ⁶, Manfredi Rizzo ⁷ , Aleksandra Zeljkovic ¹ , Tatjana Stefanovic ⁸, Srecko Bosic ⁸ and Jelena Vekic ^{1,*}

- ¹ Department of Medical Biochemistry, University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, 11000 Belgrade, Serbia; sanja.vujcic@icloud.com (S.V.); jelena.kotur@pharmacy.bg.ac.rs (J.K.-S.); aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs (A.Z.)
- ² Department of Biochemistry, University of Belgrade-Faculty of Chemistry, 11000 Belgrade, Serbia; zvujcic@chem.bg.ac.rs
- ³ Department of Chemistry, University of Belgrade-Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, 11000 Belgrade, Serbia; sanja.stojanovic@ihtm.bg.ac.rs
- ⁴ Department of Internal Medicine, University of Belgrade-Faculty of Medicine, 11000 Belgrade, Serbia; beljicdora@gmail.com (T.B.Z.); miljankavuk@gmail.com (M.V.); drmilicamarjanovic@gmail.com (M.M.P.)
- ⁵ Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders, Department of Internal Medicine, Zvezdara University Medical Center, 11000 Belgrade, Serbia
- ⁶ Clinical Hospital Center “Dr. Dragisa Misovic-Dedinje”, 11000 Belgrade, Serbia; ivapb17@gmail.com (I.P.B.); bkoprivica@beotel.net (B.K.-U.); ilicsanja1969@yahoo.com (S.I.-M.)
- ⁷ Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties, University of Palermo, 90100 Palermo, Italy
- ⁸ General Hospital Pozarevac, 12000 Pozarevac, Serbia; tatjanastefanovicpo@gmail.com (T.S.); delboske2@gmail.com (S.B.)
- * Correspondence: jelena.vekic@pharmacy.bg.ac.rs



Academic Editor: Antonio Lucacchini

Received: 9 June 2025

Revised: 9 July 2025

Accepted: 11 July 2025

Published: 13 July 2025

Citation: 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.; et al. Global DNA Methylation in Poorly Controlled Type 2 Diabetes Mellitus: Association with Redox and Inflammatory Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6716. <https://doi.org/10.3390/ijms26146716>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Although emerging evidence suggests that epigenetic mechanisms contribute to the pathogenesis and progression of type 2 diabetes mellitus (T2DM), data remain limited for patients with suboptimal metabolic control. The aim of this study was to assess global DNA methylation in patients with poorly controlled T2DM and to identify diabetes-related factors associated with DNA methylation levels. The study included 107 patients and 50 healthy controls. Global DNA methylation (5mC) was measured by UHPLC-DAD method. Pro-oxidant and antioxidant biomarkers, advanced glycation end-products, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and complete blood count were determined and leukocyte indices calculated. Patients had a significantly lower 5mC than controls ($3.56 \pm 0.31\%$ vs. $4.00 \pm 0.68\%$; $p < 0.001$), with further reductions observed in those with longer disease duration and diabetic foot ulcers. Oxidative stress and inflammatory biomarkers were higher in the patient group. DNA hypomethylation was associated with a higher monocyte-to-lymphocyte ratio and hsCRP, pro-oxidant–antioxidant balance, ischemia-modified albumin, and advanced oxidation protein products levels. Conversely, 5mC levels showed positive correlations with total antioxidant status and total sulfhydryl groups. Principal component analysis identified five key factors: proinflammatory, pro-oxidant, aging, hyperglycemic, and antioxidant. The pro-oxidant factor emerged as the sole independent predictor of global DNA hypomethylation in T2DM (OR = 2.294; $p = 0.027$). Our results indicate that global DNA hypomethylation could be a biomarker of T2DM progression, reflecting the complex interactions between oxidative stress, inflammation, and epigenetic modifications in T2DM.

Keywords: global DNA methylation; biomarkers; diabetes mellitus; oxidative stress; inflammation

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its related complications continue to pose a major public health challenge [1]. Recent studies emphasize the role of epigenetic dysregulation in T2DM, particularly in the development of microvascular and macrovascular complications [2]. One of the most studied epigenetic modifications is DNA methylation, in which a methyl group is added to the 5-carbon of cytosine in CpG dinucleotides. This process is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) [3]. DNA methylation is considered a crucial epigenetic mechanism due to its role in regulating gene expression, including genes involved in glucose [4] and lipid metabolism [5].

Oxidative stress and inflammation are frequently present in poorly controlled T2DM [6]. Novel findings suggest that these factors may cause changes in DNA methylation [7]. Chronic hyperglycemia through several metabolic pathways contributes to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), which can overcome the body's own antioxidant defense, leading to oxidative stress [8]. Additionally, persistent hyperglycemia leads to the formation of advanced glycation end-products (AGEs), which may further increase ROS production through their interaction with receptors for AGEs (RAGE) [9]. Glycooxidative modifications of proteins such as IgG have been implicated in the immunopathology of T2DM, supporting the pathological relevance of AGEs in the disease process [10]. It has been established that ROS may affect DNA methylation through direct DNA damage or interaction with DNMTs [11]. Although a direct link between AGEs and DNA methylation has not yet been fully established, it may involve common pathways. Both oxidative stress and AGEs promote the production of proinflammatory cytokines and activate the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway, which can alter the activity of DNMTs, leading to changes in DNA methylation [12]. These epigenetic alterations can further affect genes involved in inflammation and the oxidative stress response, creating a feedback loop that accelerates the progression of T2DM.

Laboratory assessment of global DNA methylation, by estimating the 5-methylcytosine (5mC) percentage in total cytosine within DNA, could be a potentially useful epigenetic biomarker for screening DNA methylation status. While it is known that hypermethylation of gene promoters leads to their silencing, the effects of alterations in global DNA methylation on the pathophysiology of complex diseases, particularly T2DM, are not yet fully understood [13]. Previous studies have reported conflicting results, finding both global DNA hypomethylation [14] and hypermethylation [15] in T2DM. However, data are limited, especially regarding DNA methylation in patients with poorly controlled diabetes. This study focuses on its interplay with oxidative stress and inflammation, aiming to address the still-existing gap in the current understanding of the role of DNA methylation in the pathophysiology of T2DM.

The aim of this study was to examine DNA methylation patterns in patients with poorly controlled T2DM. Specifically, we aimed to determine whether significant differences in DNA methylation levels exist between patients with and without diabetes-related complications and to identify the diabetes-related factors that influence global DNA methylation levels.

2. Results

The demographic and laboratory data of the T2DM patients and the control group (CG) are summarized in Table 1. The patients were older and had a higher proportion of males. In addition, T2DM patients had higher systolic blood pressure and prevalence of hypertension, as well as a higher body mass index (BMI) and prevalence of obesity, as compared to the CG. The proportion of smokers was also higher in the T2DM group. As expected, the patients had significantly higher levels of glucose and glycated hemoglobin (HbA_{1c}). The analysis of lipid status showed that the patients had higher triglycerides (TG), but lower levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) than the controls.

Table 1. Demographic and laboratory data of study participants.

Parameters	CG (N = 56)	T2DM (N = 107)	<i>p</i>
Age, years	52.6 ± 9.3 (57)	62.0 ± 11.3 (62.5)	<0.001
Gender, m/f	20/36	60/47	0.021
BMI, kg/m ²	25.6 ± 3.6 (25.9)	31.5 ± 6.8 (29.6)	<0.001
Obesity, %	7.1	49.5	<0.001
Systolic blood pressure, mm Hg	122.4 ± 20.3 (124)	133.9 ± 20.7 (130)	0.001
Diastolic blood pressure, mm Hg	80.5 ± 10.8 (85)	80.5 ± 11.7 (80)	0.990
Hypertension, %	35.7	88.7	<0.001
Smoking, %	5.4	38.3	<0.001
Glucose, mmol/L	5.23 ± 0.61 (5.20)	10.60 ± 4.08 (10.05)	<0.001
HbA _{1c} , %	3.4 ± 1.1 (3.2)	9.9 ± 1.9 (10.0)	<0.001
TC, mmol/L	6.17 ± 1.14 (6.27)	4.61 ± 1.21 (4.70)	<0.001
LDL-C, mmol/L	3.88 ± 1.01 (4.29)	2.64 ± 0.99 (2.70)	<0.001
HDL-C, mmol/L	1.65 ± 0.39 (1.50)	1.06 ± 0.39 (1.00)	<0.001
TG, mmol/L #	1.19 (0.98–1.54)	1.75 (1.10–2.65)	<0.001

Abbreviations: BMI—body mass index; HbA_{1c}—glycated hemoglobin; TC—total cholesterol; LDL-C—LDL-cholesterol; HDL-C—HDL-cholesterol; TG—triglycerides. Data were shown as mean ± standard deviation and as medians (in parentheses) and as absolute or relative frequencies. # Data were shown as median (Q1–Q3).

In our T2DM group, the median duration of diabetes was 10 years (interquartile range: 3–15 years), with approximately one-third (35.5%) of patients having had T2DM for more than 10 years. Regarding complications of diabetes, 48 patients (44.9%) had cardiovascular disease (CVD), and 66 patients (58.9%) had microvascular complications. Neuropathy was present in 51 (47.7%), retinopathy in 8 (7.5%), and nephropathy in 17 (15.9%) patients, while 25 patients (23.4%) had diabetic foot ulcers. Almost a third of our patients (39.9%) experienced both microvascular and macrovascular complications.

The levels of global DNA methylation in T2DM patients and CG are shown in Figure 1. T2DM patients had significantly lower 5mC levels (3.56 ± 0.31%) than controls (4.00 ± 0.68%; *p* < 0.001). The observed difference persisted even after adjustment for age and gender (adjusted means for 5mC: 3.57 ± 0.45% in T2DM vs. 3.98 ± 0.55% in CG; *p* < 0.001).

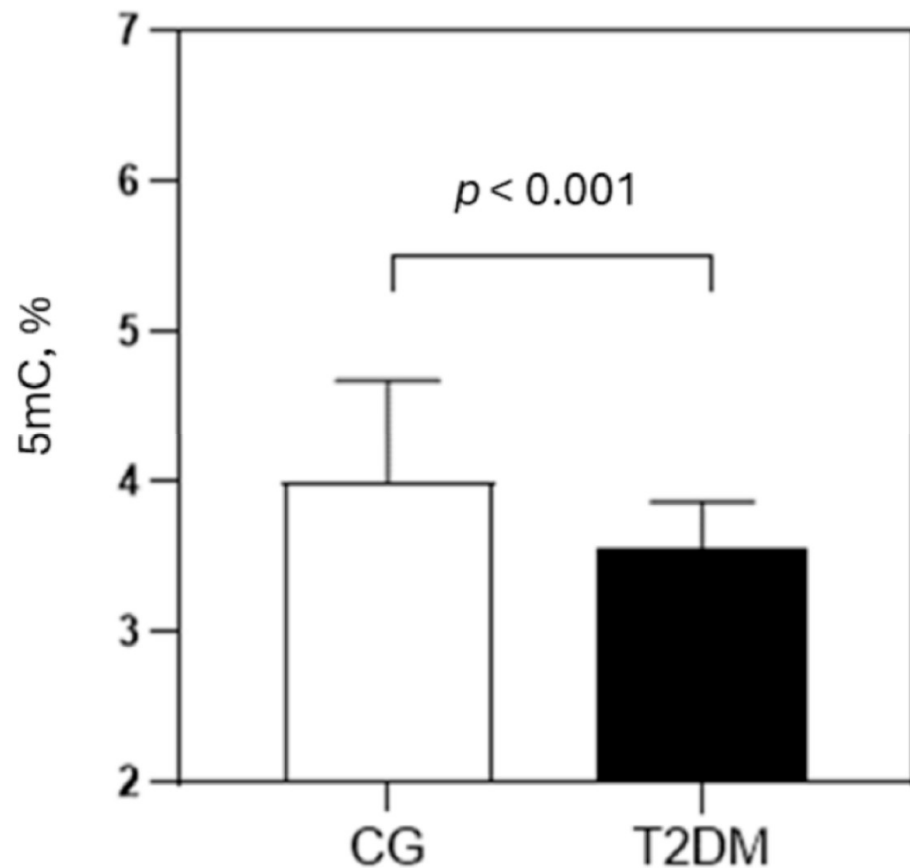


Figure 1. Global DNA methylation in CG and T2DM patients. Abbreviations: CG—control group; T2DM—type 2 diabetes mellitus; 5mC—5-methylcytosine. Data were shown as mean $\pm$ standard deviation and compared by Student's *t*-test.

A correlation analysis showed that the global DNA methylation level was inversely associated with age ($r = -0.213$; $p = 0.009$) and serum glucose concentration ($r = -0.388$; $p < 0.001$). On the other hand, a positive association was found between global DNA methylation and HDL-C level ($r = 0.228$; $p = 0.008$).

We further analyzed whether the level of global DNA methylation differs depending on the clinical characteristics of the T2DM patients studied (Table 2). This analysis showed that patients with a T2DM duration of ≥ 10 years had significantly lower global DNA methylation levels than those who had diabetes for less than 10 years. Reduced global DNA methylation was also observed in T2DM patients who smoke, although the difference did not reach statistical significance. Regarding T2DM complications, there was no difference in 5mC levels between patients with and without CVD. However, a trend towards reduced global DNA methylation was observed in patients with microvascular complications. Patients with diabetic foot ulcers exhibited significantly lower global DNA methylation levels than patients without this complication.

