



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јована М. Тубић Вукајловић

**ПРОМЕНЕ У ГЕНОМУ ЛИМФОЦИТА
ПЕРИФЕРНЕ КРВИ ПАЦИЈЕНАТА СА
КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА:
ФАКТОРИ РИЗИКА И ПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКАТ
ГЉИВЕ *LENZITES BETULINUS* (L.) FR.**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Jovana M. Tubić Vukajlović

**CHANGES IN THE GENOME OF PERIPHERAL
BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH
CARDIOVASCULAR DISEASES: RISK FACTORS
AND THE PROTECTIVE EFFECT OF THE
MUSHROOM *LENZITES BETULINUS* (L.) FR.**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Аутор	
Име и презиме: Јована М. Тубић Вукајловић	
Датум и место рођења: 27.11.1992. године, Крагујевац	
Садашње запослење: асистент на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу	
Докторска дисертација	
Наслов: Промене у геному лимфоцита периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима: фактори ризика и протективни ефекат гљиве <i>Lenzites betulinus</i> (L.) Fr.	
Број страница:155	
Број слика:31	
Број библиографских података:272	
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Биологија (575.1:612.1)	
Ментор: др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу	
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: Веће за природно-математичке науке, IV-01-466/7, 15.07.2020. године	

*Ову докторску дисертацију посвећујем
родитељима и сину Матији*

Захвалница

Експериментални део ове докторске дисертације је одрађен у Лабораторији за генетику Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Истраживања су финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

На првом месту се најискреније захваљујем свом ментору проф. др Оливери Милошевић-Ђорђевић, са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на указаном поверењу, поклоњеном времену и пренесеном знању из генетике и живота, као и на помоћи око конципирања теме, дискутовању резултата, драгоценим саветима и сугестијама који су омогућили да ова дисертација буде успешно финализована. Ценим сва залагања, сваки добронамерни стручни и пријатељски савет. Њено стрпљење и садржајни разговори су олакшали мој пут ка остварењу циља. Част је изабрати баш таквог ментора.

Велико хвала свим члановима комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, доц. др Ивану Симићу, са Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу на помоћи око сакупљања узорака пацијената, указаном поверењу и дивној сарадњи током израде докторске дисертације, проф. др Дарку Грујичићу, са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на корисним саветима и сугестијама приликом писања докторске дисертације и др Томиславу Гостију, са Института за хемију, технологију и металургију – Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду на помоћи око утврђивања хемијског састава гљиве.

Од срца се захваљујем медицинском особљу Клинике за кардиологију, Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу, на несебичној помоћи приликом прикупљања узорака крви пацијената, пацијентима који су учествовали у студији и колегама са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу који су ми пружали подршку и помогли на било који начин.

Велику захвалност дугујем својим родитељима на безусловној љубави и подршци, као и на томе што су ми били узор и ослонац у животу, сестри и супругу на разумевању, подршци и охрабрењу током израде докторске дисертације. Највећу и најтоплију захвалност дугујем свом дивном сину Матији који је унео смисао у мој живот, својом љубављу, пажњом и најслађим осмехом.

Јована Тубић Вукајловић

Апстракт

Циљ дисертације је био да се испитају промене у геному пацијената са акутним коронарним синдромом (АКС) и срчаном инсуфицијенцијом (СИ) у односу на факторе ризика процењиване на нивоу молекула ДНК и хромозома, ефекат коронарне ангиографије (КА) и потенцијални протективни ефекат гљиве *Lenzites betulinus* у односу на њихов фитохемијски састав. Ниво ДНК оштећења је анализиран комет тестом, а фреквенца хромозомских аберација је анализирана цитокинезис-блок микронуклеус тестом. Генотоксични и генопротективни потенцијал различитих екстраката гљиве је анализиран комет тестом, а фитохемијски састав је испитиван спектрофотометријским и хроматографским анализама. Резултати су показали да пацијенти имају значајно већи ниво геномског оштећења/геномске нестабилности у односу на здраве особе, као и повећано оштећење генома након КА у поређењу са оштећењем пре КА. Фактори ризика (позитивна породична анамнеза, хипертензија, хиперхолестеролемија, терапија лековима, срчани биомаркери и доза зрачења при КА) су утицали на промене у геному пацијената. Екстракти гљиве су незначајно повећавали ниво ДНК оштећења у лимфоцитима здравих особа, док су значајно редуковали терапијом-индукован и зрачењем-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената. Гљива је била богата минералима, органским и масним киселинама, шећерима и полифенолним једињењима. Може се закључити да су пацијенти са АКС и СИ имали значајно веће промене у геному у односу на здраве особе, што је у корелацији са озбиљношћу болести и факторима ризика. *L. betulinus* се може сматрати гљивом високе нутритивне и функционалне вредности, јер екстракти гљиве нису били генотоксични у испитиваним концентрацијама у култивисаним лимфоцитима здравих особа, док су код пацијената испољили хемо- и радиопротективни ефекат против терапијом/зрачењем-индукованог ДНК оштећења.

Кључне речи: кардиоваскуларне болести; коронарна ангиографија; ДНК оштећење; хромозомске аберације; лимфоцити периферне крви; *Lenzites betulinus*; фитохемијски састав гљиве.

Abstract

The dissertation aimed to examine the changes in the genome of patients with acute coronary syndrome (ACS) and heart failure (HF) in relation to risk factors assessed at the level of DNA and chromosome, the effect of coronary angiography (CAG), and the potential protective effect of *Lenzites betulinus* mushroom in relation to their phytochemical composition. The level of DNA damage was analyzed by the comet assay, and frequency of chromosomal aberration was analyzed by the cytokinesis-block micronucleus test. The genotoxic and genoprotective potential of different mushroom extracts was assessed by the comet assay, and their phytochemical composition was examined by spectrophotometric and chromatographic analyses. The results showed significantly higher level of genome damage/instability in patients compared to healthy individuals, as well as increased genome damage after CAG compared to damage before CAG. Risk factors (positive family history, hypertension, hypercholesterolemia, drug therapy, cardiac biomarkers and dose of X-radiation during CA) affected the level of genome damage in patients. Mushroom extracts insignificantly increase the level of DNA damage in the lymphocytes of healthy individuals, but significantly reduced the therapy-induced and radiation-induced level of damage in the lymphocytes of patients. The mushroom was rich in minerals, sugars, organic and fatty acids, and polyphenolic compounds. It can be concluded that patients with ACS and HF had significantly higher changes in the genome than healthy individuals, which is correlated with the severity of the disease and risk factors. *L. betulinus* may be considered a mushroom of high nutritional and functional value, as its extracts were non-genotoxic at tested concentrations in cultured lymphocytes of healthy individuals and exhibited a chemo- and radioprotective effect against therapy/radiation-induced DNA damage in patients.

Keywords: cardiovascular diseases; coronary angiography; DNA damage; chromosomal aberrations; peripheral blood lymphocytes; *Lenzites betulinus*; phytochemical composition of mushroom.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Кардиоваскуларне болести	1
1.1.1. Акутни коронарни синдром	2
1.1.2. Срчана инсуфицијенција	6
1.1.3. Генетичка основа кардиоваскуларних болести	8
1.1.3. Фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести.....	9
1.2. Тестови за детекцију мутација у хуманим ћелијама.....	10
1.2.1. Комет тест	10
1.2.2. Микронуклеус тест.....	12
1.2.2.1. Цитокинезис – блок микронуклеус тест.....	14
1.3. Фактори који утичу на промене у геному на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома	16
1.4. Гљиве као извор биолошки активних супстанци	18
1.2.1. Врста <i>Lenzites betulinus</i> (L.) Fr. (1838)	19
2. ЦИЉ РАДА	22
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	23
3.1. Пацијенти.....	23
3.2. Узорковање периферне крви.....	26
3.3. Базни комет тест	26
1.4. Цитокинезис-блок микронуклеус тест	27
3.5. Узорковање и идентификација гљиве за екстракцију.....	28
3.6. Поступак прављења екстракта гљиве	28
3.7. Тестиране концентрације екстракта гљиве	29
3.8. Фитохемијска анализа гљиве <i>Lenzites betulinus</i>	29
3.8.1. Одређивање садржаја минерала	29
3.8.2. Одређивање садржаја шећера и шећерних алкохола	29
3.9.3. Одређивање садржаја масних киселина	31
3.8.4. Одређивање садржаја органских киселина	31
3.8.5. Одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида	31
3.8.6. Квантификација полифенолног састава	32
3.9. Статистичка обрада резултата	33

4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	34
4.1. Геномска нестабилност у лимфоцитима периферне крви анализираних узорака.....	34
4.2. Базални ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа.....	38
4.3. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви здравих особа....	40
4.4. Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом.	41
4.5. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом.....	48
4.6. Оксидациони ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.....	58
4.7. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом	60
4.8. Упоредна анализа нивоа ДНК оштећења и хромозомских аберација код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом.....	66
4.9. Ефекат гљиве на терапијом-индуковано геномско оштећење у лимфоцитима периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима.....	67
4.10. Хемијски састав гљиве <i>Lenzites betulinus</i>	99
5. ДИСКУСИЈА	104
6. ЗАКЉУЧЦИ	116
7. ЛИТЕРАТУРА	117
8. ПРИЛОЗИ	142

1. УВОД

Савремени развој човечанства, поред бројних предности, често доводи и до испољавања штетних ефеката, како на самог човека, тако и на животну средину. Негативни ефекти човековог деловања се могу огледати кроз повећани ниво загађења ваздуха, воде и земљишта различитим органским и неорганским једињењима, смањење природних ресурса, климатске промене, виши интензитет UV и јонизујућег зрачења, смањење биолошке разноврсности, масовне светске миграције, као и брзи развој технологије без сагледивих последица (Mitra и сар., 2022; Wen-Bo и сар., 2024). Овакав начин живота и проузроковано стање човекове околине доводи до развоја кардиоваскуларних болести (КВБ) често праћених хипертензијом, дијабетеса, гојазности, неуродегенеративних поремећаја и канцера (Sharifi-Rad и сар., 2020; Silva и сар., 2024).

Предуслов за нормално функционисање ћелија и организма представља очуван генетички материјал. Услед огромних и убрзаних промена које се свакодневно дешавају модерном човеку, присутан је све већи број промена у генетичком материјалу телесних и/или полних ћелија, које нарушавају целовитост организма и доводе до развоја бројних болести. Са генетичко-еволуционог становишта, најзначајније промене у генетичком материјалу су оне које настају у полним ћелијама, јер се преносе на потомство и могу довести до појаве обољења и у будућим генерацијама. Са друге стране, нешто мање значајне, али никако занемарујуће су и промене у телесним ћелијама које се не преносе на потомство (Vijg, 2021).

За потребе детектовања промена у генетичком материјалу развијен је велики број рутинских тестова, којима се, у *in vitro* и *in vivo* условима, може спровести анализа на различитим моделима и типовима ћелија. Комбинацијом тестова може се утврдити генотоксични потенцијал различитих агенаса, које човек свакодневно уноси у организам из ваздуха, воде или путем хране (Yamamoto и сар., 2021).

Супстанце природног порекла, пре свега синтетисане од стране биљака, животиња, микроорганизама и гљива, могу имати различите биолошке активности и представљају значајан потенцијал у превенцији или репарацији бројних генетичких оштећења (Erbiai и сар., 2023; Morochio и сар., 2023; Dastan и сар., 2023), па је испитивање њихових дејстава веома значајно и актуелно.