In order to elucidate factors affecting global DNA methylation, we first analyzed the levels of F-AGEs in both groups. The results showed that F-AGEs levels in T2DM patients (median: 5.44 U/mL, Q1–Q3: 4.91–7.71 U/mL) were comparable to those of CG (median: 5.82 U/mL, Q1–Q3: 4.57–6.71 U/mL; $p = 0.139$). There was no significant correlation between global DNA methylation and F-AGEs levels ($r = 0.060$; $p = 0.478$).

Table 2. Global DNA methylation according to the clinical characteristics of T2DM patients.

Category of T2DM Patients	N	5mC, %	<i>p</i>
Gender			
Male	60	3.56 ± 0.27	0.912
Female	47	3.56 ± 0.35	
BMI			
<25 kg/m ²	54	3.53 ± 0.33	0.246
≥25 kg/m ²	53	3.60 ± 0.29	
Diabetes duration			
<10 years	69	3.62 ± 0.33	0.027
≥10 years	38	3.48 ± 0.24	
Smoking			
No	66	3.53 ± 0.28	0.090
Yes	41	3.64 ± 0.34	
CVD			
No	59	3.58 ± 0.34	0.676
Yes	48	3.55 ± 0.27	
Microvascular complications			
No	41	3.63 ± 0.36	0.060
Yes	66	3.51 ± 0.26	
Neuropathy			
No	56	3.60 ± 0.36	0.236
Yes	51	3.52 ± 0.24	
Retinopathy			
No	99	3.55 ± 0.32	0.324
Yes	8	3.67 ± 0.16	
Nephropathy			
No	90	3.58 ± 0.31	0.097
Yes	17	3.45 ± 0.30	
Diabetic foot ulcers			
No	82	3.60 ± 0.32	0.037
Yes	25	3.45 ± 0.26	

Data are shown as mean ± standard deviation.

Next, we analyzed inflammatory and redox biomarkers in T2DM patients and controls (Table 3). Inflammatory markers such as high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and blood-count derived biomarkers (neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), monocyte-to-lymphocyte ratio (MLR), monocyte-to-white blood cell ratio (MWR)) were significantly elevated in T2DM patients. Pro-oxidant biomarkers (total oxidant status (TOS) and pro-oxidant-antioxidant balance (PAB)) and biomarkers of oxidative damage (ischemia-modified albumin (IMA) and advanced oxidation protein products (AOPP)) were significantly increased in T2DM patients ($p < 0.001$), while antioxidant defense biomarkers (total antioxidant status (TAS), total sulfhydryl (SH) groups) were significantly reduced ($p < 0.001$).

Table 3. Inflammatory and redox biomarkers in the studied groups.

Biomarkers	CG (N = 56)	T2DM (N = 107)	<i>p</i>
Inflammatory biomarkers			
hsCRP, mg/L	0.30 (0.10–0.85)	5.80 (1.85–13.55)	<0.001
NLR	1.95 (1.35–2.17)	2.19 (1.63–2.93)	0.013
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 (89.75–138.80)	111.00 (91.10–150.70)	0.326
Pro-oxidant biomarkers			
TOS, $\mu\text{mol/L}$	4.5 (4.0–6.0)	6.60 (4.7–8.0)	<0.001
PAB, U/L	74.24 (60.30–84.10)	88.33 (67.60–127.20)	<0.001
Oxidative damage biomarkers			
IMA, AU	0.28 (0.20–0.33)	0.55 (0.47–0.62)	<0.001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	19.20 (18.25–27.35)	48.90 (36.60–58.90)	<0.001
Antioxidant defense biomarkers			
TAS, $\mu\text{mol/L}$	1290.0 (1217.0–1384.5)	962.00 (714.0–1120.0)	<0.001
SH-groups, 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

Abbreviations: hsCRP—high-sensitivity C-reactive protein; NLR—neutrophil-to-lymphocyte ratio; NWR—neutrophil-to-white blood cell ratio; MLR—monocyte-to-lymphocyte ratio; MWR—monocyte-to-white blood cell ratio; LWR—lymphocyte-to-white blood cell ratio; PLR—platelet-to-lymphocyte ratio; TOS—total oxidant status; PAB—pro-oxidant antioxidant balance; IMA—ischemia-modified albumin; AOPP—advanced oxidation protein products; TAS—total antioxidant status; SH-groups—total sulfhydryl groups; SOD—superoxide dismutase. Data are shown as median (Q1–Q3).

Further analysis was performed to investigate the correlations of 5mC levels with inflammatory and redox biomarkers (Table 4). It was found that the 5mC levels were significantly negatively correlated with hsCRP and MLR. Regarding redox biomarkers, 5mC levels exhibited significant negative correlations with PAB, IMA, and AOPP. Conversely, 5mC levels showed positive correlations with the levels of antioxidative defense biomarkers TAS and SH-groups.

Multiple linear regression analysis with stepwise selection was performed to identify potential independent associations between global DNA methylation and variables that showed significant correlations with 5mC levels in univariate analysis. In particular, the following variables were included in the model: age, gender, glucose, hsCRP, MLR, PAB, IMA, AOPP, TAS, and SH-groups. In the multivariate analysis, global DNA methylation level remained significantly inversely associated with age ($\beta = -0.254$; $p = 0.004$), while showing positive associations with the antioxidant biomarkers TAS ($\beta = 0.342$; $p < 0.001$) and SH-groups ($\beta = 0.204$; $p = 0.023$).

To test which of the investigated variables are possible independent predictors of DNA hypomethylation in T2DM, we first reduced the number of parameters by principal component analysis (PCA). The factors extracted by PCA analysis were composed of parameters with a comparable level of variability. The Kaiser–Meyer–Olkin index, as a measure of sampling adequacy, was 0.562 (fulfilling the condition of KMO > 0.500), and the

Bartlett's test of sphericity, which yielded $p = 0.001$ (the condition for the Bartlett's test p is below 0.05), established the analysis's significance. The extracted factors with loadings of the included variables are presented in Table 5.

Table 4. Correlations of 5mC level with inflammatory and redox biomarkers.

	5mC, %	
	r	p
Inflammatory biomarkers		
hsCRP, mg/L	−0.388	<0.001
MLR	−0.174	0.035
Redox biomarkers		
PAB, U/L	−0.343	<0.001
IMA, AU	−0.412	<0.001
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	−0.214	0.009
TAS, $\mu\text{mol/L}$	0.386	<0.001
SH-groups, mmol/L	0.316	<0.001

Abbreviations: hsCRP—high-sensitivity C-reactive protein; MLR—monocyte-to-lymphocyte ratio; PAB—pro-oxidant–antioxidant balance; IMA—ischemia-modified albumin; AOPP—advanced oxidation protein products; TAS—total antioxidant status; SH-groups—total sulfhydryl groups.

Table 5. Factors extracted in PCA.

Factors	Variables Included in the Factor	Loadings of the Variables	Factor Variability, % (Total Variance: 58%)
Proinflammatory factor	hsCRP, mg/L	0.774	18
	SOD, U/L	−0.689	
	NLR	0.621	
	PAB, U/L	0.607	
	IMA, AU	0.576	
Pro-oxidant factor	TOS, $\mu\text{mol/L}$	0.708	12.5
	AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0.643	
	BMI, kg/m^2	0.599	
Ageing factor	Age, years	0.757	10.5
	Diabetes duration, years	0.723	
Hyperglycemic factor	F-AGEs, U/mL	0.687	9
	Glucose, mmol/L	−0.544	
	Gender	0.525	
Antioxidant factor	SH-groups, mmol/L	0.715	8

Abbreviations: hsCRP—high-sensitivity C-reactive protein; SOD—superoxide dismutase; NLR—neutrophil-to-lymphocyte ratio; PAB—pro-oxidant–antioxidant balance; IMA—ischemia-modified albumin; TOS—total oxidant status; AOPP—advanced oxidation protein products; BMI—body mass index; F-AGEs—fluorescent advanced glycation end-products; SH-groups—total sulfhydryl groups.

The factors extracted in the PCA analysis explained 58% of the variance of the included parameters. The first factor was characterized by positive loadings for hsCRP, NLR, PAB and IMA, and a negative loading for superoxide dismutase (SOD) activity. It was interpreted as the “proinflammatory factor” and explained 18% of the total variance. The second factor explained 12.5% of the total variance and was denoted as the “pro-oxidant factor” due to positive loadings for TOS, AOPP levels and BMI. The third factor captured 10.5% of the total variance and was named the “ageing factor” due to positive loadings for patients' age and diabetes duration. The fourth factor was termed the “hyperglycemic factor,” and was characterized by positive loadings for F-AGEs and gender and negative loading for glucose concentration. This factor explained 9% of the total variance. The

fifth factor included SH-groups with a positive loading, and was therefore labelled the “antioxidant factor”, which explained 8% of the total variance.

Binary logistic regression analysis with the PCA-derived factor scores as independent variables was used to assess their potential independent association with DNA hypomethylation (5mC < 3.40%). As shown in Table 6, among the extracted factors, the sole significant predictor of DNA hypomethylation was the “pro-oxidant factor”. Specifically, an increased “pro-oxidant factor” significantly increased the probability of low 5mC levels (OR= 2.294; $p = 0.027$).

Table 6. Logistic regression analysis for prediction of DNA hypomethylation by PCA-derived factors.

Predictors	B (SE)	Wald Coefficient	OR (95% CI)	P
Proinflammatory factor	−0.777 (0.476)	3.074	0.460 (0.193–1.096)	0.080
Prooxidant factor	0.830 (0.377)	4.863	2.294 (1.097–4.798)	0.027
Ageing factor	−0.120 (0.346)	0.120	0.887 (0.450–1.749)	0.730
Hyperglycemic factor	0.278 (0.410)	0.460	1.321 (0.591–2.949)	0.498
Antioxidant factor	0.173 (0.406)	0.181	1.188 (0.537–2.631)	0.671

Abbreviations: SE—standard error; OR—odds ratio; CI—confidence interval.

3. Discussion

In the presented study, we have demonstrated that poorly controlled T2DM patients have decreased global DNA methylation. In addition, our data suggest a further decrease in global DNA methylation levels with increasing age and duration of diabetes, as well as in the presence of microvascular complications, particularly diabetic foot ulcers. Furthermore, significant associations were observed between global DNA methylation and biomarkers of inflammation and redox status, while the “pro-oxidant factor” emerged as the only significant predictor of DNA hypomethylation in poorly controlled T2DM.

DNA methylation is a fundamental epigenetic modification in which a methyl group is added to DNA, typically to cytosine in CpG dinucleotides, leading to changes in gene expression without altering the DNA sequence [3]. In T2DM, aberrant DNA methylation patterns have been observed in genes involved in glucose metabolism and insulin signalling pathways [16,17]. These epigenetic changes can be further influenced by oxidative stress and chronic inflammation, which typically occur in poorly controlled T2DM. DNA methylation, in addition to serving as a link between environmental factors and genetic predisposition to T2DM, could also be a valuable biomarker for monitoring disease progression. However, while global DNA methylation has been extensively studied in cancer, studies in T2DM have been very limited, and the reported results are conflicting. In the current study, T2DM patients had significantly lower 5mC levels compared to control subjects (Figure 1). Consistent with our results, Luttmer et al. [14] found DNA hypomethylation in individuals with high fasting plasma glucose levels. In addition, Thongsroy et al. [18] found a decrease in DNA methylation with increased HbA_{1c} levels. In contrast, Pinzón-Cortés et al. [15] reported no difference in 5mC levels in T2DM patients compared to healthy controls, but found hypermethylation in poorly regulated T2DM. Recently, Muka et al. [19] conducted a systematic review, and established an inconsistent association between global DNA methylation and T2DM, highlighting the current lack of studies in this area, and the need for further research.

One of the possible reasons for such inconsistencies could be the use of different methods for assessing global DNA methylation across studies. While the HPLC method is considered the gold standard, other techniques such as ELISA, Alu, and LUMA are commonly used due to their simplicity and cost-effectiveness [20]. However, the use of

different methodological approaches complicates result interpretation and limits the comparability of findings across studies, indicating the need for harmonization. Furthermore, discrepancies in the results may also be influenced by the characteristics of the patients included in the studies. For instance, our patients were older and had higher HbA_{1c} levels than the patients included in the study by Pinzón-Cortés et al. [15]. In addition, our study had a higher proportion of male patients and a greater obesity rate in the T2DM group. Of note, although our patients were older and included a higher proportion of males compared to the CG, the observed difference in global DNA methylation levels remained significant even after adjustment for age and gender. In the current study, we did not perform a gender-specific analysis, despite a significant difference in the gender distribution among participants. Future studies with larger and more balanced cohorts are needed to explore potential sex-specific effects on global DNA methylation and its association with oxidative stress and inflammation.

Analysis of global DNA methylation in relation to the clinical characteristics of our patients revealed that patients with a longer duration of diabetes and those with diabetic foot ulcers had lower global DNA methylation levels (Table 2), suggesting that chronic hyperglycemia and severe complications might exacerbate epigenetic changes, and vice versa. Current data on patients with poorly controlled T2DM and developed complications are very limited. Maghbooli et al. [21] found that global DNA methylation is a potential biomarker of diabetic retinopathy, by comparing global DNA methylation between T2DM patients with and without retinopathy. In this study, however, no difference in 5mC levels was found between patients with and without retinopathy, likely due to the small number of patients with this microvascular complication. Zhang et al. [22] found a decrease in DNA methylation in diabetic neuropathy. Consistent with this finding, a trend towards decreased 5mC levels was observed in our patients with neuropathy, while it was significantly decreased in patients with diabetic foot ulcers. Additionally, we detected a trend towards global DNA hypomethylation in patients with nephropathy, although the difference did not reach statistical significance. Although meaningful trends were observed, the relatively small number of participants in certain subgroups, particularly those with diabetic retinopathy, may have limited the ability to detect statistically significant associations. As such, some findings should be interpreted with caution, bearing in mind the limited statistical power rather than the lack of a true association. Future studies with larger and more evenly distributed patients are needed to confirm and expand upon these observations.

Studies investigating the link between global DNA methylation and CVD risk have reported significant associations with both increased [23] and decreased [24] global DNA methylation levels. It is important to note that global hypomethylation has been specifically associated with atherosclerotic plaques [25]. Wang et al. [26] found global hypomethylation and the subsequent upregulation of genes implicated in cytokine–cytokine receptor interactions and the MAPK signaling pathway. These molecular changes promote inflammatory responses by recruiting immune cells, thereby contributing to both plaque formation and instability. Additionally, activation of the MAPK signaling pathway by cytokines and stress signals facilitates smooth muscle cell proliferation, macrophage foam cell formation, and apoptosis, processes that drive plaque progression and increase the risk of rupture. Similarly, Zuo et al. [27] demonstrated a correlation between hypomethylation of the interleukin-6 promoter and the development of coronary artery disease. In the current study no significant differences in 5mC levels were observed in relation to the presence of CVD. A possible explanation could be that DNA methylation is affected by both genetic and environmental factors, which could contribute to the inconsistency in the association with CVD observed in the studies. Patient-related factors, such as lifestyle habits, medication use and other comorbidities might also contribute to inconsistent results among

studies. Furthermore, since CVD encompasses a broad spectrum of conditions, changes in DNA methylation could occur at earlier stages of disease development, making it difficult to detect differences at a single time point. Finally, global DNA methylation may vary between tissues. In the current study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used, as liquid-biopsy is considered the most convenient minimally invasive procedure for obtaining biological samples for DNA methylation analysis [28].

One of the known consequences of chronic hyperglycemia is the accumulation of AGEs and increased expression of RAGE, whose interaction activates the NF- κ B signaling pathway [9]. This leads to the production of proinflammatory and prothrombotic factors and further ROS generation, which promotes angiogenesis, oxidative stress, and cell proliferation, thereby contributing to the development of microvascular and macrovascular complications [29]. In the current study, no significant difference in F-AGEs levels was observed between T2DM patients and controls, and there was no significant correlation between global DNA methylation and AGEs levels. Previous studies have emphasized the role of AGEs in the pathogenesis of diabetic complications [30,31], but their direct impact on DNA methylation remains unclear. At this point, it should be mentioned that the method used for the assessment of AGEs has certain limitations, as it only detects fluorescent AGEs, which represent a smaller fraction of the total AGEs in serum. Furthermore, AGEs in serum represent only a part of the body's AGE pool, which includes both circulating AGEs and AGEs accumulated in tissues, whose contribution remains unknown [31]. Our finding of an inverse correlation between 5mC levels and both age and serum glucose concentration (Table 3) suggests that advanced age and poor glycemic control may contribute to altered DNA methylation patterns. However, although PCA analysis (Table 5) extracted "ageing" and "hyperglycemic" factors, including glucose and F-AGEs levels, these factors were not shown to be independent predictors of global DNA hypomethylation in this patient group (Table 6). This brings to attention the need to further investigate the role of glucose itself and F-AGEs on DNA methylation in patients with poorly controlled diabetes.

Another feature of poorly regulated T2DM is the presence of oxidative stress and inflammation (Table 2), both of which can promote DNA hypomethylation by affecting key enzymes involved in epigenetic regulation, namely DNMTs and ten-eleven translocation (TET) enzymes [32]. DNMTs are responsible for maintaining established DNA methylation patterns and adding new methyl groups, a process known as *de novo* methylation. In contrast, TET enzymes catalyze the reverse process, by initiating DNA demethylation through the oxidation of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), ultimately resulting in the demethylation of cytosine. Since molecular oxygen is required for TET activity, oxidative stress could increase TET activity due to the increased bioavailability of oxygen, leading to the production of 5hmC and subsequent DNA demethylation [33]. In addition, ROS inhibit DNMT activity by directly oxidizing the enzyme, altering its structure and function, and damaging DNA, which prevents proper DNMT binding [34]. Besides, ROS can interfere with the availability of the essential cofactor S-adenosylmethionine (SAM), which serves as a methyl group donor, further reducing DNA methylation. Indeed, multivariate regression analysis identified older age and exhausted antioxidative defense mechanisms as significant independent predictors of reduced global DNA methylation levels in our T2DM patients. More importantly, PCA analysis has identified the "pro-oxidant factor" as the only independent predictor of DNA hypomethylation (Table 6). These associations suggest that exacerbated OS is a major driver of aberrant DNA methylation in poorly controlled T2DM.

Our findings contribute to the growing body of evidence linking oxidative stress and inflammation to global DNA methylation alterations in T2DM. In our cohort, patients with poorly controlled T2DM exhibited significantly disturbed redox balance, as reflected by

increased TOS, PAB, IMA, and AOPP levels, alongside decreased TAS and SH-groups (Table 3). As previously described, oxidative stress can affect global DNA methylation through both direct DNA damage and modulation of DNMT and TET enzymes [32,33]. In support of this, we observed negative correlations between 5mC levels and pro-oxidant biomarkers, and positive correlations with antioxidative defense biomarkers (Table 4), suggesting redox-influenced regulation of global DNA methylation. Inflammation also appears to influence the observed epigenetic patterns. Previous studies have shown that inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 can modulate DNMT expression via NF- κ B signaling, ultimately leading to global DNA hypomethylation [35]. Moreover, chronic inflammation, particularly TNF- α , contributes to ROS production, thereby indirectly promoting DNA hypomethylation [36]. In our study, hsCRP and MLR were significantly elevated in the T2DM group (Table 3) and showed negative correlations with 5mC levels (Table 4), suggesting that sustained inflammation may contribute to global DNA hypomethylation. In line with our results, Cucoreanu et al. [37] reported a link between elevated CRP and reduced global DNA methylation in obese individuals. Taken together, these findings suggest that persistent oxidative stress and inflammation in poorly controlled T2DM may contribute to epigenetic remodeling, and that such molecular changes are reflected in accessible blood-based redox, inflammatory and epigenetic biomarkers.

Emerging evidence suggests that nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), an enzyme that catalyzes the methylation of nicotinamide, may play a role in the pathophysiology of T2DM and metabolic syndrome. NNMT activity affects both methyl group availability, by consuming SAM, and NAD⁺ biosynthesis, by depleting nicotinamide and limiting the NAD salvage pathway [38,39]. These metabolic effects have been linked to increased oxidative stress, insulin resistance, and enhanced production of proinflammatory mediators such as TNF- α , IL-6, and CRP [40]. In this context, elevated NNMT expression may represent a shared upstream mechanism contributing to the observed alterations in global DNA methylation, redox imbalance, and chronic inflammation in poorly controlled T2DM. Although NNMT expression was not investigated in our study, its potential relevance to the epigenetic landscape warrants further exploration. Notably, several NNMT inhibitors have already been developed, some of which show promise in restoring metabolic balance and attenuating inflammation and oxidative stress [41–43]. The inclusion of NNMT-related pathways in future epigenetic and biomarker studies may offer new mechanistic and therapeutic perspectives.

At present, DNA methylation is considered an integral part of the “metabolic memory” concept, which has been proposed to explain the long-term effects of glycemic control on the risk of diabetes complications. Metabolic memory refers to the phenomenon in which past episodes of hyperglycemia leave lasting effects on cellular function and gene expression, even after glycemic control is improved [44]. Our findings, which demonstrate significantly altered DNA methylation patterns in poorly controlled T2DM patients and their association with redox and inflammatory biomarkers (Table 4), are consistent with the assumption of Dong et al. [44] that the persistence of metabolic memory can lead to sustained oxidative stress and inflammation, further exacerbating epigenetic modifications and promoting the progression of diabetic complications.

Our study has several limitations. First, the relatively small sample size and the limited number of patients within subgroups restrict the strength of conclusions related to specific complications. Second, the cross-sectional design precludes assessment of causality or temporal dynamics, thereby limiting the interpretation of global DNA methylation as a potential predictor of disease progression. Longitudinal studies with repeated measurements are needed to confirm these associations over time. Third, since F-AGEs represent only a fraction of the total AGE pool, sole reliance on F-AGEs may not fully capture the

complexity of AGE-related oxidative damage and may partially explain the lack of correlation with DNA methylation levels. Finally, the potential confounding effects of medication use among patients cannot be excluded. To better understand the interplay between global DNA methylation, oxidative stress and inflammation in poorly controlled T2DM, further studies with larger cohorts, longitudinal follow-up and more comprehensive assessment of AGEs and other confounding factors are needed.

4. Materials and Methods

4.1. Study Participants

This multicentric study involved 107 patients with poorly regulated T2DM and 56 controls. The control subjects were healthy volunteers employed at the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, while the patients were recruited from the Clinical Hospital Center Zvezdara, the Clinical Hospital Center Dr. Dragisa Misovic—Dedinje, in Belgrade, and the General Hospital in Pozarevac. Patients were selected on the basis of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) values (>7%), indicating poorly controlled diabetes. The collected data encompassed demographic and clinical variables, including age, gender, weight and height, smoking habits, duration of diabetes, hypertension, medications, and presence of complications. The patients' data were collected from medical records by the attending clinicians. The data of the control subjects were collected through interviews. Hypertension was defined as systolic blood pressure of ≥ 130 mmHg and/or diastolic blood pressure of ≥ 80 mmHg, or ongoing antihypertensive treatment. Obesity was defined as a body mass index (BMI) of ≥ 30 kg/m². BMI was calculated for each patient by dividing weight in kilograms by the square of height in meters.

In the T2DM group, 27 patients (25.2%) received insulin, 37 patients (34.6%) were treated with oral hypoglycemic agents (OHAs), and 31 patients (29.0%) received a combination of insulin and OHAs. The remaining 12 patients (11.2%) reported no prior use of antidiabetic therapy. In particular, of the 68 patients receiving OHAs, 29 patients (42.65%) used metformin, 6 patients (8.82%) used sulfonylureas, 3 patients (4.41%) used SGLT2 inhibitors, one patient (1.47%) used dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors, and one patient (1.47%) used thiazolidinediones, while 28 patients (41.2%) used two or more types of OHAs. In addition, 19 patients (17.8%) received statins and 66 patients (61.7%) received antihypertensives.

The study adhered to the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki and received approval from the Ethics Committees of all three hospitals: Clinical Hospital Center Dr. Dragisa Misovic—Dedinje (protocol number: 01-5656/24), Clinical Hospital Center Zvezdara (protocol number: 15/10/2020) and General Hospital in Pozarevac (protocol number: 7190/2020) and University of Belgrade—Faculty of Pharmacy (protocol number: 835/2 and 2566/3). Written informed consents were obtained from all study participants.

4.2. Laboratory Analyses

The blood samples were collected after overnight fasting. Serum TC, TG, and HDL-C levels were determined using routine laboratory tests (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The LDL-C levels were then calculated by the Friedewald equation. Serum glucose levels were measured enzymatically (Dimension RxL Max, Siemens, Erlangen, Germany), and HbA_{1c} levels were measured using an immunoturbidimetric method (Innova Star, DiaSys; Dimension EXL, Siemens, Erlangen, Germany). The complete blood count (CBC) analysis was performed using the Sysmex XN-1000 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). Leukocyte-based indices were calculated as follows: NLR by dividing the number of neutrophils by the number of lymphocytes, NWR by dividing the number of neutrophils by the number of leukocytes, MLR by dividing the number of monocytes by the number of lymphocytes,

MWR by dividing the number of monocytes by the number of leukocytes, LWR by dividing the number of lymphocytes by the number of leukocytes, and the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) by dividing the number of platelets by the number of lymphocytes.

The assessment of redox status included spectrophotometric measurement of pro-oxidant biomarkers: TOS and PAB; oxidative damage biomarkers: IMA and AOPP; and antioxidant defense biomarkers: TAS, SOD activity, and SH-groups content. These measurements were performed according to previously published methods [45] using the ILAB 300 Plus analyzer (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy).