1.1. Кардиоваскуларне болести

КВБ обухватају хетерогену групу болести срца и крвних судова, које су водећи јавноздравствени проблем, али и водећи узрок обољевања и смрти у свету. Према десетој ревизији међународне класификације болести (МКБ10), у КВБ спадају: болести узроковане повишеним крвним притиском, исхемија срца, болести крвотока, акутне и хроничне реуматске болести срца, болести срца плућног порекла, као и болести крвних судова плућа, крвних судова мозга, великих и малих артерија, капилара, вена, лимфних судова и чворова. Према класификацији Venhar и сар. (2020), у срчане болести спадају акутни коронарни синдром, срчана инсуфицијенција, болести срчаних залистака, анеуризма, перикардитис и срчане аритмије (Слика 1).



Слика 1. Типови срчаних болести (преузето и прилагођено: https://www.udmi.net/wp-content/uploads/2020/02/UDMI_Cardiovascular-Disease.png)

Према последњим подацима Светске здравствене организације (WHO, 2022), као последица болести срца и крвних судова умрло је око 17,7 милиона људи, што је око 31% свих смртних случајева у свету. Око 85% свих смртних исхода од КВБ је последица инфаркта миокарда или шлога. Процењује се да ће у наредне две деценије од последица КВБ умирати око 25 милиона људи годишње и то ће углавном бити изражено у земљама у развоју и у земљама које се налазе у периоду транзиције. Према последњим подацима Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ из 2018. године, 53,3% свих смртних случајева у Републици Србији је последица КВБ. Тачније, 56 488 људи је умрло од било ког облика КВБ, што значи да је сваког сата умрло шесторо људи. Сваки 5. умрли је био мушког пола и радно способан становник, а сваки 14. је женског пола. По смртности, срчани удар је на другом месту, одмах иза рака плућа, али у последњих 10 година, стопа смртности услед КВБ је опала за 15%.

1.1.1. Акутни коронарни синдром

Акутни коронарни синдром је скуп различитих клиничких стања која настају услед наглих поремећаја циркулације у коронарним артеријама, који су изазвани руптуром атеросклеротског плака уз пратећу тромбозу, инфламацијом, вазоконстрикцијом и микроемболизацијом. Руптура плака се често јавља на ивици или на бочном делу плака. Фисура на том месту доводи до излагања изразито тромбогеног колагена и липида крвотоку, што води образовању интралуминалног тромба. Активирани тромбоцити посредују у вазоконстрикцији и даљем ширењу тромба, што може нагло да угрози коронарни проток. Може се испољити као нестабилна ангина пекторис, акутни инфаркт миокарда са елевацијом СТ сегмента (STEMI, *енгл.* ST-Elevation Myocardial Infarction) или без елевације СТ сегмента (NSTEMI, *енгл.* Non ST-Elevation Myocardial Infarction) и изненадна срчана смрт (Nohria и Viera, 2024).

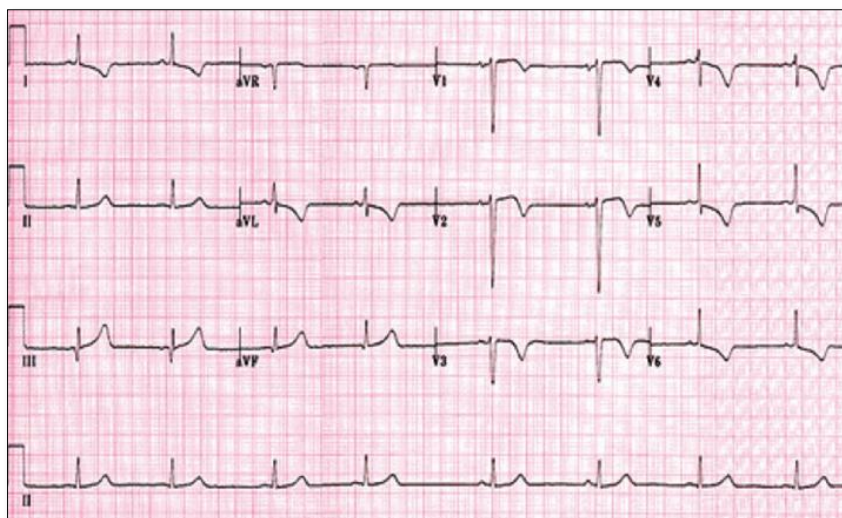
Код нестабилне ангине пекторис се јавља висцерална нелагодност у грудима (испод грудне кости) или бол узрокована недовољним дотоком крви и кисеоника у срце у присуству коронарне стенозе. Код пацијената се болови јављају без претходног психофизичког напрезања, а нелагодност може бити удружена са диспнејом, презнојавањем, мучнином или палпитацијама. Може претходити акутном инфаркту миокарда или поремећају у срчаном ритму, али се не ослобађају срчани ензими (Wright и сар., 2011; Вугне и сар., 2023).

Инфаркт миокарда је најтежи облик испољавања коронарне болести срца код кога долази до запушења неке од коронарних артерија, некрозе миокарда и ослобађања срчаних ензима. У већини случајева је праћен пролонгираним ретростеналним болом који се најчешће шири у леву руку, врат и доњу вилицу и може да траје од 30 min до 24 сата. Код STEMI, електрокардиограмом (ЕКГ) се виде промене у виду елевације СТ-сегмента (Слика 2), које се не повлаче након употребе нитроглицерина и такође може да се јави блок леве гране, (Ibanez и сар., 2018; Вугне и сар., 2023). Код ових пацијената тромб је богат фибрином који је често потпуно оклузиван (Alkarithi и сар., 2021).



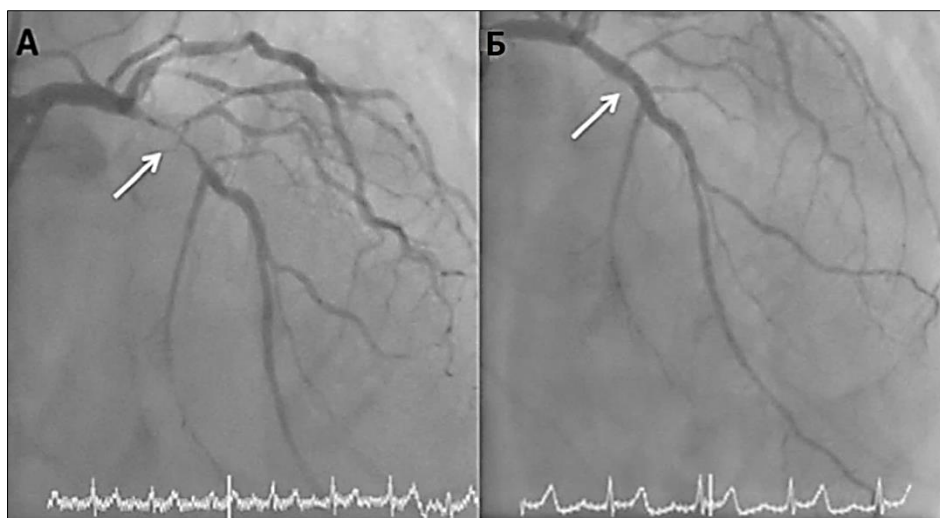
Слика 2. Електрокардиограм код акутног инфаркта миокарда са елевацијом СТ сегмента (преузето: Kotecha и Rakhit, 2016)

Код NSTEMI стања на ЕКГ-у се не види акутна елевација СТ-сегмента (Слика 3), већ је присутна депресија СТ-сегмента и/или инверзија Т-таласа (Collet и сар., 2021; Вугне и сар., 2023). Код пацијената са дијагнозом NSTEMI, тромб је тромбоцитни и делимично оклузиван. Услед раста тромба, долази до његовог откидања и дисталне дисеминације који може довести до емболизације коронарне микроциркулације, што за последицу има пораст срчаног биомаркера - тропонина (Ostojić и сар., 2011; Chauin и сар., 2021).

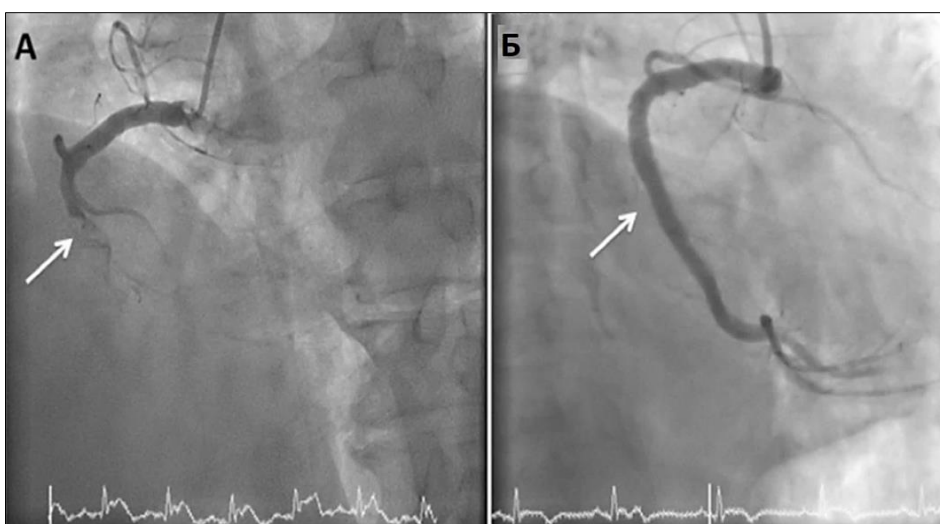


Слика 3. Електрокардиограм код акутног инфаркта миокарда без елевације СТ сегмента (преузето: Kotecha и Rakhit, 2016)

Акутни коронарни синдром се дијагностикује неинвазивним и инвазивним методама. Најчешће неинвазивне методе су анамнеза, ултразвук, ЕКГ, ергометрија, Холтер, скенер, кардиоваскуларна магнетна резонанца и провера срчаног маркера (Bohula и сар., 2014). Тропонин је срчани ензим који регулише интеракцију актина и миозина у мишићу која је посредована калцијумом. Сматра се „златним стандардом“ биохемијских тестова, ослобађа се из оштећених миоцита и до сада није откривен код здравих особа. Срчани тропонин Т и I расту у периферној крви у року од 3 до 4 сата од почетка инфаркта миокарда и достижу 95 до 99% осетљивости и специфичности за 10 сати, а остају присутни током 10 до 14 дана после акутног догађаја. Студије су показале да је повишен тропонин повезан са повећаним ризиком од смртности. Он може бити и лажно повишен услед слабости бубрега, плућне емболије, миокардитиса и отказивања срца (Bohula и сар., 2014; Kotecha и Rakhit, 2016). Упркос инвазивности, најчешће коришћена метода за дијагностиковање болести крвних судова и срца је коронарна ангиографија. Изглед коронарног ангиограма код пацијената са акутним коронарним синдромом је приказан на Сликама 4 и 5. Не постоје конкретне контраиндикације за извођење коронарне ангиографије, али постоје неки ризици који се могу приписати срчаним компликацијама. Године старости, бубрежна инсуфицијенција, неконтролисани дијабетес мелитус и патолошка гојазност могу повећати ризик за настанак компликација при извођењу коронарне ангиографије (Vidal-Perez и сар., 2019). Радиографска контрастна средства, која су на бази јода, користе се у свим ангиографским процедурама, тако да су пацијенти изложени дејству рендгенског – јонизујућег, X-зрачења. Контрастна средства имају директне митогене, цитотоксичне и цитостатске активности (Azimi и сар., 2017) и повећавају садржај слободних радикала који изазивају оштећење дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) (Demirbag и сар., 2007). Прекомерна производња реактивних врста кисеоника може оксидовати ћелијске макромолекуле (Chang и сар., 2008) и ДНК, изазивајући прекиде ДНК ланаца, алкално лабилна места и непотпуна места поправке и унакрсне везе (Deavall и сар., 2012). Након коронарне ангиографије, пацијенту се предлаже начин лечења који може бити: терапија лековима, оперативно лечење (бај-пас) или уградња коронарног стента (перкутана коронарна интервенција).