The concentration of fluorescent AGEs (F-AGEs) was measured in serum using a rapid spectrofluorimetric detection method, as previously described [46]. In brief, serum samples were diluted 50-fold with phosphate-buffered saline (PBS) and thoroughly mixed. Then, 300 μ L of the diluted serum was transferred into black 96-well plates. Absorbance was measured at excitation and emission wavelengths of 355 nm and 460 nm, respectively, using a Spectrofluorimeter Appliskan (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) with SkanIt Software 2.3 RE for Appliskan. PBS was used as a blank control. Fluorescence intensity was expressed in arbitrary units per milliliter of serum (AU/mL).

4.3. Assessment of Global DNA Methylation

Global DNA methylation was assessed in PBMCs. The analysis of global DNA methylation included several consecutive steps: isolation of PBMCs from whole blood, extraction of DNA from PBMCs, hydrolysis of DNA to nucleosides, and quantification of nucleosides using ultra-high-performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD).

PBMCs were isolated from whole blood using the optimized Ficoll density gradient method. Briefly, whole blood was collected with the K₂EDTA anticoagulant and centrifuged at 1800 g for 10 min. The white blood cells were then mixed with an equal volume of PBS. After several centrifugation and washing steps with PBS, the PBMCs were stored at -80°C until use. DNA was extracted from the PBMCs using the FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. DNA quantification was performed using the Spectrostar NANO LVis Plate (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). DNA purity and integrity were validated by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm, comparing the absorbance ratios at these wavelengths, and by agarose gel electrophoresis. Hydrolysis of 6 μ g DNA per sample was carried out using the DNA Degradase PlusTM (Zymo Research, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer's instruction. All hydrolysates were freshly prepared prior to UHPLC analysis.

The reversed-phase chromatography method was adapted from Crescenti et al. [47] for use with small sample volumes and for faster separation. UHPLC was performed on an UltiMateTM 3000 Basic Automated System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a ZORBAX Eclipse X DB-C18 HPLC guard column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using methanol/water as the mobile phase. The gradient chromatography conditions that provided the best separation were as follows: for the first 10 min, 5% methanol was used, followed by a gradual increase to 100% methanol over the next 5 min. From 15 to 25 min, the flow was maintained with 100% methanol. Then, over the next 5 min (up to 30 min), methanol was decreased back to 5%, and this concentration was maintained until the end of the analysis at 60 min. The flow rate was kept constant at 1 mL/min. The column was heated to 30°C . Calibration curves for 5mC and deoxycytidine (dC) were constructed, based on serial dilutions of commercially available standards. In hydrolyzed DNA, the percentage of global DNA methylation was calculated as the percentage of 5mC in total cytosine (5mC + dC), where concentrations were derived from the area under the

curve (AUC) of HPLC peaks, using Chromeleon™ Chromatography Data System software v7.2.4.8179 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.4. Statistical Analysis

Data were presented as means $\pm$ standard deviations or medians with interquartile ranges for continuous variables and as relative or absolute frequencies for categorical variables. Comparisons between groups were performed using Student's *t*-tests or Mann–Whitney U tests for continuous variables and Chi-square tests for categorical variables. Spearman correlation coefficients were calculated to examine associations between variables. Multiple linear regression analysis was employed to identify independent predictors of global DNA methylation levels. PCA with varimax-normalized rotation was performed to extract factors, which were then included in a binary logistic regression analysis to test for a possible independent association with DNA hypomethylation in T2DM, defined as 5mC levels below the 25th percentile (5mC < 3.40%). In PCA analysis, an eigenvalue >1 was used to extract factors, and variables with factor loadings >0.5 were considered for interpretation. Statistical analysis was performed using PASW® Statistic v.18 (Chicago, IL, USA). A significance level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

5. Conclusions

Our research revealed that patients with poorly controlled T2DM have global DNA hypomethylation that worsens with increasing age, longer duration of diabetes, and the presence of microvascular complications, particularly diabetic foot ulcers. However, the relatively small number of participants in subgroups with microvascular complications limits the strength of conclusions that can be drawn regarding specific complications. Additionally, we identified the “pro-oxidant factor” as a significant predictor of DNA hypomethylation in poorly controlled T2DM. Overall, these results highlight the complex interplay between epigenetic modifications, inflammation, and oxidative stress in poorly controlled T2DM. Lower global DNA methylation levels in T2DM patients, particularly in those with longer disease duration and severe complications, point out the potential of global DNA methylation as a biomarker for disease progression. Future longitudinal studies are essential to validate the predictive potential of 5mC for disease progression.

Author Contributions: Conceptualization, J.K.-S., A.Z. and J.V.; methodology, S.V., J.K.-S., Z.V., S.S., A.Z. and J.V.; formal analysis, S.V.; investigation, S.V., T.B.Z., M.V., M.M.P., I.P.B. and B.K.-U.; resources, Z.V., T.B.Z., M.V., M.M.P., I.P.B., B.K.-U., S.I.-M., T.S. and S.B.; writing—original draft preparation, S.V.; writing—review and editing, J.K.-S., M.R., A.Z. and J.V.; supervision, M.V. and J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministry of Science, Technological Development and Innovation, Republic of Serbia, grant number 451-03-136/2025-03/200161 and No: 451-03-137/2025-03/200161.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Clinical Hospital Center “Dr. Dragisa Misovic—Dedinje” (protocol code: 01-5656/24 dated 24 April 2019), Clinical Hospital Center “Zvezdara” (protocol code: 15/10/2020 dated 15 October 2020) and General Hospital in Pozarevac (protocol code: 7190/2020 dated 30 December 2020) and University of Belgrade—Faculty of Pharmacy (protocol code: 835/2 dated 12 April 2022; protocol code: 2566/3 dated 19 November 2024).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy and ethics considerations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

5mC	5-methylcytosine
AGE	Advanced Glycation End Products
AOPP	Advanced Oxidation Protein Products
AU	Arbitrary Units
BMI	Body Mass Index
CBC	Complete Blood Count
CG	Control Group
CVD	Cardiovascular Disease
dC	Deoxycytidine
DNMTs	DNA Methyltransferases
DPP-4	Dipeptidyl Peptidase-4
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F-AGEs	Fluorescent Advanced Glycation End Products
HbA1c	Glycated Hemoglobin
HDL-C	High-Density Lipoprotein Cholesterol
HPLC/UHPLC-DAD	(Ultra) High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection
hsCRP	High-Sensitivity C-Reactive Protein
IMA	Ischemia-Modified Albumin
KMO	Kaiser-Meyer-Olkin
LDL-C	Low-Density Lipoprotein Cholesterol
LUMA	Luminometric Methylation Assay
LWR	Lymphocyte-to-White Blood Cell Ratio
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MLR	Monocyte-to-Lymphocyte Ratio
MWR	Monocyte-to-White Blood Cell Ratio
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLR	Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio
NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase
NWR	Neutrophil-to-White Blood Cell Ratio
OHAs	Oral Hypoglycemic Agents
PAB	Prooxidant-Antioxidant Balance
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PLR	Platelet-to-Lymphocyte Ratio
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
ROS	Reactive Oxygen Species
SAM	S-adenosylmethionine
SH-groups	Sulfhydryl Groups
SOD	Superoxide Dismutase
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
TAS	Total Antioxidant Status
TC	Total Cholesterol
TG	Triglycerides
TET	Ten-Eleven Translocation
TOS	Total Oxidant Status

References

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 16. Diabetes Care in the Hospital: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care* **2024**, *47*, S295–S306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mannar, V.; Boro, H.; Patel, D.; Agstam, S.; Dalvi, M.; Bundela, V. Epigenetics of the Pathogenesis and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *touchREV Endocrinol.* **2023**, *19*, 46–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sriraman, A.; Debnath, T.K.; Xhemalce, B.; Miller, K.M. Making It or Breaking It: DNA Methylation and Genome Integrity. *Essays Biochem.* **2020**, *64*, 687–703. [[CrossRef](#)]
4. Kriebel, J.; Herder, C.; Rathmann, W.; Wahl, S.; Kunze, S.; Molnos, S.; Volkova, N.; Schramm, K.; Carstensen-Kirberg, M.; Waldenberger, M.; et al. Association between DNA Methylation in Whole Blood and Measures of Glucose Metabolism: KORA F4 Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152314. [[CrossRef](#)]
5. Pfeiffer, L.; Wahl, S.; Pilling, L.C.; Reischl, E.; Sandling, J.K.; Kunze, S.; Holdt, L.M.; Kretschmer, A.; Schramm, K.; Adamski, J.; et al. DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2015**, *8*, 334–342. [[CrossRef](#)]
6. Vekic, J.; Stromsnes, K.; Mazzalai, S.; Zeljkovic, A.; Rizzo, M.; Gambini, J. Oxidative Stress, Atherogenic Dyslipidemia, and Cardiovascular Risk. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Pezone, A.; Olivieri, F.; Napoli, M.V.; Procopio, A.; Avvedimento, E.V.; Gabrielli, A. Inflammation and DNA Damage: Cause, Effect or Both. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2023**, *19*, 200–211. [[CrossRef](#)]
8. Yarbeygi, H.; Sathyapalan, T.; Atkin, S.L.; Sahebkar, A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 8609213. [[CrossRef](#)]
9. Vekic, J.; Vujcic, S.; Bufan, B.; Bojanin, D.; Al-Hashmi, K.; Al-Rasadi, K.; Stoian, A.P.; Zeljkovic, A.; Rizzo, M. The Role of Advanced Glycation End Products on Dyslipidemia. *Metabolites* **2023**, *13*, 77. [[CrossRef](#)]
10. Islam, S.; Moinuddin, Mir, A.R.; Arfat, M.Y.; Alam, K.; Ali, A. Studies on Glycooxidatively Modified Human IgG: Implications in Immuno-Pathology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 19–29. [[CrossRef](#)]
11. Kowluru, R.A. Cross Talks between Oxidative Stress, Inflammation and Epigenetics in Diabetic Retinopathy. *Cells* **2023**, *12*, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, W.; Mani, A.M.; Wu, Z.-H. DNA Damage-Induced Nuclear Factor-Kappa B Activation and Its Roles in Cancer Progression. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2017**, *3*, 45–59. [[CrossRef](#)]
13. Ehrlich, M. DNA Hypermethylation in Disease: Mechanisms and Clinical Relevance. *Epigenetics* **2019**, *14*, 1141–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Luttmer, R.; Spijkerman, A.M.; Kok, R.M.; Jakobs, C.; Blom, H.J.; Serne, E.H.; Dekker, J.M.; Smulders, Y.M. Metabolic Syndrome Components Are Associated with DNA Hypomethylation. *Obes. Res. Clin. Pract.* **2013**, *7*, e106–e115. [[CrossRef](#)]
15. Pinzón-Cortés, J.A.; Perna-Chaux, A.; Rojas-Villamizar, N.S.; Díaz-Basabe, A.; Polanía-Villanueva, D.C.; Jácome, M.F.; Mendivil, C.O.; Groot, H.; López-Segura, V. Effect of Diabetes Status and Hyperglycemia on Global DNA Methylation and Hydroxymethylation. *Endocr. Connect.* **2017**, *6*, 708–725. [[CrossRef](#)]
16. Nadiger, N.; Veed, J.K.; Chinya Nataraj, P.; Mukhopadhyay, A. DNA Methylation and Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Clin. Epigenetics* **2024**, *16*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Volkmar, M.; Dedeurwaerder, S.; Cunha, D.A.; Ndlovu, M.N.; Defrance, M.; Deplus, R.; Calonne, E.; Volkmar, U.; Igoillo-Esteve, M.; Naamane, N.; et al. DNA Methylation Profiling Identifies Epigenetic Dysregulation in Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic Patients. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1405–1426. [[CrossRef](#)]
18. Thongsroy, J.; Mutirangura, A. Decreased Alu Methylation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Increases HbA1c Levels. *J. Clin. Lab Anal.* **2023**, *37*, e24966. [[CrossRef](#)]
19. Muka, T.; Nano, J.; Voortman, T.; Braun, K.V.E.; Ligthart, S.; Stranges, S.; Bramer, W.M.; Troup, J.; Chowdhury, R.; Dehghan, A.; et al. The Role of Global and Regional DNA Methylation and Histone Modifications in Glycemic Traits and Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2016**, *26*, 553–566. [[CrossRef](#)]
20. Lisanti, S.; Omar, W.A.W.; Tomaszewski, B.; De Prins, S.; Jacobs, G.; Koppen, G.; Mathers, J.C.; Langie, S.A.S. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79044. [[CrossRef](#)]
21. Maghbooli, Z.; Hossein-nezhad, A.; Larijani, B.; Amini, M.; Keshtkar, A. Global DNA Methylation as a Possible Biomarker for Diabetic Retinopathy. *Diabetes Metab. Res.* **2015**, *31*, 183–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, H.-H.; Han, X.; Wang, M.; Hu, Q.; Li, S.; Wang, M.; Hu, J. The Association between Genomic DNA Methylation and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* **2019**, *2019*, 2494057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tsuboi, Y.; Yamada, H.; Munetsuna, E.; Fujii, R.; Yamazaki, M.; Ando, Y.; Mizuno, G.; Ishikawa, H.; Ohashi, K.; Hashimoto, S.; et al. Global DNA Hypermethylation in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Cardiovascular Disease Risk: A Population-Based Propensity Score-Matched Cohort Study. *J. Epidemiol. Community Health* **2021**, *75*, 890–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Baccarelli, A.; Wright, R.; Bollati, V.; Litonjua, A.; Zanobetti, A.; Tarantini, L.; Sparrow, D.; Vokonas, P.; Schwartz, J. Ischemic Heart Disease and Stroke in Relation to Blood DNA Methylation. *Epidemiology* **2010**, *21*, 819–828. [[CrossRef](#)]