Слика 4. Коронарни ангиограм пацијента са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента А) постојање стенозе десне коронарне артерије Б) иста коронарна артерија након уградње интракоронарног стента (преузето и прилагођено: Kotecha и Rakhit, 2016)



Слика 5. Коронарни ангиограм пацијента са акутним коронарним синдромом без елевације СТ сегмента А) критична стеноза у проксималној левој предњој силазној артерији Б) иста коронарна артерија након уградње интракоронарног стента (преузето и прилагођено: Kotecha и Rakhit, 2016)

У патофизиолошкој основи сваког облика акутног коронарног синдрома је нестабилни атеросклеротски плак. Њега карактерише велико, некротично липидно језгро са повећаном активношћу ткивних макрофага и металопротеиназа, као и танка фиброзна капа која га покрива (промера мањег од 50 μm). Овакав плак је склон руптури, последичној интракоронарној тромбози и исхемији и/или некрози миокарда у зони иригације оклудиране коронарне артерије (Falk и сар., 2013; Sakamoto и сар., 2022; Cornelissen и сар., 2023).

Према подацима Светске здравствене организације, у свету од акутног инфаркта миокарда годишње оболи 6 милиона особа, а смртним исходом заврши 25% (WHO,

2022). Данска кохортна студија популационог истраживања акутног коронарног синдрома, која је укључила око 130 000 људи старости од 30 до 69 година показала је инциденцу од 234/100 000 особа (Nielsen и сар., 2007).

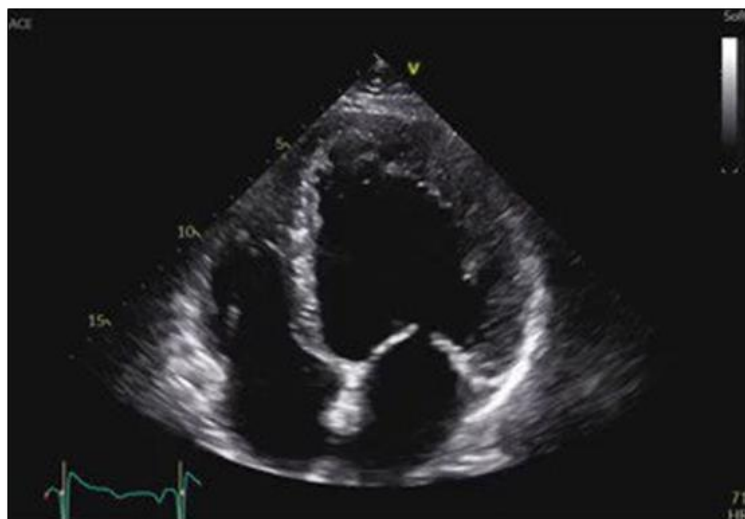
Кључна патолошка карактеристика код акутног коронарног синдрома је активација тромбоцита, што доводи до стварања тромбина, активацијом коагулационе каскаде и ослобађањем инфламаторних медијатора. Због тога је јако важна антитромбоцитна терапија, као важан додатак перкутаној коронарној интервенцији и саставни је део секундарне превенције. У основи дуготрајног лечења се налази аспирин и клопидогрел или тикагрелор који чине двојну антиагрегациону терапију (Kotecha и Rakhit, 2016).

1.1.2. Срчана инсуфицијенција

Срчана инсуфицијенција или срчана слабост је сложена болест коју карактерише немогућност срчаног мишића да обезбеди адекватан минутни волумен упркос нормалном приливу венске крви у срце. У основи леже структурни и функционални поремећаји срца при одржавању потребе за крвљу (Stefani и сар., 2020) и утичу на промене у механизму вентилације које ометају узимање и снабдевање кисеоником, изазивајући оксидациони стрес (Mongirdiene и сар., 2022). Повећан оксидациони стрес игра важну улогу у развоју срчане инсуфицијенције и корелира са хипертрофијом срца, васкуларном ендотелном дисфункцијом, губитком кардиомиоцита услед исхемије и неповољним ремоделирањем леве коморе након инфаркта миокарда (Но и сар., 2013; Bertero и сар., 2018). Главни неуроухоморални механизми који се активирају при развоју срчане инсуфицијенције су ренин-ангиотензин-алдостерон и симпатички аутономни систем. Када дође до развоја срчане инсуфицијенције услед смањене функције миокарда, ови механизми постају штетни и доводе до миокардне дисфункције и слабљења срца стварајући зачарани круг у патофизиологији срчане инсуфицијенције (Mm и сар., 2011). Реактивне врсте кисеоника су одговорне за оштећење протеина, липида, ДНК и мембрана. Такође активирају срчану натријум-калијум (Na^+/K^+) пумпу, која покреће срчану хипертрофију, повећава интрацелуларни калцијум (Ca^{2+}) путем калцијум-зависног пута и омогућава активацију протеин киназе II зависне од калцијума/калмодулина, што доводи до повећања смрти кардиомиоцита и развоја срчане инсуфицијенције (Palomeque и сар., 2009; Mondal и сар., 2013).

Срчана инсуфицијенција може да захвати само једну комору или може да буде бивентрикуларна. Примарно може бити оштећена систолна и/или дијастолна функција, а болест може да се испољи различитим степеном клиничких симптома. Најчешће примењивана неинвазивна метода у дијагностици срчане слабости је ехокардиографија која даје податке о пумпној функцији срца израженој кроз ејекциону фракцију (EF%, *енгл.* ejection fraction), и често може открити и патофизиолошки узрок, као што је исхемија срца, хипертензија, валвуларне мане, миокардитис и кардиомиопатије. Осим ове методе, могу се применити дванаестоканални ЕКГ у циљу испитивања срчаног ритма и фреквенција, биохемијске анализе, крвна слика, натриуретски пептиди, као и телерадиографија срца и плућа. Познато је да већина етиопатогенетских фактора који доводе до срчане инсуфицијенције имају наследну компонентну, као и да инфламаторни, метаболички, ендокринолошки процеси и трудноћа могу довести до развоја срчане декомпензације (Schwinger и сар., 2021). Пацијенти са срчаном

инсуфицијенцијом и очуваном EF ($> 50\%$) се издвајају у посебну групу пацијената јер имају нешто другачију патофизиологију, старији су и чешће су женског пола, а ређе имају исхемију срца, немају дилатацију леве коморе, већ задебљале зидове и увећану леву преткомору (Dokainish и сар., 2011). Срчана инсуфицијенција са смањеном EF се јавља када је EF леве коморе $\leq 40\%$ и праћена је прогресивном дилатацијом леве коморе и неповољним ремоделирањем срца (Слика 6).



Слика 6. Срчана инсуфицијенција са смањеном ејекционом фракцијом (преузето: <https://www.bmj.com/content/bmj/353/bmj.i1706/F1.large.jpg?width=800&height=600>)

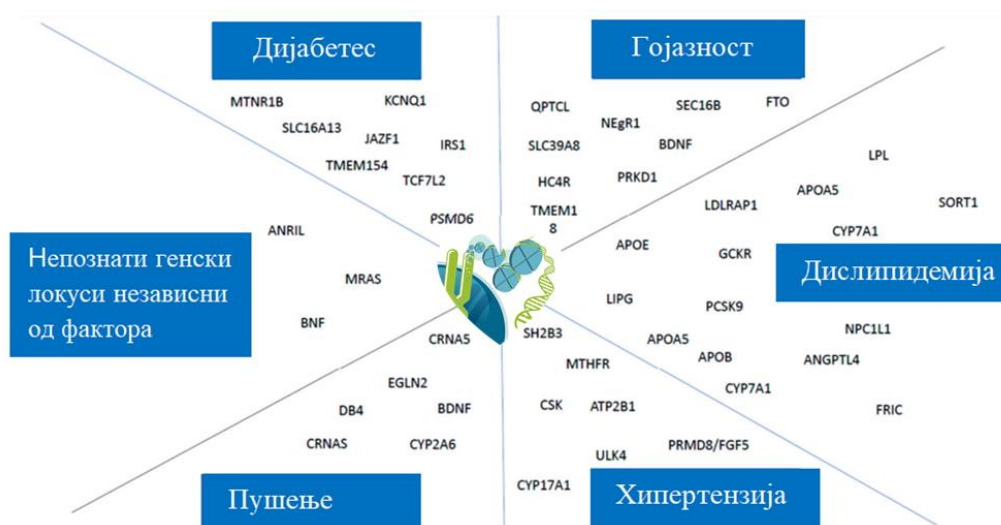
Основно у дијагностици срчане инсуфицијенције су повишени натриуретски пептиди и идентификација систолне дисфункције леве коморе са EF $\leq 40\%$ мерено ехокардиографијом. У основи лечења срчане инсуфицијенције са смањеном EF користе се диуретици за ублажавање симптома, β -блокатори, инхибитор ангиотензинских рецептора-неприлизина, инхибитор ангиотензин конвертујућег ензима или блокатор ангиотензинских рецептора, уз додатак антагониста минералокортикоидних рецептора код пацијената са упорним симптомима (Murphy и сар., 2022).

Типични симптоми срчане инсуфицијенције су отропнеја, пароксизмална ноћна диспнеја, малаксалост и замор, отоци зглобова, повишен крвни притисак, хепатојугуларни рефлукс, галопни ритам, шум на срцу и иктус померен латерално. Поред ових симптома може се јавити и ноћни кашаљ, визинг, нагли пораст или губитак телесне тежине, губитак апетита, осећај отечености, депресија, тахикардија, хепатомегалија и кахексија (Oudejans и сар., 2011).

Ова болест је онеспособљавајућа и погађа око 1-2% популације развијених земаља и њена преваленција расте за око 1% код особа старости од 55 до 64 године и за 17,4% код особа старијих од 85 година (McMurray и сар., 2012). Епидемиолошким испитивањима је утврђено да 30-40% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом умире пар месеци након постављања дијагнозе, док се у 60-70% пацијената завршава смртним исходом услед прогресије болести. Код пацијената који су хоспитализовани је знатно већи морталитет него код пацијената оболелих од различитих малигних болести. Тек око пет година од дијагностиковања срчане инсуфицијенције, преживљавање ових пацијената који су у одмаклој фази болести се изједначава са преживљавањем пацијената оболелих од карцинома (Paterson и сар., 2011).

1.1.3. Генетичка основа кардиоваскуларних болести

Молекуларна генетика и фармакогенетика имају кључну улогу у дијагностици, превенцији и лечењу КВБ. Генетско тестирање се користи за идентификацију основне генетске етиологије код пацијената са сумњом на КВБ као што је хипертрофична кардиомиопатија или породична хиперхолестеролемија, као и за одређивање ко је у породици наследио узрочну варијанту. Генетско тестирање треба да се спроводи код добро фенотипизованих појединаца са познатом породичном анамнезом да би се помогло у тумачењу и примени резултата (Gersh и сар., 2011). Методе молекуларне генетике примењене у кардиоваскуларним студијама омогућиле су мапирање хромозома и идентификацију бројих гена укључених у примарну етиологију (Слика 7).



Слика 7. Генетска предиспозиција за кардиоваскуларне болести (преузето и прилагођено: Vrablik и сар., 2021)

Већина КВБ и фактора ризика за настанак КВБ се полигено наслеђују, док моногенски облици могу довести до тешких превремених КВБ и ране смрти ако се не препознају и не лече. Фамилијарна хиперхолестеролемија има инциденцу 1:200 и удружена је са повећаним ризиком за рани развој коронарне артеријске болести, наслеђује се аутозомно доминантно (Turnpenny и Ellard, 2009). Најчешће је узрокована мутацијом *LDLR* гена, који кодира рецептор за LDL, а нешто ређе мутацијом аполипопротеина Б (*APOB*) и *PCSK-9* гена (Vrablik и сар., 2020). Иако је идентификовано више од 2900 *LDLR* мутација, око 1000 мутација је узрок фамилијарне хиперхолестеролемије. Хипертензија је главни узрок атеросклерозе и хеморагичних можданих удара услед чега се јавља дисбаланс ренин-ангиотензин-алдостеронског система. Значајан је локус на хромозому 17q (*HYT1*), 16 који је хомолог са локусом SA код пацова (*HYT3*) и локус на хромозому 15q (*HYT2*) (Turnpenny и Ellard, 2009).

Хипертрофична кардиомиопатија је најчешћа фамилијарна болест срца са великом генетском хетерогеношћу. Мутације у генима *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *PLN* који кодирају протеине срчаног саркомера (>1400 варијанти) су одговорне за ову болест (Zou и сар., 2020).

Palomaki и сар. (2010) су у својој студији показали најмоћнију генетску детерминанту за КВБ, која представља полиморфизам једног нуклеотида (*енгл.* single nucleotide polymorphisms, SNPs) унутар региона хуманог хромозома 9p21.3. Варијанте су откривене у интронима, antisense некодирајућа РНК на INK4 локусу, смештена у кластеру гена p15/CDKN2B-p16/CDKN2A-p14/ARF. Важно је да откривене варијанте нису повезане ни са једним од традиционалних фактора ризика за КВБ (са изузетком дијабетеса), што указује на до сада непознате механизме који доводе до атеросклерозе. Важни гени/SNPs који имају улогу у идентификацији КВБ су *ANRIL* и *FTO* (ризик од инфаркта миокарда) (Palomaki и сар., 2010), *SORT1* и *APOE* (ниво холестерола у плазми) (Marais и сар., 2019), *APOA5* (ниво триглицерида у плазми) (Nadkarni и сар., 2018) и *MC4R* (гојазност) (Xi и сар., 2012).

1.1.4. Фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести

Многи фактори ризика као што су старост, пол, позитивна породична анамнеза за КВБ, пушење, физичка неактивност, гојазност, артеријска хипертензија, хиперлипотеинемична дисбаланс биохемијских параметара, терапија лековима и генетичка предиспозиција могу утицати на степен геномског оштећења, као и на саму појаву болести (Bays и сар., 2021).

Ризик за настанак КВБ се повећава са повећањем година старости. Код жена се тај ризик повећава у периоду менопаузе (од око 50. године), док код мушкараца расте од 40. до 60. године старости. Код мушкараца у средњем животном добу, исхемија срца је 2-5 пута чешћа него код жена. Код жена пре менопаузе, КВБ су ретке због протективног ефекта естрогена, осим у случају ако имају хиперлипидемију или дијабетес (Kannel, 2002; Shirato и Swan, 2010).

Пушење цигарета има неповољан утицај на липидно стање, факторе згрушавања и деловање тромбоцита. Пушачи имају 2-3 пута већи ризик за развој КВБ у односу на непушаче. Код пушача ризик за настанак инфаркта миокарда је већи за око 50% него код непушача. Такође и пасивни пушачи имају већи ризик, за око 23%, да оболе од исхемијске болести срца (SmithJr и сар., 2006). Ризик за КВБ код бивших пушача се смањује за 50% током једне године, док се након 15 година изједначава са ризиком код непушача (Wright и сар., 2011). Доказано је да никотин изазива вазодилатацију у мишићима, доводи до развоја хроничне хипертензије, тахикардије и велике потрошње кисеоника (Mihajlović и Pavlović, 2011).

Прекомерна тежина у комбинацији са хипертензијом и хиперхолестеролемијом повећава ризик за настанак и развој КВБ (Welsh и сар., 2024). Услед прекомерне гојазности повећава се липолитичка активност липоцита масног ткива, ослобађају се масне киселине и цитокини у јетри, због чега долази до дисфункције јетре и метаболизма масти и угљених хидрата (Dell’Osbel и сар., 2023). Такође и физичка неактивност утиче на развој КВБ, тако што се повећава оксидациони стрес, смањује функција ендотела и повећава ниво атерогених липопротеина и инсулинска резистенција (Stajić и Donović, 2016). Према препорукама Светске здравствене организације одраслима се препоручује око 30 min свакодневне физичке активности (WHO, 2022).

Поред веома значајне укупне концентрације холестерола у крви, битан је и његов однос у липопротеинским фракцијама. Око 70% се налази у облику липопротеина мале густине (*енгл.* low-density lipoprotein, LDL) (лош холестерол), док је остатак у облику липопротеина велике густине (*енгл.* high-density lipoprotein, HDL) који има протективни ефекат на процес атеросклерозе. Услед пораста нивоа холестерола за 0,6 mmol/l, јавља се повећан ризик за настанак КВБ за чак 23% (Boekholdt и сар., 2012).

Хипертензија је значајан фактор ризика за настанак КВБ и често је повезана са кардиоваскуларним морталитетом (Zeng и сар., 2022). Систолни крвни притисак већи од 140 mmHg или дијастолни притисак већи од 90 mmHg значајно повећавају ризик од атеросклеротичке болести срца. Нарочито се ризик повећава са повећањем дијастолног притиска. Јавља се код више од 50% људи старости ≥ 60 година (Ren и сар., 2022).

Шећерна болест јасно повећава склоност за развој КВБ, али повећава и смртност удружену са КВБ. Пацијенти са дијабетесом типа 2 имају дупло већи ризик за развој КВБ. Уколико се јави повећан ниво шећера у крви, долази до оштећења унутрашњости артерија (Zhang и сар., 2020). У односу на особе са нормалном гликорегулацијом, пацијенти са дијабетесом чешће оболевају од срчане инсуфицијенције, јер коронарна атеросклероза има тежи облик и доста брже се развија. Поремећај у гликорегулацији доводи до повећаног ризика за настанак срчане инсуфицијенције код пацијената са акутним инфарктом миокарда и тако да је често дијабетес удружен са дијастолном дисфункцијом и фиброзом миокарда (Shah и Mann, 2011). Утврђено је да повишен ниво глукозе у крви формира лезије у кардиоваскуларном систему утичући на миокард, а клинички се испољава као дијабетичка кардиомиопатија (Seferović Mitrović и сар., 2012).

1.2. Тестови за детекцију мутација у хуманим ћелијама

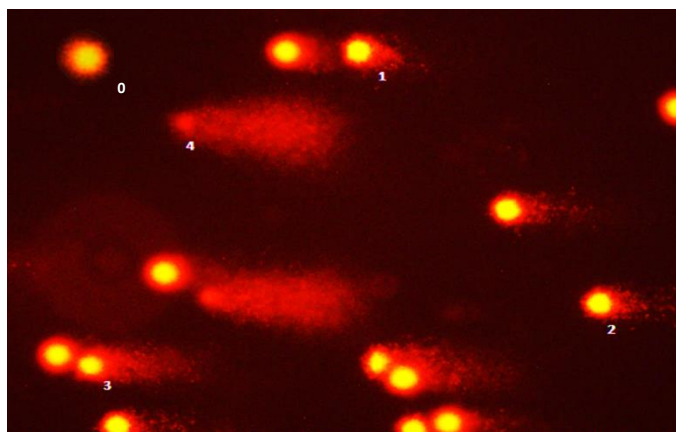
За утврђивање промена у генетичком материјалу постоје тестови који се могу применити у *in vitro* и *in vivo* условима. Класификују се у три групе: тестови за детекцију генских мутација, тестови за детекцију хромозомских аберација и тестови за детекцију промена на нивоу молекула ДНК. Већина ових тестова представља рутинске процедуре које најчешће анализирају генотоксичност одређеног агенса. Међутим, ради добијања потпуније слике о механизму дејства и процени генотоксичног потенцијала неког агенса, најчешће се користе комбинације ових тестова (Yamamoto и сар., 2021).

1.2.1. Комет тест

Тест гел електрофореза појединачних ћелија или комет тест је брза, једноставна и економична метода која се користи за процену нивоа оштећења молекула ДНК у појединачним ћелијама. У последњој деценији дошло је до пораста употребе комет теста који је за кратко време нашао широку примену у епидемиолошким и биомониторинг студијама код људи, али и других организама, за одређивање ДНК оштећења, као резултата стила живота или професионалне изложености неком мутагену или самој животној средини (Bonassi и сар., 2021; Jiang и сар., 2023). Како би се постигли различити циљеви, временом је дошло до развоја бројних типова комет теста, који се користе за праћење ДНК оштећења у *in vivo* и *in vitro* третманима.

Неутрални комет тест подразумева лизу ћелија и електрофорезу која се одвија у неутралним рН условима, при чему се анализирају дволанчани прекиди молекула ДНК који су доста ређи од једноланчаних прекида који се константно формирају у нашим ћелијама током неких природних процеса (Roy и сар., 2021; Vivehd и сар., 2024).

Основни принцип базног комет теста је детектовање оштећења молекула ДНК праћењем ћелијских миграција у агарозном гелу. При третману у јако базној средини ($\text{pH} > 13$) долази до денатурације молекула ДНК, тако да се поред дволанчаних могу идентификовати и једноланчани прекиди ДНК. Под утицајем електричног поља, фрагменти молекула ДНК мигрирају према аноди формирајући реп комете. Количина молекула ДНК у репу је директно сразмерна степену ДНК оштећења. С обзиром да молекул ДНК мигрира одвојено из појединачних ћелија, могуће је утврдити различитост у одговорима испитиваних група ћелија. Приликом миграције молекула ДНК, један део се задржава на нивоу једра, па се стиче визуелни изглед „главе“, а фрагменти молекула који брже мигрирају се надовезују на главу комете и јавља се визуелни изглед „репа“ комете (Слика 8) (Collins и сар., 2023).