25. Aavik, E.; Lumivuori, H.; Leppänen, O.; Wirth, T.; Häkkinen, S.-K.; Bräsen, J.-H.; Beschorner, U.; Zeller, T.; Braspenning, M.; van Criekinge, W.; et al. Global DNA Methylation Analysis of Human Atherosclerotic Plaques Reveals Extensive Genomic Hypomethylation and Reactivation at Imprinted Locus 14q32 Involving Induction of a miRNA Cluster. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 993–1000. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang, C.; Ni, W.; Yao, Y.; Just, A.; Heiss, J.; Wei, Y.; Gao, X.; Coull, B.A.; Kosheleva, A.; Baccarelli, A.A.; et al. DNA Methylation-Based Biomarkers of Age Acceleration and All-Cause Death, Myocardial Infarction, Stroke, and Cancer in Two Cohorts: The NAS, and KORA F4. *eBioMedicine* **2021**, *63*, 103151. [\[CrossRef\]](#)
27. Zuo, H.-P.; Guo, Y.-Y.; Che, L.; Wu, X.-Z. Hypomethylation of Interleukin-6 Promoter Is Associated with the Risk of Coronary Heart Disease. *Arq. Bras. Cardiol.* **2016**, *107*, 131–136. [\[CrossRef\]](#)
28. Constâncio, V.; Nunes, S.P.; Henrique, R.; Jerónimo, C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells* **2020**, *9*, 624. [\[CrossRef\]](#)
29. Lee, J.; Yun, J.-S.; Ko, S.-H. Advanced Glycation End Products and Their Effect on Vascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* **2022**, *14*, 3086. [\[CrossRef\]](#)
30. Sun, X.; Gan, H.; Xia, Y. Changes of Serum Advanced Glycation End Products (AGEs), Matrix Metalloprotein-2 (MMP-2), and Urinary Microalbuminuria (mALB) in Diabetic Nephropathy and Their Predictive Value for Heart Failure. *Transl. Androl. Urol.* **2021**, *10*, 1279–1285. [\[CrossRef\]](#)
31. Kuzan, A. Toxicity of Advanced Glycation End Products (Review). *Biomed. Rep.* **2021**, *14*, 46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. García-Guede, Á.; Vera, O.; Ibáñez-de-Caceres, I. When Oxidative Stress Meets Epigenetics: Implications in Cancer Development. *Antioxidants* **2020**, *9*, 468. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Chen, H.-F.; Wu, K.-J. Epigenetics, TET Proteins, and Hypoxia in Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumorigenesis. *Biomedicine* **2016**, *6*, 1. [\[CrossRef\]](#)
34. Rubio, K.; Hernández-Cruz, E.Y.; Rogel-Ayala, D.G.; Sarvari, P.; Isidoro, C.; Barreto, G.; Pedraza-Chaverri, J. Nutriepigenomics in Environmental-Associated Oxidative Stress. *Antioxidants* **2023**, *12*, 771. [\[CrossRef\]](#)
35. Yi, Y.-S. Functional Interplay between Methyltransferases and Inflammasomes in Inflammatory Responses and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Crosswhite, P.; Sun, Z. TNF α Induces DNA and Histone Hypomethylation and Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation Partly via Excessive Superoxide Formation. *Antioxidants* **2024**, *13*, 677. [\[CrossRef\]](#)
37. Cucoreanu, C.; Tigiu, A.-B.; Nistor, M.; Moldovan, R.-C.; Pralea, I.-E.; Iacobescu, M.; Iuga, C.-A.; Szabo, R.; Dindelegan, G.-C.; Ciuce, C. Epigenetic and Molecular Alterations in Obesity: Linking CRP and DNA Methylation to Systemic Inflammation. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *46*, 7430–7446. [\[CrossRef\]](#)
38. Sun, W.-D.; Zhu, X.-J.; Li, J.-J.; Mei, Y.-Z.; Li, W.-S.; Li, J.-H. Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT): A Novel Therapeutic Target for Metabolic Syndrome. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1410479. [\[CrossRef\]](#)
39. Campagna, R.; Mazzanti, L.; Pompei, V.; Alia, S.; Vignini, A.; Emanuelli, M. The Multifaceted Role of Endothelial Sirt1 in Vascular Aging: An Update. *Cells* **2024**, *13*, 1469. [\[CrossRef\]](#)
40. Kim, H.C.; Mofarrahi, M.; Vassilakopoulos, T.; Maltais, F.; Sigala, I.; Debigare, R.; Bellenis, I.; Hussain, S.N.A. Expression and Functional Significance of Nicotinamide N-Methyl Transferase in Skeletal Muscles of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, *181*, 797–805. [\[CrossRef\]](#)
41. van Haren, M.J.; Gao, Y.; Buijs, N.; Campagna, R.; Sartini, D.; Emanuelli, M.; Mateuszuk, L.; Kij, A.; Chlopicki, S.; Escudé Martinez de Castilla, P.; et al. Esterase-Sensitive Prodrugs of a Potent Bisubstrate Inhibitor of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) Display Cellular Activity. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. van Haren, M.J.; Zhang, Y.; Thijssen, V.; Buijs, N.; Gao, Y.; Mateuszuk, L.; Fedak, F.A.; Kij, A.; Campagna, R.; Sartini, D.; et al. Macrocyclic Peptides as Allosteric Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT). *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 1546–1555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Gao, Y.; van Haren, M.J.; Buijs, N.; Innocenti, P.; Zhang, Y.; Sartini, D.; Campagna, R.; Emanuelli, M.; Parsons, R.B.; Jespers, W.; et al. Potent Inhibition of Nicotinamide N-Methyltransferase by Alkene-Linked Bisubstrate Mimics Bearing Electron Deficient Aromatics. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 12938–12963. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dong, H.; Sun, Y.; Nie, L.; Cui, A.; Zhao, P.; Leung, W.K.; Wang, Q. Metabolic Memory: Mechanisms and Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 38. [\[CrossRef\]](#)
45. Klisic, A.; Kavaric, N.; Ninic, A.; Kotur-Stevuljevic, J. Oxidative Stress and Cardiometabolic Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 18455. [\[CrossRef\]](#)

46. Pia De La Maza, M.; Garrido, F.; Escalante, N.; Leiva, L.; Barrera, G.; Schnitzler, S.; Zanolli, M.; Verdaguer, J.; Hirsch, S.; Jara, N.; et al. Fluorescent Advanced Glycation End-Products (Ages) Detected by Spectro-Photofluorimetry, as a Screening Tool to Detect Diabetic Microvascular Complications. *J. Diabetes Mellit.* **2012**, *02*, 221–226. [[CrossRef](#)]
47. Crescenti, A.; Solà, R.; Valls, R.M.; Caimari, A.; Del Bas, J.M.; Anguera, A.; Anglés, N.; Arola, L. 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*, e65744. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in Patients with Diabetic Foot

Sanja Vujčić ¹, Jelena Kotur-Stevuljević ¹, Jelena Vekić ¹, Iva Perović-Blagojević ² , Tatjana Stefanović ³,
Sanja Ilić-Mijailović ², Branka Koprivica Uzelac ², Srećko Bosić ³, Tamara Antonić ¹, Azra Guzonjić ¹,
Ana-Marija Mastilović ², Zorica Marković ² and Manfredi Rizzo ^{4,*} 

¹ Department of Medical Biochemistry, University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, 11000 Belgrade, Serbia

² Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović—Dedinje”, 11000 Belgrade, Serbia

³ General Hospital Požarevac, 12000 Požarevac, Serbia

⁴ Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties, University of Palermo, 90100 Palermo, Italy

* Correspondence: manfredi.rizzo@unipa.it

Abstract: *Background and Objectives:* Diabetic foot (DF) development is driven by complex interactions of hyperglycemia, inflammation, and oxidative stress (OS). We aimed to investigate OS and inflammatory biomarkers in patients with DF and their potential to improve early diagnosis and management of DF. *Materials and Methods:* The prooxidant–antioxidant balance (PAB), superoxide dismutase (SOD), total oxidative status (TOS), total sulfhydryl groups (SHG), routine biochemical parameters, and complete blood count were determined in 42 patients with type-2 DM, of which 23 patients had DF, while 19 patients were without DF complications. The neutrophils-to-lymphocyte ratio (NLR) was evaluated as a biomarker of inflammation. *Results:* Patients with DF had significantly higher ($p < 0.05$) PAB levels (170 ± 33.9 U/L) compared to those without DF complications (142 ± 31.3 U/L). In addition, patients with DF had significantly reduced SOD activities ($p < 0.01$). NLR values were significantly higher in the DF group (median: 2.8; interquartile range: 2.0–4.3) than in the group without DF (median: 1.4; interquartile range: 1.4–2.1; $p < 0.01$). A positive correlation was found between the PAB and NLR index ($r = 0.449$; $p < 0.05$). The diagnostic accuracy of both PAB (AUC = 0.741; $p < 0.01$) and NLR (AUC = 0.760; $p < 0.01$) was estimated as acceptable. *Conclusions:* In conclusion, the development of DF is associated with enhanced OS and inflammation processes. PAB and NLR could be useful non-invasive biomarkers of DF development.

Keywords: diabetic foot; oxidative stress; diabetes mellitus; PAB; NLR



Citation: Vujčić, S.; Kotur-Stevuljević, J.; Vekić, J.; Perović-Blagojević, I.; Stefanović, T.; Ilić-Mijailović, S.; Koprivica Uzelac, B.; Bosić, S.; Antonić, T.; Guzonjić, A.; et al. Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in Patients with Diabetic Foot. *Medicina* **2022**, *58*, 1866. <https://doi.org/10.3390/medicina58121866>

Academic Editor: Nikolaos Papanas

Received: 19 October 2022

Accepted: 15 December 2022

Published: 17 December 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Type-2 diabetes mellitus (T2DM) is a leading cardiometabolic disorder of the modern age. Despite constant advances in preventive medicine, the global incidence of T2DM remains high [1]. Furthermore, T2DM is often diagnosed too late, when one or more complications have already developed [2,3]. Diabetic foot (DF) is one of the most severe complications of diabetes [4], which considerably worsens the quality of life of the patients [2]. Without adequate early intervention, ischemic foot changes may progress to necrosis and gangrene of the foot [2]. Hence, DF is considered to be the major cause of non-traumatic lower limb amputations [5]. In addition, patients with DF are characterized by increased morbidity and mortality due to cardiovascular disease (CVD) [6]. These data imply that the development of DF and atherosclerosis share common mechanisms.

Evidence-based guidelines consider long-standing diabetes, poor metabolic control, smoking, and the presence of other microvascular and macrovascular complications as the main risk factors for DF development [1,2]. In addition, patients with diabetes are also characterized by enhanced oxidative stress (OS) [7–9], which plays an active role in the

pathogenesis of complications [10]. Recent studies suggest that patients with DF have increased levels of serum prooxidants, including malondialdehyde (MDA) and prooxidative–antioxidative balance (PAB) [11–13]. Furthermore, a depletion of antioxidative mechanisms has been demonstrated in both wound tissue [14] and blood samples [15] of patients with DF. Although serum OS biomarkers are widely used as a non-invasive approach for a redox status assessment, their clinical importance in the etiology of DF has been less studied. To overcome the gaps in the literature, further studies are necessary.

The hyperglycemia-induced overproduction of reactive oxygen species (ROS) significantly contributes to endothelial dysfunction and inflammation [10]. Earlier studies have demonstrated increased levels of inflammatory biomarkers, such as high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), procalcitonin, and interleukin-6, in serum of patients with DF [16,17]. As recently suggested, these biomarkers could add diagnostic and prognostic information in terms of concomitant infection and the risk of amputation and post-operative mortality [18]. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is a readily available and economical biomarker, and a growing body of evidence suggests its clinical significance in patients with cardiometabolic diseases [19]. In line with the previous information, Duman et al. [20] demonstrated increased NLR in patients with poorly regulated T2DM. Recently, a higher NLR index has been demonstrated in patients with DF [21]; moreover, a positive correlation has been reported between elevated NLR and osteomyelitis, increased risk of amputation, and septic complications in patients with DF ulcerations [22].

The aim of this study was to examine the significance of OS and inflammatory biomarkers determination in patients with DF, as well as to investigate their potential to improve early diagnosis and management of DF.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants

This cross-sectional study included 23 patients who were consecutively diagnosed as having DF based on a medical history and standard foot examination according to the national guidelines [2]. These patients were hospitalized at the surgical department of the General Hospital in Požarevac between December 2020 and March 2021 in order to assess the requirement for amputation. Thirteen patients underwent surgery, while the remaining ten were treated conservatively. The study also included 19 patients with T2DM who were treated at the Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović” in Belgrade between April 2019 and March 2020. Additional inclusion criteria for patients treated at the Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović” was poor metabolic control and no previous history or clinical evidence of DF complications. The exclusion criteria for both groups of patients were previous history of COVID-19, which has been confirmed to affect inflammation, OS, and the further course of the underlying disease.