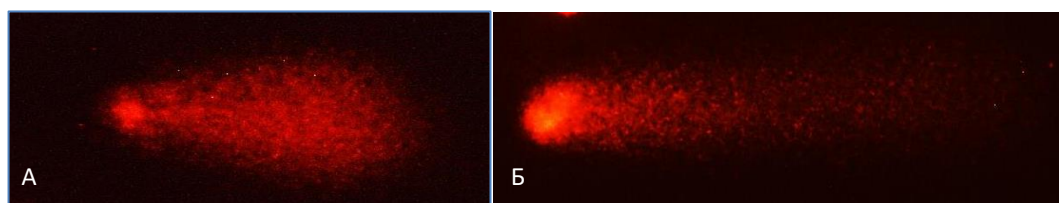
Слика 8. Изглед ћелија приликом миграције молекула ДНК

Ензимски комет тест је високо сензитиван због специфичне функције ензима. Њиме се могу пратити оштећења као што су оксидационе базе или UV индуковани димери. За детекцију оксидационих пиримидина користи се ендонуклеаза III, док се за оксидационе пурине користи формаидопиримидин гликозилаза (Fpg, *енгл.* formamidopyrimidine DNA glycosylase), uvrABC (ензимски комплекс) који детектује UV оштећења, метиладенин ДНК гликозилаза II (AlkA) за детекцију 3-метиладенин места и урацил гликозилаза за детекцију места са неправилно уграђеним урацилом (Muruzabal и сар., 2021).

Комет тест у комбинацији са флуоресцентном *in situ* хибридизацијом (FISH комет) је први пут примењен на људским ћелијама како би се упоредила локализација специфичних хромозомских домена у интерфазним једрима са њиховом дистрибуцијом у глави и репу комета након електрофорезе. Тачније, овај тест омогућава одређивање просторне дистрибуције хромозом-специфичних ДНК секвенци на нивоу појединачних једара (неелектрофорезовано), као и у хроматинским влакнима комета (електрофорезована хромозомска ДНК), (Hovhannisyan, 2010).

Предности комет теста у односу на друге генотоксичне тестове су вишеструке, висока сензитивност у детектовању ниског нивоа оштећења молекула ДНК, откривање генотоксичности без митотичке активности, мали број ћелија који је потребан за анализу (100 ћелија по узорку), једноставна примена, резултати могу бити готови за 24 сата и релативно економична метода. Последњих деценија комет тест је фундаменталан у генетичкој токсикологији, екогенотоксикологији, проучавању репер механизма молекула ДНК, хуманом биомониторингу и анализи ћелијског циклуса (Bhat и Gandhi 2018; Møller и сар., 2020; Tubić Vukajlović и сар., 2021a; Collins и сар., 2023).

Комет тест је нашао примену и у изучавању процеса апоптозе и некрозе, у којима се јавља фрагментација молекула ДНК. Сматра се да би различит изглед комете, класе 4, могао да се искористи за разликовање апоптозе од некрозе у базној верзији комет теста. Апоптотичне ћелије стварају комете са малим главама и лепезастим реповима, док некротичне ћелије стварају комете са великим главама и узаним реповима различите дужине (Слика 9), (Shaker и Melake, 2012).



Слика 9. Различит изглед комета класе 4: А) апоптотична Б) некротична ћелија

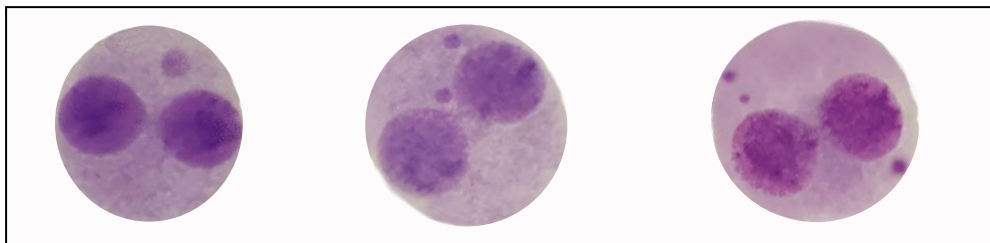
Оштећења молекула ДНК могу настати након дејства неких ендогених и/или екзогених фактора као што су високоенергетска радијација, агенси за алкиловање, реактивне врсте кисеоника и грешке у репликацији ДНК и додатно проузроковати развој неких болести (Newsheen и Yang, 2012).

Иако се већина студија применом комет теста бавила испитивањем генотоксичних ефеката изазваних *in vitro* у људским, животињским и биљним ћелијама, број *in vivo* студија на људима се знатно повећао у последњих пар година. Најчешће коришћене ћелије за *in vitro* и *in vivo* цитогенетичке анализе су лимфоцити периферне крви, због једноставног начина узорковања и због самих њихових карактеристика. Хумани Т лимфоцити периферне крви представљају одличне биомаркере ДНК оштећења, живе веома дуго (120 дана), циркулишу свуда по телу и долазе у контакт са готово свим ткивима и органима у телу, повремено излазе из циркулације, улазе у слезину и лимфне жлезде и поново се враћају у циркулацију. Због овако специфичног карактера и путање кретања, лимфоцити акумулирају бројна генетичка оштећења и представљају изузетне показатеље цитогенетичких оштећења и општег стања здравља (Grujić и сар., 2020; Suto и сар., 2020; Milošević-Djordjević и сар., 2021).

1.2.2. Микронуклеус тест

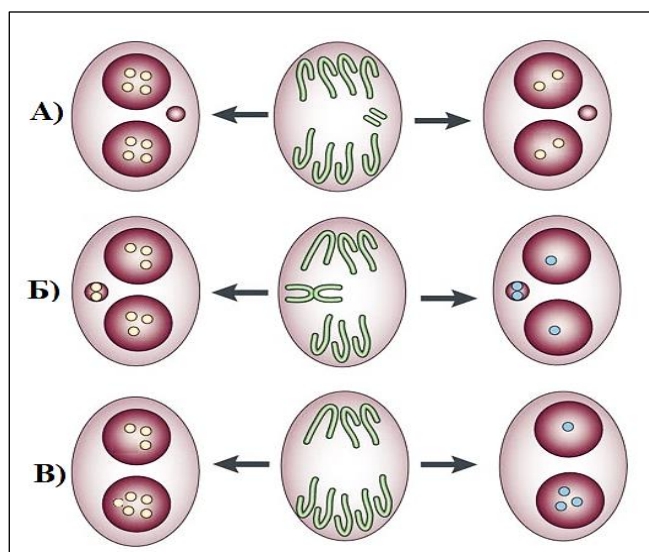
Људи су свакодневно изложени бројним физичким, хемијским и биолошким агенсима попут температуре, зрачења, природних и синтетисаних супстанци, вируса и бактерија, што индукује хромозомска оштећења у ћелијама. Као резултат ових

оштећења долази до формирања екстрануклеусних хроматинских структура које подсећају на мала једра у цитоплазми названа микронуклеуси (МН) (Слика 10). МН најчешће воде порекло од ацентричних фрагмената, који настају услед прекида хроматида/хромозома или услед поремећене функције деобног вретена од целих хромозома, заосталих у анафази ћелијске деобе (Не и сар, 2019).



Слика 10. Бинуклеусне ћелије са једним, два и три микронуклеуса

Бројни типови хромозомских аберација могу да проузрокују појаву МН. Пре свега су то дицентрични хромозоми, прстенасти (ринг) хромозоми, ацентрични фрагменти, хромозомски прекиди или цели хромозоми код којих је дошло до оштећења у центромерном региону (Слика 11). Фрагменти хромозома или цели хромозоми услед губитка оријентације у односу на нити деобног вретена током анафазе, губе способност мигрирања ка половима ћелије и уласка у састав једра, формирајући МН у цитоплазми.



Слика 11. Механизми настанка микронуклеуса. А) Микронуклеус који потиче од заосталог ацентричног фрагмента хромозома Б) Микронуклеус који потиче од заосталог целог хромозома В) једра бинуклеусне ћелије са неправилно раздвојеним хромозомима (преузето и прилагођено: Fenech, 2007)

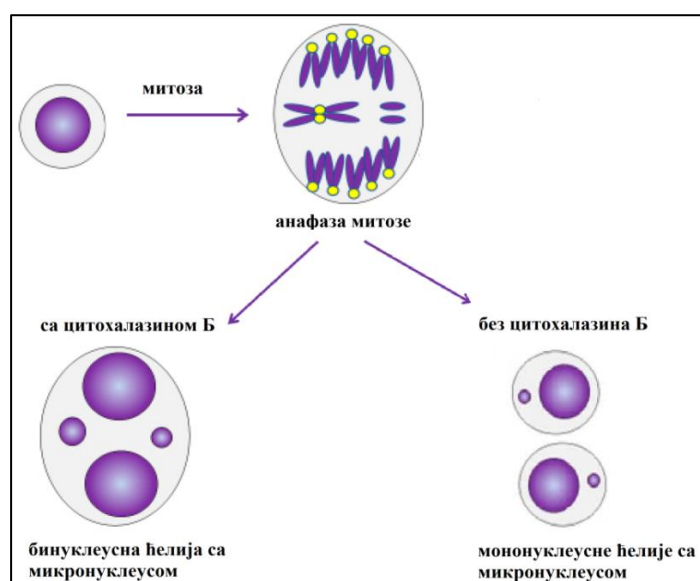
Cavallo и сар. (2007) су утврдили корелацију између састава и величине МН. Закључили су да МН мале величине воде порекло од фрагмента ДНК или целих малих хромозома, док они већи углавном потичу од целих хромозома или од већег броја ацентричних фрагмената. Праћење МН унутар ћелијске цитоплазме, који су јасно одвојени од главног једра, представља суштину стандардног и једног од најкоришћенијих тестова за детекцију оштећења хромозома у ћелијама, МН теста. Овим тестом се успешно детектују аберације хромозома у *in vitro* и *in vivo* условима.

МН тест се успешно примењује на различитим типовима ћелија људи: букалне ћелије (Naderi и сар., 2012), кератиноцити, фибробласти (Slonina и сар., 2003), као и лимфоцити периферне крви (Milošević-Djordjević и сар., 2021; Tubić Vukajlović и сар., 2023, 2024). Резултати МН теста добијени анализом више хиљада лимфоцита дају веома прецизне и валидне податке о утицају испитиваних агенаса.

Повећана фреквенца МН у лимфоцитима представља одраз хромозомске нестабилности и уочена је и код особа са Паркинсоновом и Алцхајмеровом болешћу (Petrozzi и сар., 2002), канцером (Milošević-Djordjević и сар., 2010), инфертилитетом (Milošević-Djordjević и сар., 2012) и КВБ (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023). Bonassi и сар. (2007) су установили да повећана фреквенца МН у лимфоцитима може бити маркер ризика за појаву канцера.