The following demographic and clinical data were collected: age, gender, smoking status, duration of diabetes, presence of comorbidities (hypertension, CVD), and prescribed medications, including oral antidiabetic agents (OAD) and insulin. Following the international guidelines, hypertension was defined as systolic blood pressure (SP) ≥ 130 mmHg and/or diastolic blood pressure (DP) ≥ 80 mmHg and/or current antihypertensive therapy, and obesity was considered in patients who had a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², while the presence of anemia was determined if hemoglobin (Hgb) levels were <135 g/L in men or <120 g/L in women [23,24]. The study was conducted under the ethical principles of the Declaration of Helsinki with the approval of the Ethics Committees of the Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović” and the General Hospital in Požarevac. All patients gave written, informed consent.

2.2. Laboratory Analyses

Blood samples were obtained after the overnight fasting period. In DF patients who required amputation, the sampling was performed before the surgery. The serum glucose concentration was measured by a standard enzymatic method on the Dimension

RxL Max analyzer (Siemens Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany). The level of glycohemoglobin (HbA_{1c}) was determined by the immunoturbidimetric method on the Innova Star (DiaSys Diagnostic Systems, GmbH, Germany) and Dimesion EXL (Siemens Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany) analysers. Complete blood count (CBC) was obtained using the hematologic analyser XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The NLR index was calculated as a ratio of absolute neutrophil-to-leukocyte counts. Redox status assessment included determination of total oxidative status (TOS), prooxidative–antioxidant balance (PAB), SOD activity, and total sulfhydryl groups (SHG) content by spectrophotometric methods, as previously described [25–28].

2.3. Statistical Analysis

The Shapiro–Wilk test was used for testing normality of the data. Normally distributed continuous variables were presented as arithmetic means with standard deviations, while skewed data were presented as medians and interquartile ranges. Normally distributed continuous variables were compared with the Student's *t* test, while skewed variables were compared using the Mann–Whitney U test. Chi-square and Fisher Exact tests were used to analyze categorical variables. Spearman's non-parametric correlation analysis was used to investigate associations between OS and inflammatory and metabolic control biomarkers. Binary logistic regression analysis was used for testing the association of PAB and NLR with DF, while ROC (Receiver Operating Characteristics Curve) analysis was performed to test diagnostic accuracy of these parameters. The discriminatory ability of the test was evaluated according to the Hosmer and Lemeshow criteria. Based on the area under the ROC curve (AUC), the models can be classified as: weak ($0.5 \leq \text{AUC} < 0.7$), acceptable ($0.7 \leq \text{AUC} < 0.8$), excellent ($0.8 \leq \text{AUC} < 0.9$), or extraordinary ($\text{AUC} \geq 0.9$). The probability $p \leq 0.05$ was taken as a condition for the existence of statistical significance. SPSS software (version 18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis.

3. Results

The demographic and clinical data of patients are shown in Table 1. Patients with DF were older than patients without DF ($p < 0.05$), while the distributions of gender, smokers, and patients with hypertension and obesity were similar. The group with DF was also characterized by a longer duration of diabetes ($p < 0.05$) and a higher prevalence of patients treated with insulin ($p < 0.001$). An evaluation of biochemical parameters showed that glucose concentration did not differ significantly between the groups, while the level of HbA_{1c} was significantly lower in patients with DF ($p < 0.05$).

Table 1. Demographic and clinical data of study participants.

Parameter	Without DF	With DF	<i>p</i>
N	19	23	
Age, years	59.2 ± 12.9	66.74 ± 9.4	<0.05
Gender, male/female, %	57.9/42.1	82.6/17.4	0.098
BMI, kg/m ²	31.7 ± 5.7	28.7 ± 4.7	0.116
Diabetes duration, years	7.1 ± 5.6	13.7 ± 7.8	<0.05
Obesity, %	69.2	45.5	0.293
Hypertension, %	88.9	77.3	0.427
Smoking, %	18.8	40.9	0.178
HbA _{1c} , %	9.6 ± 1.7	7.8 ± 1.3	<0.05
Glucose, mmol/L	10.1 ± 3.7	9.7 ± 2.6	0.665
Therapy			
OAD	43.7	30.4	<0.001
OAD + Insulin	43.8	0	<0.001
Insulin	12.5	69.6	<0.001

Abbreviations: BMI, body mass index; OAD, oral antidiabetic drugs; HbA_{1c}, glycated hemoglobin. Data were presented as means ± standard deviations and as relative frequencies. Continuous variables were compared by Student's *t* test and categorical variables by Chi-square and Fisher Exact tests.

We further analyzed the complete blood count (CBC) parameters in both groups. As shown in Table 2, hemoglobin (Hgb) levels and red blood cell (RBC) counts were significantly lower ($p < 0.05$) in patients with DF. Accordingly, a significantly higher prevalence of patients with anemia was presented in the DF group (60.9% in the DF group vs. 20.3% in the group without DF; $p < 0.001$). An analysis of the distribution of white blood cell (WBC) subpopulations showed significantly increased neutrophil and reduced lymphocyte counts in patients with DF. In line with the previous findings, the NLR ratio was significantly higher in the DF group ($p < 0.01$).

Table 2. CBC parameters and NLR index in patients without DF and with DF.

Parameter	Without DF	With DF	<i>p</i>
RBC ($\times 10^{12}$ /L)	4.74 $\pm$ 0.61	4.04 $\pm$ 0.71	<0.05
Hgb, g/L	137.3 $\pm$ 19.7	121.2 $\pm$ 10.8	<0.05
WBC ($\times 10^9$ /L)	7.8 $\pm$ 1.8	8.9 $\pm$ 2.5	0.123
Neutrophils ($\times 10^9$ /L) #	4.0 (3.3–5.3)	5.6 (4.2–6.6)	<0.05
Lymphocytes ($\times 10^9$ /L) #	2.4 (2.1–2.8)	1.9 (1.6–2.3)	<0.05
Monocytes ($\times 10^9$ /L) #	0.6 (0.5–0.7)	0.7 (0.5–0.8)	0.331
NLR #	1.6 (1.3–2.1)	2.8 (2.0–4.3)	<0.01

Abbreviations: RBC, red blood cells; Hgb, hemoglobin; WBC, white blood cells; NLR, neutrophils to lymphocytes ratio. Data were presented as means $\pm$ standard deviations and compared by Student's *t* test variables. # Data were presented as medians (interquartile ranges) and compared by Mann-Whitney U-test.

The parameters of the redox status were presented in Figure 1. We found that the levels of PAB in the DF group (170.4 $\pm$ 33.9 U/L) were significantly higher than the levels (142.5 $\pm$ 31.2 U/L) in patients without DF ($p < 0.01$). On the other hand, superoxide dismutase (SOD) activities were significantly lower ($p < 0.05$) in patients with DF (118.1 $\pm$ 13.6 U/L) as compared to patients without DF complications (134.6 $\pm$ 13.7 U/L). The levels of total oxidative status (TOS) and total sulfhydryl groups (SHG) did not differ significantly between the groups ($p = 0.397$ and $p = 0.123$, respectively).

Further analysis of the DF group showed that levels of PAB (182.4 $\pm$ 26.7 U/L) in patients who underwent amputation ($N = 13$) were higher than the levels (154.9 $\pm$ 37.2 U/L; $p = 0.05$) in patients who did not require amputation ($N = 10$). In addition, DF patients who underwent amputation had significantly reduced levels of SHG (median: 0.15 mmol/L; interquartile range: 0.12–0.28 mmol/L; $p < 0.01$) as compared to those who did not undergo the surgery (median: 0.29 mmol/L; interquartile range: 0.26–0.35 mmol/L). No difference was found in NLR values between the groups ($p = 0.203$).

Next, we examined the association of OS biomarkers with parameters of inflammation in patients with and without DF. In the DF group, a strong positive correlation was found between PAB and NLR values ($r = 0.449$; $p < 0.05$). In contrast, no significant correlations were found between NLR and OS biomarkers in patients without DF (data not shown).

A binary logistic regression analysis revealed that increased levels of both PAB and NLR were significantly associated with the presence of DF (Table 3), while decreased activity of SOD was not (OR = 0.964; 95%CI: 0.930–1.000; $p = 0.05$). The observed associations of PAB and NLR remained significant even after adjustment for age, smoking status, and HbA_{1c} levels. After adjustment for diabetes duration, PAB remained a significant predictor of DF, while the association between the NLR ratio and DF was lost ($p = 0.068$). In the multivariable model that included all confounding variables, PAB remained significantly associated with DF (OR = 1.072; 95%CI: 1.008–1.140; $p < 0.05$) while NLR did not ($p = 0.066$).

Finally, we examined the diagnostic accuracy of PAB and NLR to identify the patients with DF. The diagnostic accuracy of both PAB (AUC = 0.741; 95%CI: 0.590–0.893; $p < 0.01$) and NLR (AUC = 0.760; 95%CI: 0.608–0.911; $p < 0.01$) was acceptable. ROC curves for PAB and NLR were presented in Figure 2. For the PAB cut-off value of 149 U/L, the sensitivity of the test was 82.6%, while the specificity was 68%. For the NLR cut-off value of 1.9, the sensitivity of the test was 78.3% and the specificity was 64.7%. Furthermore, we found

that a combination of PAB and NLR additionally improved the diagnostic accuracy for DF (AUC = 0.790; 95% CI: 0.651–0.930; $p < 0.01$).

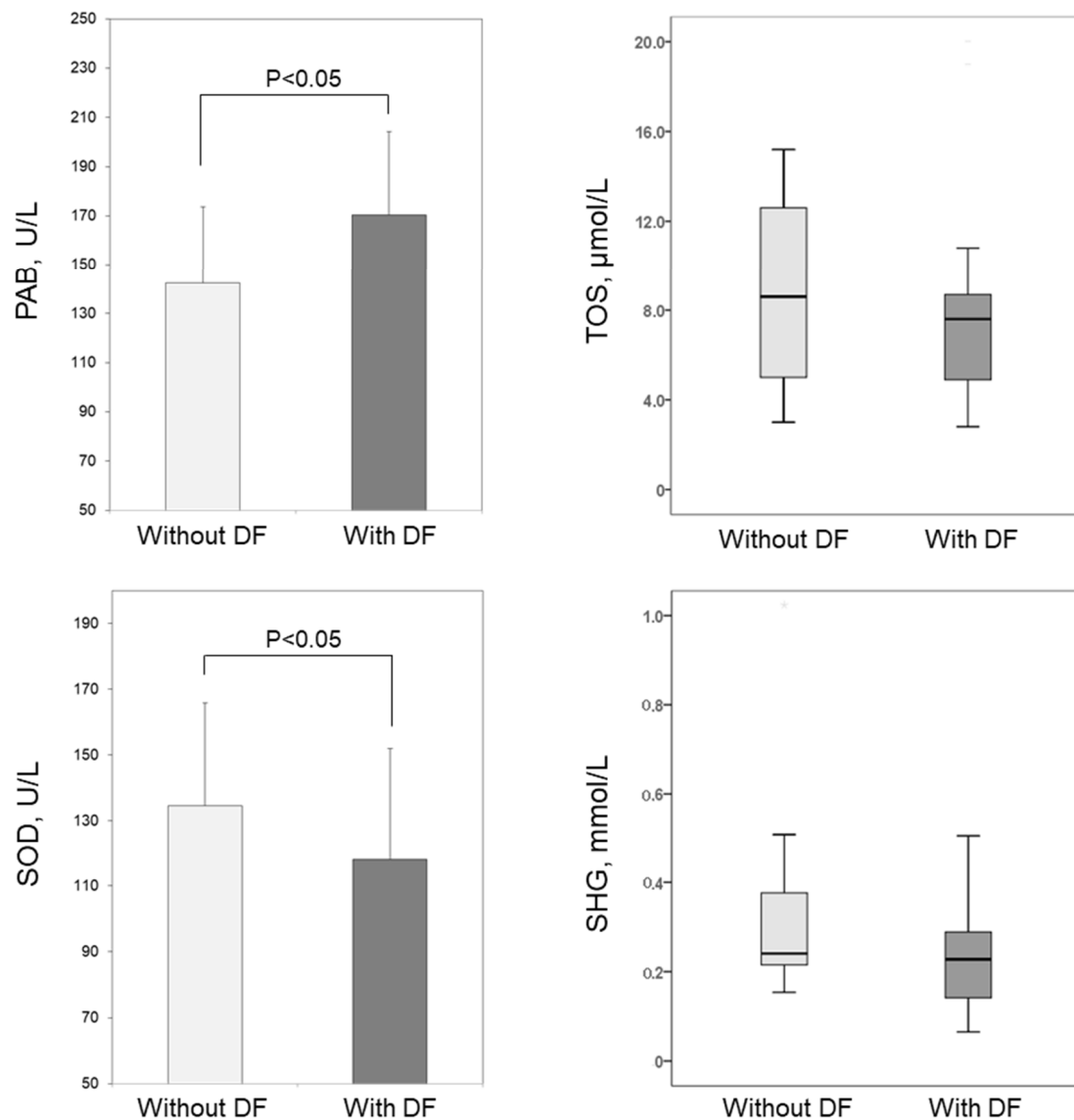


Figure 1. Biomarkers of OS in patients without DF and with DF. The levels of PAB and SOD were presented as means and standard deviations, and the levels of TOS and SHG as medians and interquartile ranges. Abbreviations: PAB, prooxidative-antioxidative balance; SOD, superoxide dismutase; TOS, total oxidative status; SHG, total sulfhydryl groups.