1.2.2.1. Цитокинезис – блок микронуклеус тест

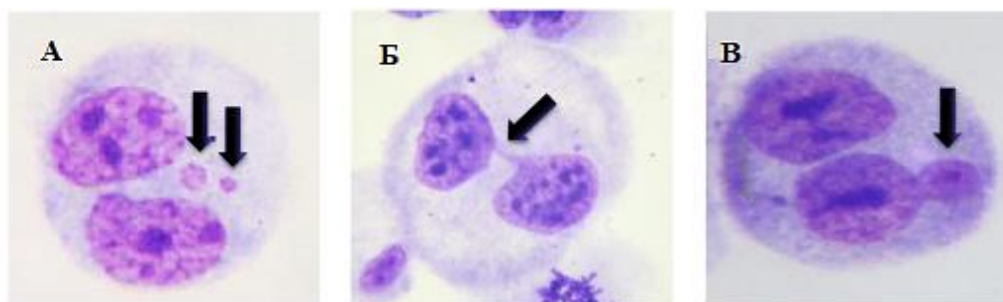
Деоба лимфоцита је неопходна како би се хромозомско оштећење видело као МН. Међутим, уколико се ћелија у којој се десила аберација подели више пута, фреквенца МН се смањује. Да би се спречила вишеструка деоба ћелија и да би се омогућила анализа МН у цитоплазми ћелија које су прошле кроз само једну деобу, уведена је специфична метода која представља модификацију конвенционалног МН теста и назива се цитокинезис – блок МН (ЦБМН) тест (Fenech, 2020). ЦБМН тест се заснива на инхибицији цитокинезе, при чему се кариокинеза одвија неометано и резултира настанком бинуклеусних (БН) ћелија. Овај процес се постиже додавањем супстанце, изоловане из гљивице *Helminthosporium dematioides*, која се назива цитохалазин Б, у културу ћелија лимфоцита пре прве митозе. На тај начин могуће је утврдити реалну фреквенцу МН, који могу да настану услед деловања агенаса који проузрокују хромозомска оштећења. Механизам деловања цитохалазина Б огледа се у спречавању цитокинезе инхибицијом полимеризације актинских филамената, онемогућавајући стварање контрактилног прстена изграђеног од актинских и миозинских филамената (Lambert и сар., 2023) (Слика 12).



Слика 12. Ћелијска деоба и формирање микронуклеуса уз додавање цитохалазина Б и без цитохалазина Б у култури ћелија (преузето и прилагођено: Fenech, 2020)

ЦБМН тест је једноставан, брз и поуздан тест, који омогућава анализу великог броја ћелија (више хиљада лимфобласта), што доприноси добијању објективније слике оштећења хромозома. Реагује на врло ниске дозе агенаса који ломе хромозоме, и на оне који доводе до губитка целих хромозома. У односу на конвенционалну методу, овом методом се прецизније утврђује фреквенца МН (Fenech, 2020).

Поред анализа које се заснивају на детекцији МН (Слика 13А), ЦБМН тест се прате други цитогенетички биомаркери, као што су нуклеоплазматски мостови (НПМ) (Слика 13Б) и нуклеусни пупољци (НП) (Слика 13В) (Fenech, 2007).



Слика 13. Биомаркери генетичког оштећења А) Бинуклеусна ћелија са два микронуклеуса; Б) Бинуклеусна ћелија са нуклеоплазматским мостом; В) Бинуклеусна ћелија са нуклеусним пупољком (преузето и прилагођено: Lopes и сар., 2020)

НП представљају хромозомска оштећења која настају услед појаве вишка хромозома у анеуплоидној ћелији, ослобођених ДНК репарираних комплекса или амплификоване ДНК. НП су прикачени за једно ћелије дршком и морфолошки личе на МН (Fenech и сар., 2011) (Слика 13В).

Током анафазе, центромере дицентричних хромозома се орјентишу ка различитим половима, при чему може доћи до неправилних раздвајања сестринских хроматида. НПМ настају фузијом крајева теломера услед делеције самих теломера или услед грешака у репарацији прекида у ДНК, због чега НПМ представљају значајне биомаркере реаранжмана дицентричних хромозома. Врло ретко се у једној БН ћелији може детектовати више од једног НПМ (Fenech и сар., 2011).

На основу односа лимфобласта са једним и већим бројем нуклеуса могуће је у овом тесту и израчунавање индекса нуклеусне деобе (NDI, *енгл.* nuclear division index), а посредством њега евентуални цитотоксични ефекат агенса. ЦБМН тестом се може поред генотоксичног ефекта утврдити и цитотоксични ефекат запажањем хромозомских прекида или губитака фрагмената, хромозомског нераздвајања, ћелија у некрози и апоптози (Fenech, 2020).

Такође, ЦБМН тест се користи за испитивање дејстава агенаса који изазивају прекиде на хромозомима (кластогени агенси), као и оних који доводе до губитака целих хромозома (анеугени агенси). Применом овог теста добијају се бројни подаци који су показатељи генотоксичног, цитотоксичног и цитостатског дејства бројних агенаса (Fenech, 2020). Хромозомски губици се могу детектовати применом анти-кинетохорних антитела или хромозом-специфичних центромерних ДНК проба (Fenech, 2020), тако што се МН који садрже целе хромозоме детектују бојењем центромерног региона или кинетохора. Хромозом-специфичним ДНК пробама се утврђује

дистрибуција хромозома између нуклеуса БН ћелије. Такође, овом методом се детектује и неправилно раздвајање хромозома (Baumgartner и сар., 2006). Међутим, ЦБМН тестом се не могу детектовати некластогени агенси (који не ломе хромозоме), као ни агенси који не узрокују заостајање хромозома у анафази. Још један недостатак ЦБМН теста се огледа у примени одговарајуће концентрације цитохалазина Б за сваки тип ћелије. Fenech (2007) је утврдио да концентрација цитохалазина Б од 1-6 $\mu\text{g/ml}$ није доводила до повећања фреквенце МН у бинуклеусним лимфобластима, као и у другим ћелијама које се обично користе у овом тесту.

Спонтани (базални) настанак МН у лимфоцитима периферне крви здравих особа настаје током животног века Т лимфоцита, акумулирањем генетичких оштећења. Поред спонтаног настанка МН, у телу се могу јавити и МН настали индукцијом различитих природних или вештачких агенаса. Спонтана фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви је знатно нижа у односу на индуковану фреквенцу. Како би се ЦБМН тестом утврдило дејство појединих агенаса који изазивају генетичка оштећења, јако је битно утврдити ниво спонтано насталих МН (Fenech, 2007).

HUMN (Human MicroNucleus) пројекат представља велики пројекат који се бави анализом фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви људи, а укључио је више од 30 лабораторија широм света (<http://www.humn.org>). На основу анализе око 7 000 здравих особа, просечна базална фреквенца МН износила је 6,5/1000 анализираних БН ћелија са опсегом варирања 3-12 МН/1000 БН ћелија (Bonassi и сар., 2001). Поред базалне фреквенце, многи фактори средине, природни или вештачки, значајно утичу на фреквенцу МН.

1.3. Фактори који утичу на промене у геному на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома

Бројне студије су показале да са порастом година старости се повећава геномска нестабилност, тачније са старењем слаби ефикасност репер механизма и акумулирају се вишегодишња нерепарирана цитогенетичка оштећења (Santovito и Gendusa, 2020; Laffon и сар., 2021). Piperakisi и сар. (2009) су показали да је старија популација, од 60 до 70 година, имала виши базални ниво ДНК оштећења и да је та популација била осетљивија на ефекте различитих агенаса у односу на популацију особа старости између 40 и 50 година, а која је била осетљивија од најмлађе испитиване популације (5-10 година). Такође су показали да су године старости значајно повећавале фреквенцу ћелија у апоптози и некрози. Особе старије од 20 година су имале фреквенцу МН у сталном порасту (Nefic и Handzic, 2013). Истраживања спроведена у Републици Србији, указују на то да се на нашем поднебљу са старошћу повећава фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви људи, и то тако да до 40 година старости МН фреквенца расте упоредо са годинама, док код старијих особа, услед смањења пролиферативног капацитета, фреквенца МН опада са повећањем година старости (Milošević-Djordjević и сар., 2002). Franzke и сар. (2014) су закључили да око 60. године не долази до промена у фреквенци МН, односно долази до изједначавања фреквенце између мушке и женске популације, што објашњавају развијеном отпорношћу организма старијих особа на формирање хромозомских оштећења или чак активирањем процеса апоптозе који одводе ћелије са већим бројем МН у природну ћелијску смрт.

Сprovedена су и истраживања у циљу испитивања корелације пола и нивоа геномског оштећења. Darlina и сар. (2022) су показали статистички незначајно повећан ниво ДНК оштећења код жена у поређењу са мушкарцима, који живе у области високог нивоа природног зрачења у Мамују, у Индонезији. Постојање давидита, торијанита, гумита и аутонита у алкалним вулканским стенама у области Мамују произвело је високу природну радиоактивност (Syaeful и сар., 2014). Garm и сар. (2013) су спровели истраживање на 200 становника у Данској и показали да нема утицаја пола на ДНК оштећења. Међутим, постоје и студије које су показале већи ниво оштећења ДНК код мушкараца у односу на жене (Rahardjo и сар., 2017; Fischer и Riddle, 2018), али треба узети у обзир, нарочито код мушкараца, и друге факторе попут пушења и навика конзумирања алкохола (Bonassi и сар., 2021). Већина студија је показала да је просечна фреквенца МН код мушкараца мања него код жена (Bukvić и сар., 2000; Surniyantoro и сар., 2018), вероватно због повећане дистрибуције X хромозома у МН упоредо са годинама старости. Код жена фреквенца МН са годинама старости расте и достиже максимум у периоду од 45. до 54. године, а након тога долази до значајног пада у фреквенци МН. Код мушкараца старости од 45. до 54. године, фреквенца МН је скоро за 70% мања од оних код жена истог старосног доба, а након тога долази до изједначавања у просечним фреквенцама МН (Ferraz и сар., 2016). Wojda и сар. (2007) су утврдили да не постоји разлика у фреквенцама МН код жена и мушкараца старијих од 60 година. Такође је утврђено да пол не утиче на фреквенцу МН у лимфоцитима умбиликалне крви новорођенчади (Milošević-Djordjević и сар., 2007) и МН периферне крви особа млађих од 19 година (Neri и сар., 2005).

Сматрало се да ће повећан ниво ДНК оштећења бити узрокован пушачким навикама услед стварања слободних радикала. Међутим, дувански дим представља сложену мешавину генотоксичних и канцерогених агенаса, па повезаност примарног ДНК оштећења и навике пушења су још увек предмет расправе. Хетерогеност резултата се може огледати и у честом занемаривању пасивних пушача и погрешном разматрању електронских цигарета, које такође могу изазвати прекиде ДНК ланца у лимфоцитима (Tadin и сар., 2024). Russo и сар. (2020) су показали да навике пушења не утичу на базални ниво примарног ДНК оштећења у лимфоцитима здравих, младих особа. Међутим, доступни литературни подаци наводе да је употреба дувана изазвала значајно повећање фреквенце комета у лимфоцитима пушача него код непушача (Osswald и сар., 2003; Gleit и сар., 2005). Најобимнију и најзначајнију студију о утицају конзумирања цигарета на фреквенцу МН су спровели Bonassi и сар. (2003). Испитивања су обављена у сарадњи 24 лабораторије на преко 5 700 испитаника. Резултати су показали да пушачи нису имали значајно већу МН фреквенцу у односу на непушаче, изузетак су били пушачи који су конзумирали више од 30 цигарета дневно. Такође, друге студије о утицају конзумирања цигарета на фреквенцу МН у лимфоцитима нису утврдиле корелацију између пушења и фреквенце МН (Milošević-Djordjević и сар., 2012; Vital и сар., 2021). Са друге стране, неке студије су показале супротно (Naverić и сар., 2010; Dosi и сар., 2016; Mohammed и сар., 2020).

Резултати студија испитивања утицаја конзумирања алкохола на ниво ДНК и хромозомских оштећења су контрадикторни. Bonassi и сар. (2021) су показали да конзумирање алкохола доводи до повећаног нивоа ДНК оштећења, нарочито у мушкој популацији. До сличних резултата су дошли и Ramos и сар. (2016) који су открили повећано оштећење ДНК молекула у групи алкохоличара у односу на контролну групу. Сенгеровим секвенцирањем су одрадили и анализу полиморфизама (rs3813867, rs2031920 и rs2031921) у гену *CYP2E1*. Алкохоличари који су хетерозиготи за

варијанте *CYP2E1* rs3813867, rs2031920 и rs2031921 показали су веће оштећење ДНК у поређењу са хомозиготима за немутирани алел. Maffei и сар. (2002) су испитивали фреквенцу МН код особа које су конзумирале алкохол и закључили да су фреквенце МН биле повећане код конзумента у поређењу са особама које уопште нису конзумирале алкохол и оних који су апстинирали. Међутим, касније студије су показале да алкохол није имао ефекат на фреквенцу МН (Coskun и сар., 2013; Gajski и сар., 2018; Reimann и сар., 2020).

Тип и начин исхране су веома значајни фактори који утичу на геномску нестабилност у лимфоцитима периферне крви (Fenech и сар., 2005; Kazimírová и сар., 2006). Правилна и редовна физичка активност побољшавају процес репарације и смањење нивоа хромозомских оштећења (Santovito и сар., 2023). Исти аутори су показали да особе које исхрану базирају на доста поврћа, воћа и рибе, имају нижу фреквенцу МН. Витамини, минерали и фолна киселина као битни нутријенти, који помажу активност ензима, укључени су у процесе репликације и репарације ДНК и спречавању оксидационих оштећења, па су изузетно важни у одржавању генетичке стабилности, а њихов недостатак у исхрани може довести до повећане нестабилности генома (Fenech и сар. 2023).

1.4. Гљиве као извор биолошки активних супстанци

Гљиве (*Fungi* или *Mycota*) су засебно царство еукариота, представљајући бројну групу организама. Деле се на макромицете и микромицете. Вегетативно тело већине гљива образује мицелија, која је саграђена од хифа које имају диференциран зид, а могу бити сегментисане или несегментисане. Гљиве се хране хетеротрофно, а ћелијски зид им је изграђен од хитина. Гликоген се акумулира у ћелијама гљива као резервни продукт. Гљиве се од биљака разликује по синтези аминокиселине лизина, која се најчешће одвија уз присуство аминокиселине лизина. У циклусу развића гљива најчешће се среће хаплоидни и дикариотски стадијум, док је диплоидни ређи (Ranković, 2011). *Fungi* се, према класификацији Ainsworth-a (1973), деле на два раздела: *Mycomycota* и *Eumycota*.

Бројне врсте гљива, пре свега макромицета, представљају огроман, али и даље мало искоришћен, економичан извор хране. Значајно је и да гљиве нуде високе изворе биоактивних једињења разноврсне хемијске структуре са потенцијалном применом у третману многих болести, па се сматрају моћним изворима за откриће нових лекова (Nandi и сар., 2024).

Макромицете се сматрају богатим извором фитонутријената, као што су минерали, полисахариди, дијететска влакна, протеини, есенцијалне аминокиселине и једињења која побољшавају имуни одговор, због чега их треба увести у свакодневну исхрану (Stajić, 2015; Rosemary и сар., 2019). Поред најчешће испитиване имуномодуларне активности, свежа и обрађена плодносна тела, њихови екстракти, као и изолована једињења могу имати и многобројне друге ефекте, попут антимутагених (Tubić Vukajlović и сар., 2021b), антитуморских, антиоксидационих, антихипертензивних, антихиперхолестеролних, антивирусних, антимикробних, хепатопротективних, остеопротективних, анти-хипергликемијских (Anusiya, 2021) и кардиопротективних (Yu и сар., 2020). Бројне врсте макромицета се користе у циљу постизања заштитних ефеката против проблема са пажњом, памћењем, расуђивањем,

решавањем проблема, доношењем одлука, говором и разумевањем (Zhong и Xiao, 2009). Дијететски додаци на бази макромицета су корисни у превенцији и ублажавању болести. Макромицете и њихови деривати не могу заменити комерцијалне лекове, али у комбинацији са конвенционалним медицинским третманима могу да омогуће пацијентима стабилније стање организма (Fox и Howlett, 2008). Различита испитивања су вршена у циљу могућности коришћења целих плодноносних тела или њихових екстраката као адитива храни, пре свега у циљу јачања имунитета организма, али и у лечењу и ублажавању симптома бројних болести (Stajić, 2015). Генерално, постоје неке врсте макромицета које су доста истражене у погледу биолошке активности и њихових биолошки активних супстанци, али постоје и макромицете које се користе у исхрани, а ефекти њихових биолошки активних једињења још увек нису испитани. Међутим, постоје и макромицете које нису јестиве, а које се традиционално користе у народној медицини, међу којима је *Lenzites betulinus* (L.) Fr. (1838).

1.4.1. Врста *Lenzites betulinus* (L.) Fr. (1838)

Lenzites betulinus (L.) Fr. (1838), у народу позната као брезина листичавка, нејестива је гљива из породице Polyporaceae и типска је врста рода *Lenzites* Fr. (1835). Синоним за ову врсту је *Lenzites betulina* и *Trametes betulina* (L.) Pilat (1939).

Брезину листичавку је први пут описао Карл Лине (Carl Linnaeus) 1753. године у делу *Species Plantarum* и назвао је *Agaricus betulinus*. Велики шведски миколог Елиас Магнус Фриес (Elias Magnus Fries) придружио је ову врсту у род *Lenzites* 1838. године, а *Lenzites betulinus* је и данас општеприхваћено научно име.

L. betulinus припада следећој таксономској хијерархији (Robert и сар., 2005):

Regnum: Fungi
Subregnum: Dikarya
Phylum: Basidiomycota
Subphylum: Agaricomycotina
Classis: Agaricomycetes
Ordo: Polyporales
Familia: Polyporaceae
Genus: *Lenzites* Fr. (1836)
Species: *Lenzites betulinus* (L.) Fr. (1838)

Плодносно тело брезине листичавке је копитасто, лепезастог облика, дужине до 5 cm и ширине до 10 cm, једним делом је причвршћено за супстрат (кору дрвета). На месту причвршћивања је дебљине 1-2 cm. Горња површина плодносног тела је сува, глатка, таласаста, концентрично зонирана са различитим нијансама боја, од беле до тамно браон, а како стари, јавља се и зелена боја од алги, док ивице остају беле и танке (Kosanić и Ranković, 2018), (Слика 14).



Слика 14. Изглед плодносног тела врсте *Lenzites betulinus* (L.) Fr.

Хименофор, који представља део плодносног тела на коме се развијају споре, карактеришу хименије облика шкрга или листића које се гранају, преплићу и спајају до ивице шешира, дубине до 1 cm (Слика 15). Хименије су у почетку беле, а на крају постају жућкастосмеђе (Kosanić и Ranković, 2018).



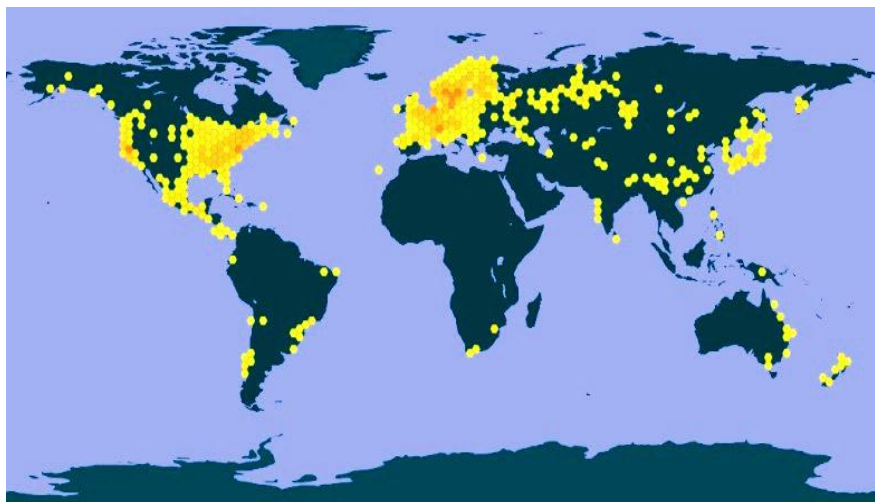
Слика 15. Изглед хименофора листичавке

Отисак спора је као лавиринт, светло крем боје и неамилоидне. Месо је влакнасто, танко, дебљине око 3 mm, беле боје, без карактеристичног мириса (Kosanić и Ranković, 2018), (Слика 16).



Слика 16. Изглед меса гљиве на пресеку

Брезина листичавка расте појединачно или груписана на живом, а најчешће на мртвом дрвету брезе (*Betula*), храста (*Quercus*) и букве (*Fagus*) изазивајући белу трулеж, док се на осталом листопадном дрвећу и четинарима ретко јавља. Јавља се током целе године и добро је распрострањена широм света (Слика 17), али споре ослобађа у јесен (Kosanić и Ranković, 2018).



Слика 17. Распрострањење врсте *Lenzites betulinus* (преузето и прилагођено: <https://www.gbif.org/species/5465199>)

L. betulinus нема никакву вредност као храна, јако је жилава, али се користи у традиционалној кинеској медицини за лечење болести вена и тетива, акропатију, за болове у костима, за стимулацију крвотока, такође и као лек против прехладе (Ren и сар., 2006; Kosanić и Ranković, 2018). Познато је да испољава антихипертензивну (Hardin и сар., 2017), антитуморску (Nandi и сар., 2024), антихипергликемијску (Hussin и сар., 2016), антиоксидациону и антимикробну (Liu и сар., 2012, 2014) активност. Препоручује се особама са КВБ, пошто је богата флавоноидима који инхибирају оксидацију LDL-а и спречавају настанак КВБ (Fakoуа и Oloketuyi, 2012; Kosanić и Ranković, 2018). Сматра се добрим антибиотским средством (Liu и сар., 2014). Из гљиве *L. betulinus* су изолована два инхибитора пероксидазе липида, бетулинан А (2,5-дифенил-3,6-диметокси-*p*-бензохинон) и Б (2-фенил-3-метокси-[1H-2-бензопиран][4,3-*e*][*p*]бензохинон) и утврђена је њихова структура (Lee и сар., 1996). Најчешће се користи као чај, тинктура, декокт или екстракт.