Table 3. Logistic regression analysis for the association of PAB and NLR with DF.

	PAB		NLR	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Univariate	1.026 (1.005–1.048)	<0.05	2.812 (1.206–6.568)	<0.05
Adjusted for:				
Age (years)	1.024 (1.003–1.046)	<0.05	2.684 (1.106–6.513)	<0.05
Diabetes duration (years)	1.043 (1.008–1.080)	<0.05	2.915 (0.924–9.196)	0.068
Smoking	1.035 (1.009–1.062)	<0.05	2.621 (1.101–6.230)	<0.05
HbA _{1c} (%)	1.057 (1.014–1.102)	<0.05	4.632 (1.090–19.677)	<0.05

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

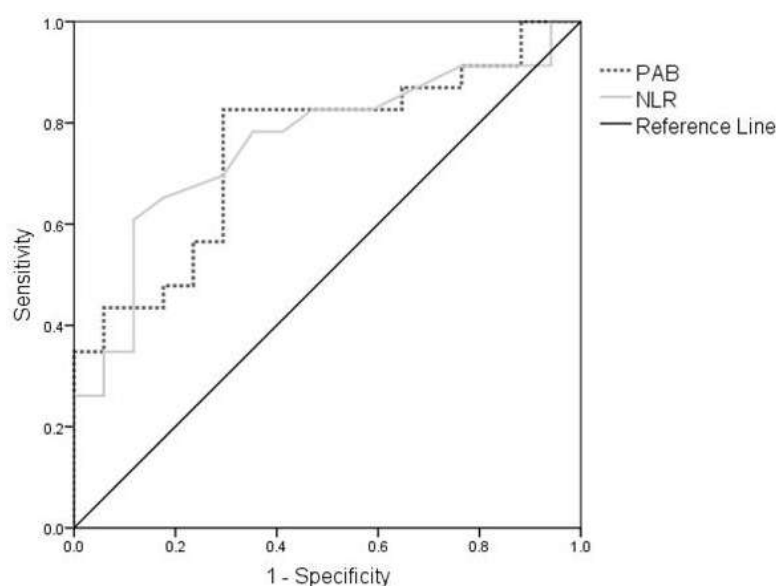


Figure 2. ROC curve for PAB and NLR. Abbreviations: ROC, Receiver operating characteristic curve; PAB, prooxidant-antioxidant balance; NLR, neutrophils-to-lymphocyte ratio.

4. Discussion

In this study, we found that patients with DF are characterized by proinflammatory and prooxidative states, which are reflected by elevated levels of inflammatory biomarker NLR, increased serum prooxidants, and a concomitant decrease of antioxidative mechanisms. In addition, our data showed that elevated PAB and NLR are associated with the presence of DF. We wish to clarify that in the present study we included all patients consecutively diagnosed with DF in a 4-month period in the General Hospital. Given that the study was conducted during the COVID-19 pandemic, we only included patients who did not have a history of COVID-19 in order to avoid the impact of SARS-CoV-2 virus infection on inflammation or oxidative stress, as well as the impact of COVID-19 itself on the course of diabetes. As a result of this, our study has a relatively small sample size of 23 patients with DF, although previous studies in DF patients also had similar sample sizes.

Diabetic foot is one of the most serious complications of diabetes, which reduces the quality of life and life expectancy of the patients. For this reason, timely recognition of risk factors in order to improve prevention of DF development and delay amputation is of critical importance. Among the risk factors for DF development, a longer duration of diabetes has been recognized as one of the principal contributors [2]. In line with the previous statement, DF patients included in our study suffered from diabetes longer than patients without DF (Table 1). In both groups, the majority of patients had poorly regulated diabetes and hypertension, a common T2DM comorbidity (Table 1). Similarly, the prevalence of obese patients in the DF group did not differ from the group without DF. This finding is consistent with the study of Lavery et al. [29], which demonstrated that obesity, although a risk factor for T2DM, is not directly associated with the development of foot ulcerations.

Hyperglycemia due to poor metabolic control is recognized as the main initiator of cellular damage, which precedes the development of DF [10]. In the current study, significantly lower HbA_{1c} levels were observed in the DF group (Table 1), and such an unexpected result was further ascribed to a high percentage of anemic patients in the DF group (Table 2). The most common form of anemia in DF patients is anemia of chronic disease [30]. Namely, chronic inflammation is characterized by cytokine overproduction, which may suppress the synthesis of erythropoietin [31]. In addition, intestinal absorption of iron is inhibited by hepcidin upregulation, which reduces its availability for erythropoiesis [32]. Thus, inability to increase erythropoietin concentration in response to decreased Hgb is considered to be the main cause of anemia in DF [30]. Our data clearly demonstrate the limitation of

HbA_{1c} testing in patients with anemia. It should also be mentioned that, according to ADA criteria, the introduction of insulin into the treatment of T2DM begins when—despite the use of two different OAD medications—HbA_{1c} levels remain above target values (<7%). In our study, patients with DF mostly received insulin therapy (Table 1), which may also contribute to lower HbA_{1c} levels in this group.

Although patients with T2DM are characterized by enhanced OS [7–9], the results of the current study showed an even more disturbed redox status in patients with DF, as indicated by increased levels of PAB—with concomitantly reduced activities of SOD (Figure 1). PAB is a biomarker of the balance between serum prooxidants and antioxidants and its elevation indicates ROS overproduction [33]. Some previous studies have suggested that redox imbalances could have a pivotal role in the development and delayed healing of DF ulcers [11]. Accordingly, serum OS biomarkers were recently recognized as potentially valuable tools in diagnostics and management of DF [11,12]. The results of the study by Yarahmadi et al. [13] showed that PAB levels in DF patients highly exceed reference values. The authors also found a positive correlation between PAB levels and hsCRP [13], which indicates that both oxidative stress and inflammatory processes are exacerbated in patients with DF. It is firmly established that hyperglycemia contributes to the development of OS by overproduction of superoxide anion radicals through the mitochondrial electron transport chain [10]. Another potential explanation for increased PAB could be the fact that 40% of our patients with DF were smokers, while the number of smokers was markedly lower in the group without DF (Table 1). Although smoking is a strong risk factor for the development of DF ulcerations and subsequent amputations [4], it had no impact on the observed association between PAB and DF (Table 3), suggesting the role of other potential sources of ROS generation during DF development.

Previous studies have established the depletion of antioxidant protective mechanisms as an important risk factor for the development of diabetic complications. So far, the activity of SOD in patients with DF has been investigated to a lesser extent. Bolajoko et al. [15] reported reduced SOD activity in patients with DF compared to healthy controls. Our current study further demonstrated that patients with DF had lower SOD activity than DM patients without this complication (Figure 1). The finding of reduced SOD activity in patients with DF implies a potential exhaustion of the enzyme activity due to superoxide anion radical overproduction. Indeed, superoxide anion radicals are considered the main contributors to oxidative damage of foot tissue [34]. The observed reduced activity of SOD in patients with DF may also be a consequence of glycation of the enzyme, since it has been demonstrated that the degree of glycation is proportional to the duration of diabetes [31], which was significantly higher in our DF group (Table 1). Another important finding of our study is the reduced serum content of SHG in DF patients who underwent amputation. Glutathione is one of the main contributors to the serum pool of thiols, which is usually estimated as a content of total SHG. Reduced glutathione is among the most important endogenous antioxidants due to its scavenger role in neutralizing electrophilic and oxidant species. Other authors also reported depleted levels of reduced glutathione in patients with DF [14]. Our data suggest that the activity of antioxidant mechanisms further decrease with DF progression toward amputation, which should be confirmed in further studies.

In recent years, the importance of low-grade inflammation in the development of DF has been increasingly recognized [16]. The NLR index has been previously demonstrated as a potentially useful biomarker of systemic inflammation, but also as a predictor of future development of CVD [19]. More recently, its significance has been reported in diabetes [20]. The NLR index comprises the main components of the chronic inflammatory response. In this respect, an increased neutrophil proportion indicates an active inflammatory process, while a reduction of the lymphocyte proportion reflects an inadequate immune response, which is one of the characteristics of T2DM [35]. Recent studies have shown that NLR values are higher in patients with peripheral neuropathy and foot ulcerations compared to patients without DF [20,21,35]. Consistent with these findings are the results of our study, which showed that the NLR index was significantly higher in patients with DF compared

to those without this complication (Table 2). Taken together, these results suggest a further increase of NLR values with the exacerbation of the disease. In a recent follow-up study of patients with DF ulcers, a marked difference in NLR between the patients with complete healing ulcers and those who underwent amputation was demonstrated. On the other hand, the patients with chronic wounds and those who underwent major amputation had similar NLR [22]. These data suggest that NLR determination might be useful in the prediction of DF outcome. In our current study, there is no difference in NLR between the DF patients who did and did not undergo amputation, which could be the consequence of its cross-sectional design, as well as due to a relatively small number of included patients. Future studies with a larger sample size would be needed to assess whether NLR may be used as a biomarker of amputation risk.

Furthermore, we found a positive correlation between PAB and NLR, which may reflect the interactive role of OS and inflammation in the development of DF. Namely, enhanced OS triggers the activation of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway, which leads to increased production of proinflammatory mediators [16]. On the other hand, infiltration of leukocytes to the site of injury further contributes to ROS generation. Among them, stimulated neutrophils are considered to be a major source of ROS as a consequence of the upregulated activities of myeloperoxidase (MPO) and NADPH-oxidase [36]. Thus, elevated NLR might be regarded as an indicator of potential feedback loops between inflammation and OS processes.

Oxidative stress and inflammation affect the wound healing process, but whether these processes could differentiate between an infectious and non-infectious state is still insufficiently explored. Vatankhah et al. [22] recently evaluated the association between NLR and the treatment outcomes in patients with DF and found that higher NLR was associated with higher odds for non-healing ulcers. Since the observed association was independent of main risk factors, including wound infection, the authors suggested that NLR could serve as a biomarker of inflammatory mechanisms per se, rather than infection [22]. Indeed, increased oxidative stress and inflammation are common features of both infectious and non-infectious diseases, such as cardiometabolic diseases, including diabetes mellitus [37–39].

The results of our study extended previous findings by demonstrating that both PAB and NLR levels are independently associated with DF (Table 3), suggesting a possible additive effect on the risk for DF development. Indeed, both biomarkers had acceptable diagnostic accuracy (Figure 2), which could be further improved by their simultaneous determination. Recently, Chen et al. [40] reported higher NLR values in patients with diabetic neuropathy in relation to patients without this complication. However, they found that NLR had a weak diagnostic accuracy for diabetic neuropathy only in type-1 diabetes mellitus patients [40]. To the best of our knowledge, no previous study investigated the diagnostic accuracy of NLR for DF in patients with T2DM. These data emphasize the need for further studies on the clinical importance of NLR determination in the assessment of diabetic complications in both type-1 and type-2 diabetes mellitus patients.

This study has several limitations. Its cross-sectional design allowed us to demonstrate associations, but conclusions regarding causality cannot be drawn. Due to a lack of wound tissue cultures, we could not determine the impact of infection on the NLR ratio in patients with DF, and consequently whether NLR could differentiate between an infectious and non-infectious state. Further, the treatment of DF and indication for amputation was at the discretion of the experienced treating surgeon and we are unable to provide full data since, for the purpose of the current study, data on the detailed indications for amputation were not collected. We can only assume that the indication for amputation was the extended infection and gangrene, which follows the national guidelines; still, we wish to be fully transparent by stating that the data availability on the indications for surgery would have been valuable to further support our obtained results. In addition, we haven't collected any data about infection, with the only exception being the information on SARS-CoV-2 infection that was applied as exclusion criteria—since our main aim was to explore the

significance of OS and inflammatory biomarkers in patients with DF. It should be noted that NLR is a biomarker of an infection, although in the present study it was evaluated as a biomarker of systemic inflammation. Finally, due to a relatively small sample size, conclusions from the multivariate analysis could be biased, as a larger number of predictors were included in the model.

Still, one of the strengths of this observational study is the fact that it was conducted during the COVID-19 pandemic. We only included patients who did not have a history of COVID-19 in order to avoid the impact of SARS-CoV-2 virus infection on inflammation or oxidative stress, as well as the impact of COVID-19 itself on the course of diabetes, since it has been shown that the consequences of post-COVID syndrome (i.e., “long COVID”) are even more pronounced in patients with diabetes, including persistent tachycardia, sarcopenia, and microvascular dysfunction [41].

5. Conclusions

In conclusion, the results of our study showed increased PAB levels and NLR in patients with DF. Both PAB and NLR were independently associated with DF and could be suggested in clinical practice to improve the early detection of DF. Further investigations are required to confirm our preliminary findings.

Author Contributions: Conceptualization, J.V., J.K.-S. and M.R.; methodology, S.I.-M., B.K.U. and S.B.; investigation, S.V., I.P.-B., T.S., T.A., A.G., A.-M.M. and Z.M.; writing—original draft preparation, S.V.; writing—review and editing, J.V., J.K.-S. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by Ethics Committees of the Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović” (protocol code: 01-5656/24; 24.04.2019) and Ethics Committee of the General Hospital in Požarevac (protocol code 7190; 30.12.2020.) for studies involving humans.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical regulations.

Acknowledgments: This work was supported by the grant from the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia [Grant number 451-03-68/2022-14/200161].

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khan, M.A.B.; Hashim, M.J.; King, J.K.; Govender, R.D.; Mustafa, H.; Al Kaabi, J. Epidemiology of Type 2 Diabetes—Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J. Epidemiol. Glob. Health* **2020**, *10*, 107–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Ministry of Health of the Republic of Serbia. *National Guidelines of Good Clinical Practice for Diagnosing and Treating Diabetes Mellitus*; The Republic Commission for the development and implementation of good clinical practice guidelines; Ministry of Health of the Republic of Serbia: Belgrade, Serbia, 2013.
3. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *157*, 107843. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Abbott, C.A.; Carrington, A.L.; Ashe, H.; Bath, S.; Every, L.C.; Griffiths, J.; Hann, A.W.; Hussein, A.; Jackson, N.; Johnson, K.E.; 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*, 377–384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Pecoraro, R.E.; Reiber, G.E.; Burgess, E.M. Pathways to Diabetic Limb Amputation: Basis for Prevention. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 513–521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Pinto, A.; Tuttolomondo, A.; Di Raimondo, D.; Fernandez, P.; La Placa, S.; Di Gati, M.; Licata, G. Cardiovascular risk profile and morbidity in subjects affected by type 2 diabetes mellitus with and without diabetic foot. *Metabolism* **2008**, *57*, 676–682. [\[CrossRef\]](#)
7. Robertson, R.P. Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42351–42354. [\[CrossRef\]](#)

8. Maiese, K.; Morhan, S.D.; Chong, Z.Z. Oxidative Stress Biology and Cell Injury During Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr. Neurovasc. Res.* **2007**, *4*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
9. Kenneth, M.; Zhao, Z.C.; Yan, C.S. Mechanistic Insights into Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1729–1738. [\[CrossRef\]](#)
10. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A unifying mechanism. *Diabetes* **2005**, *54*, 1615–1625. [\[CrossRef\]](#)
11. Li, X.H.; Guan, L.Y.; Lin, H.Y.; Wang, S.H.; Cao, Y.Q.; Jiang, X.Y.; Wang, Y.B. Fibrinogen: A Marker in Predicting Diabetic Foot Ulcer Severity. *J. Diabetes Res.* **2016**, *2016*, 2358321. [\[CrossRef\]](#)
12. Rattan, R.; Nayak, D. High Levels of Plasma Malondialdehyde, Protein Carbonyl, and Fibrinogen Have Prognostic Potential to Predict Poor Outcomes in Patients with Diabetic Foot Wounds: A Preliminary Communication. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2008**, *7*, 198–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Yarahmadi, A.; Mostafavi-Pour, Z.; Modaghegh, M.-H.S.; Azarpira, N.; Mousavian, A.; Bonakdaran, S.; Kermani, F.S.; Alamdari, D.H. Association between serum vitamin D, hs-CRP, and prooxidant-antioxidant balance with anthropometric and biochemical parameters in patients with diabetic foot ulcers. *Clin. Diabetol.* **2021**, *10*, 138–143. [\[CrossRef\]](#)
14. Mudge, B.P.; Harris, C.; Gilmont, R.R.; Adamson, B.S.; Rees, R.S. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* **2002**, *10*, 52–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Bolajoko, E.B.; Mossanda, K.S.; Adeniyi, F.; Akinosun, O.; Fasanmade, A.; Moropane, M. Antioxidant and oxidative stress status in type 2 diabetes and diabetic foot ulcer. *S. Afr. Med. J.* **2008**, *98*, 614–617. [\[PubMed\]](#)
16. Sharma, H.; Sharma, S.; Krishnan, A.; Yuan, D.; Vangaveti, V.N.; Malabu, U.H.; Haleagrahara, N. The efficacy of inflammatory markers in diagnosing infected diabetic foot ulcers and diabetic foot osteomyelitis: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0267412. [\[CrossRef\]](#)
17. Van Asten, S.A.; Mithani, M.; Peters, E.J.; La Fontaine, J.; Kim, P.J.; Lavery, L.A. Complications during the treatment of diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2018**, *135*, 58–64. [\[CrossRef\]](#)
18. Massara, M.; De Caridi, G.; Serra, R.; Barillà, D.; Cutrupi, A.; Volpe, A.; Cutrupi, F.; Alberti, A.; Volpe, P. The role of procalcitonin as a marker of diabetic foot ulcer infection. *Int. Wound J.* **2017**, *14*, 31–34. [\[CrossRef\]](#)
19. Corriere, T.; Di Marca, S.; Cataudella, E.; Pulvirenti, A.; Alaimo, S.; Stancanelli, B.; Malatino, L. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio is a strong predictor of atherosclerotic carotid plaques in older adults. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2018**, *28*, 23–27. [\[CrossRef\]](#)
20. Duman, T.T.; Aktas, G.; Atak, B.M.; Kocak, M.Z.; Erkus, E.; Savli, H. Neutrophil to lymphocyte ratio as an indicative of diabetic control level in type 2 diabetes mellitus. *Afr. Health Sci.* **2019**, *19*, 1602–1606. [\[CrossRef\]](#)
21. Serban, D.; Papanas, N.; Dascalu, A.M.; Kempler, P.; Raz, I.; Rizvi, A.A.; Rizzo, M.; Tudor, C.; Tudosie, M.S.; Tanasescu, D.; 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* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
22. Vatankhah, N.; Jahangiri, Y.; Landry, G.J.; McLafferty, R.B.; Alkayed, N.J.; Moneta, G.L.; Azarbal, A.F. Predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in diabetic wound healing. *J. Vasc. Surg.* **2017**, *65*, 478–483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Johnson-Wimbley, T.D.; Graham, D.Y. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2011**, *4*, 177–184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Rosei, E.A.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D.L.; Coca, A.; de Simone, G.; Dominiczak, A.; et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *G. Ital. Cardiol.* **2018**, *19* (Suppl. S1), 3S–73S. [\[CrossRef\]](#)
25. Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 1103–1111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Alamdari, D.H.; 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*, 248–254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Miljkovic, M.; Stefanovic, A.; Simic-Ogrizovic, S.; Vekic, J.; Bogavac-Stanojevic, N.; Cerne, D.; Kocbek, P.; Marc, J.; Jelic-Ivanovic, Z.; Spasojevic-Kalimanovska, V.; 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*, 861–870. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Blagojević, I.P.; Ignjatović, S.; Macut, D.; Kotur-Stevuljević, J.; Božić-Antić, I.; Vekic, J.; Bjekić-Macut, J.; Kastratović-Kotlica, B.; Andrić, Z.; Ilić, D. Evaluation of a Summary Score for Dyslipidemia, Oxidative Stress and Inflammation (The Doi Score) in Women with Polycystic Ovary Syndrome and its Relationship with Obesity. *J. Med. Biochem.* **2018**, *37*, 476–485. [\[CrossRef\]](#)
29. Lavery, L.A.; Armstrong, D.G.; Vela, S.A.; Quebedeaux, T.L.; Fleischli, J.G. Practical Criteria for Screening Patients at High Risk for Diabetic Foot Ulceration. *Arch. Intern. Med.* **1998**, *158*, 157–162. [\[CrossRef\]](#)
30. Gezawa, I.D.; Ugwu, E.T.; 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. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0226226. [\[CrossRef\]](#)
31. Bosman, D.R.; Osborne, C.A.; Marsden, J.T.; MacDougall, I.C.; Gardner, W.N.; Watkins, P.J. Erythropoietin response to hypoxia in patients with diabetic autonomic neuropathy and non-diabetic chronic renal failure. *Diabet. Med.* **2002**, *19*, 65–69. [\[CrossRef\]](#)
32. Weiss, G.; Goodnough, L.T. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1011–1023. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Kacarevic, D.; Bogavac-Stanojevic, N.; Spasojevic-Kalimanovska, V.; Bojanin, D.; Milenkovic, T.; Stefanovic, A.; Mihajlovic, M.; Vujcic, S.; Vukovic, R.; Zeljkovic, A.; et al. Factors associated with oxidative stress status in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2020**, *33*, 591–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Salvemini, D.; Cuzzocrea, S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2002**, *3*, 886–895. [[PubMed](#)]
35. Khandare, S.A.; Chittawar, S.; Nahar, N.; Dubey, T.; Qureshi, Z. Study of neutrophil-lymphocyte ratio as novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2017**, *21*, 387–392. [[CrossRef](#)]
36. Zeng, M.Y.; Miralda, I.; Armstrong, C.L.; Uriarte, S.M.; Bagaitkar, J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral Microbiol.* **2019**, *34*, 27–38. [[CrossRef](#)]
37. Rizzo, M.; Kotur-Stevuljevic, J.; Berneis, K.; Spinass, G.; Rini, G.B.; Jelic-Ivanovic, Z.; Spasojevic-Kalimanovska, V.; Vekic, J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: A new look. *Transl. Res.* **2009**, *153*, 217–223. [[CrossRef](#)]
38. Vekic, J.; Zeljkovic, A.; Al Rasadi, K.; Cesur, M.; Silva-Nunes, J.; Stoian, A.P.; Rizzo, M. A New Look at Novel Cardiovascular Risk Biomarkers: The Role of Atherogenic Lipoproteins and Innovative Antidiabetic Therapies. *Metabolites* **2022**, *12*, 108. [[CrossRef](#)]
39. Rizzo, M.; Abate, N.; Chandalia, M.; Rizvi, A.A.; Giglio, R.V.; Nikolic, D.; Gammazza, A.M.; Barbagallo, I.; Isenovic, E.R.; Banach, M.; et al. Liraglutide Reduces Oxidative Stress and Restores Heme Oxygenase-1 and Ghrelin Levels in Patients with Type 2 Diabetes: A Prospective Pilot Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 603–606. [[CrossRef](#)]
40. Chen, M.; Zhu, Y.; Wang, J.; Wang, G.; Wu, Y. The Predictive Value of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio Levels of Diabetic Peripheral Neuropathy. *J. Pain Res.* **2021**, *14*, 2049–2058. [[CrossRef](#)]
41. Rizvi, A.A.; Kathuria, A.; Al Mahmeed, W.; Al-Rasadi, K.; Al-Alawi, K.; Banach, M.; Banerjee, Y.; Ceriallo, A.; Cesur, M.; Cosentino, F.; et al. Post-COVID syndrome, inflammation, and diabetes. *J. Diabetes Its Complicat.* **2022**, *6*, 108336. [[CrossRef](#)]

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Посл.број: 3/159

Дана 28.09.2023. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан Факултета је дана 28.09.2023. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се САЊИ ВУЈЧИЋ, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 33/2017, продужетак рока за завршетак студија за школску 2023/2024.

Образложење

САЊА ВУЈЧИЋ, студент на студијском програму ДАС – Медицинска биохемија, поднела је захтев број 3/159 од 28.09.2023. године продекану Факултета да јој се одобри продужетак рока за завршетак студија.

Продекан Факултета је разматрала захтев 28.09.2023. године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: Именованој-ом, декану и Одсеку за наставу и студентска питања.

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ



Проф. др Сандра Везмар Ковачевић

13.10.2023

Сања Вујчић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
Посл.број: 5/169
Дана 27.09.2024.године

W

На основу члана 107. Закона о високом образовању Републике Србије, продекан Факултета је дана 27.09.2024. године, донела

РЕШЕЊЕ

ОДОБРАВА се ВУЈЧИЋ САЊИ, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 33/2017, продужетак рока за завршетак студија у школској 2024/2025.

Образложење

ВУЈЧИЋ САЊА, студент на студијском програму ДАС – Медицинска биохемија, поднела је захтев бр. 5/169 од 27.09.2024. године продекану за последипломске студије Факултета да јој се одобри **продужетак рока за завршетак студија у школској 2024/2025.**

Продекан Факултета је разматрала захтев 27.09.2024. године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против овог решења именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Решење доставити: Именованом, декану, продекану за наставу, секретару, Одсеку за наставу и студентска питања и архиви.

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ




Проф. др Сандра Везмар Ковачевић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Посл.број: 3/115

Дана 04.11.2025. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан за последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета је дана 04.11.2025. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се ВУЈЧИЋ САЊИ, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 33/2017, продужетак рока за завршетак студија за школску 2025/2026.

Образложење

ВУЈЧИЋ САЊА, студент на студијском програму ДАС – Медицинска биохемија, поднела је захтев број 3/115 од 04.11.2025. године продекану за последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета да јој се одобри продужетак рока за завршетак студија у школској 2025/2026 години.

Продекан за последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета је разматрала захтев 04.11.2025.године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: Именованој-ом, Одсеку за наставу и студентска питања и ментору

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КONTИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ



24.11.2025

Проф. др Душанка Крајновић

12.11.2025.

Сања Вујчић