2. ЦИЉ РАДА

Имајући у виду значај испитивања геномског оштећења/геномске нестабилности у лимфоцитима периферне крви у процени здравственог стања код људи, као и примену гљива у народној медицини, основни циљ ове дисертације је:

1. Утврђивање нивоа оштећења молекула ДНК применом комет теста и хромозомске нестабилности анализом фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви пацијената са КВБ (акутни коронарни синдром и срчана инсуфицијенција) након комбинованог терапијског третмана АСЕ-инхибиторима, бета блокаторима, диуретицима, статинима, антикоагулансима и двојном антиагрегационом терапијом
2. Одређивање ефекта малих доза зрачења на ниво оштећења молекула ДНК и хромозомску нестабилност у лимфоцитима периферне крви пацијената пре и након КА, као терапеутске и дијагностичке методе код пацијената са акутним коронарним синдромом
3. Анализа утицаја фактора ризика као што су пол, године старости, породична анамнеза, хипертензија, хиперхолестеролемија, гојазност, пушење и други на испољавање геномске нестабилности у лимфоцитима пацијената
4. *In vitro* студија ефекта екстракта гљиве *L. betulinus* на терапијом/зрачењем-индуковано геномско оштећење у лимфоцитима периферне крви пацијената
5. Испитивање присуства биолошки активних једињења, као и њиховог садржаја у гљиви применом спектрофотометријских, хроматографских и спектроскопских анализа.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Експериментални део истраживања ове докторске дисертације је реализован у Лабораторији за генетику, у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Узорци крви пацијената су узети на Клиници за кардиологију, одељењу интервентне кардиологије, Универзитетског клиничког центра Крагујевац. Хемијске анализе гљиве су одрађене на Хемијском факултету, Универзитета у Београду.

3.1. Пацијенти

Анализом је обухваћено 90 особа: 60 са дијагностикованим КВБ, просечне старости $57,67 \pm 5,18$, са опсегом варирања од 48 до 68 година и 30 здравих особа (контролни узорак), просечне старости $56,83 \pm 6,04$, са опсегом варирања од 49 до 66 година старости. Од 60 пацијената, 30 (15 мушкараца и 15 жена) је имало дијагностикован акутни коронарни синдром, просечне старости $57,77 \pm 4,70$, а крв им је узимана два пута: непосредно пре дијагностичке процедуре – коронарне ангиографије и седам дана након коронарне ангиографије, као и 30 пацијената (15 мушкараца и 15 жена) са дијагностикованом срчаном инсуфицијенцијом, са $EF \leq 40\%$, просечне старости $57,74 \pm 5,69$. Акутни коронарни синдром се код 15 пацијената испољио као нестабилна ангина пекторис, а код 15 пацијената као акутни инфаркт миокарда укључујући STEMI и NSTEMI.

Пацијенти су дијагностиковани на основу клиничке слике, лабораторијских анализа (тј. мерења нивоа тропонина и proBNP, *pro-B-type natriuretic peptide*), налаза ЕКГ-а, ехокардиографије и коронарне ангиографије. Комплетна историја болести је узета од сваког пацијента. Укључујући фактори за испитивање пацијената су били мушкарци и жене старости од 45 до 70 година, присуство испитиване болести (акутни коронарни синдром или срчана инсуфицијенција), рендгенско зрачење током коронарне ангиографије код пацијената са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис и иста терапија лековима по групама болести. Доза рендгенског зрачења током коронарне ангиографије се разликовала од коронарне анатомије и сложености перкутаних коронарних интервенција (PCI, *енгл.* Percutaneous Coronary Interventions) које се користе као терапијске процедуре. Подаци о дози и дужини трајања рендгенског зрачења током коронарне ангиографије су аутоматски добијени са рендгенског апарата (General Electric Healthcare, AW Volume Share 5, Француска) након завршене процедуре. Укупне дозе јонизујућег зрачења, до 500 mGy ($247,39 \pm 153,27$) су биле у опсегу варирања од 44 до 500 mGy и преко 500 mGy ($948,25 \pm 450,48$) у опсегу варирања од 588 до 1805 mGy. Код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, укључујући фактор је била и $EF \leq 40\%$. Терапија лековима је обухватила групе АСЕ-инхибитора (*енгл.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor), бета-блокатора, двојне антиагрегационе терапије (након дијагностикованог акутног коронарног синдрома или перкутаних коронарних интервенција), диуретика, статина и антикоагуланса у различитим комбинацијама. Пацијенти су били на преписаној терапији од тренутка постављања дијагнозе (од неколико месеци до чак неколико година). Искључујући фактори су били процена за трансплантацију срца, зрачења у последњих шест месеци, малигнитет, компликације на јетри, бубрежни, плућни или други поремећаји. Контролну групу су чиниле здраве одрасле особе без претходне или

садашње историје било каквог срчаног обољења или других болести, усклађене према полу, старости и популацијској групи. Сви биохемијски параметри у време узорковања крви здравих особа били су у референтном опсегу. Такође, нису били изложени никаквим познатим генотоксичним агенсима. Студију је одобрио Етички комитет Универзитетског клиничког центра Крагујевац (18.01.4927). Од свих пацијената и здравих контрола добијен је писмени пристанак у складу са смерницама Хелсиншке декларације. Демографски и анамнестички подаци о пацијентима и здравим особама су приказани у Табелама 1 и 2.

Табела 1. Демографски и анамнестички подаци пацијената оболелих од кардиоваскуларних болести и здравих особа

Карактеристике	АКС n = 30	АКС након КА n = 30	СИ n = 30	Здраве собе n = 30
Старост у годинама	57,77 ± 4,70	57,77 ± 4,70	57,74 ± 5,69	56,83 ± 6,04
Пол				
жене	15	15	15	15
мушкарци	15	15	15	15
Старост по полу				
жене	58,93 ± 3,08	58,93 ± 3,08	60,27 ± 5,09	56,80 ± 5,16
мушкарци	55,75 ± 5,61	55,75 ± 5,61	54,87 ± 5,07	56,80 ± 6,70
Пушење цигарета				
пушач	11	11	17	8
непушач	14	14	8	22
бивши пушач	5	5	5	0
Пребивалиште				
село	11	11	11	8
град	19	19	19	22
Дозе X зрачења током коронарне ангиографије (mGy)	НАП -	373,93 ± 298,45 АИМ 633,53 ± 468,86	-	-
Хипертензија	25	25	27	-
Хиперлипидемија	28	28	29	-
Терапија				
АСЕ – инхибитори	25	25	30	-
Бета блокатори	30	30	30	-
Двојна антиагрегациона	30	30	27	-
Диуретик	17	17	27	-
Статини	25	25	21	-
Антикоагуланси	1	1	21	-
Породична анамнеза за КВБ				
позитивна	17	17	20	10
негативна	13	13	10	20

НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ – акутни инфаркт миокарда

Од укупно 30 пацијената са акутним коронарним синдромом, 11 пацијената је примило терапију из пет различитих група лекова, 16 пацијената је било подвргнуто терапији коју је чинила комбинација лекова из четири групе и троје пацијената је пило комбинацију из три групе лекова за КВБ. Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом су такође примали различиту комбинацију лекова. Девет пацијената је примило терапију из свих шест група, 18 пацијената је примило комбинацију из пет група, а само троје пацијената је примило терапију из четири групе лекова (Табела 2).

Табела 2. Комбинација групе лекова коју су примали пацијенти са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом

Донори	АСЕ- инхибитори	Бета блокатори	Двојна антиагрегациона	Диуретици	Статини	Антикоагуланси
<i>Пацијенти са акутним коронарним синдромом</i>						
1.	+	+	+	-	+	-
2.	+	+	+	+	-	-
3.	+	+	+	+	-	-
4.	+	+	+	+	+	-
5.	+	+	+	+	+	-
6.	+	+	+	-	+	-
7.	+	+	+	-	+	-
8.	+	+	+	+	+	-
9.	-	+	+	-	+	-
10.	-	+	+	-	+	-
11.	+	+	+	+	+	-
12.	+	+	+	-	+	-
13.	+	+	+	-	+	-
14.	+	+	+	-	+	-
15.	+	+	+	-	+	-
16.	-	+	+	+	+	+
17.	+	+	+	+	-	-
18.	+	+	+	+	+	-
19.	+	+	+	-	+	-
20.	+	+	+	+	+	-
21.	+	+	+	-	+	-
22.	+	+	+	+	+	-
23.	+	+	+	+	+	-
24.	+	+	+	+	-	-
25.	-	+	+	+	-	-
26.	-	+	+	+	+	-
27.	+	+	+	+	+	-
28.	+	+	+	+	+	-
29.	+	+	+	-	+	-
30.	+	+	+	-	+	-
<i>Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом</i>						
1.	+	+	+	+	-	+
2.	+	+	+	+	-	+
3.	+	+	+	+	-	+
4.	+	+	+	-	+	+
5.	+	+	+	+	+	+
6.	+	+	+	+	-	+
7.	+	+	+	+	+	+
8.	+	+	+	+	+	+
9.	+	+	+	+	-	-
10.	+	+	+	+	+	-
11.	+	+	+	+	+	-
12.	+	+	+	+	+	-
13.	+	+	+	+	+	-
14.	+	+	+	+	-	+
15.	+	+	+	+	-	-
16.	+	+	+	+	+	+
17.	+	+	-	+	+	-
18.	+	+	-	+	+	+
19.	+	+	+	+	+	-

Наставак Табеле 2

Донори	АСЕ-инхибитори	Бета блокатори	Двојна антиагрегациона	Диуретици	Статини	Антикоагуланси
20.	+	+	+	+	+	-
21.	+	+	+	+	+	+
22.	+	+	+	+	+	+
23.	+	+	+	+	+	+
24.	+	+	-	+	+	+
25.	+	+	+	+	-	+
26.	+	+	+	-	+	+
27.	+	+	+	+	+	+
28.	+	+	+	+	-	+
29.	+	+	+	+	+	+
30.	+	+	+	-	+	+

3.2. Узорковање периферне крви

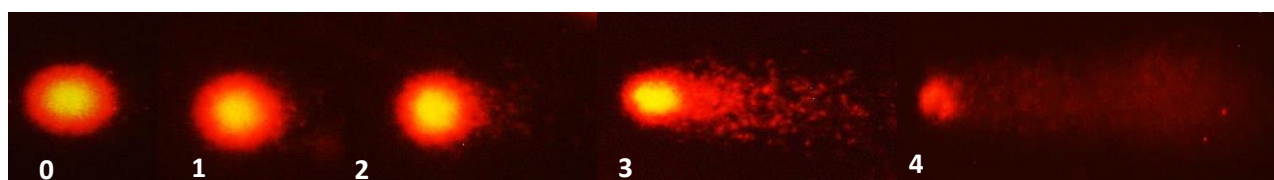
Узорци периферне крви пацијената са КВБ и здравих особа су узети пункцијом из кубиталне вене на надлактици (1 ml хепарина и до 5 ml крви). Код пацијената са акутним коронарним синдромом узета су два узорка крви, непосредно пре коронарне ангиографије и седам дана након коронарне ангиографије. За сваки узорак су одрађене и биохемијске анализе (холестерол, триглицериди, тропонин, proBNP, креатинин киназа (СК, *енгл.* Creatine kinase), њен МБ изоензим (СК-МБ, *енгл.* Creatine kinase MB), Ц-реактивни протеин (CRP, *енгл.* C-reactive protein), аланин аминотрансфераза (ALT, *енгл.* alanine transaminase), аспартат аминотрансфераза (AST, *енгл.* aspartate transaminase), уреа, креатинин, глукоза). Узорци крви су транспортовани у контејнерима на 4°C у року од 30 min од узимања.

3.3. Базни комет тест

Тест електрофорезе појединачних ћелија - комет тест је одрађен према протоколу који су описали Sing и сар. (1988), са модификацијама које су дали Collins и сар. (2023).

Неколико дана пре почетка експеримента, брушене микроскопске плочице су умакане у 1% агарозу нормалне тачке топљења (*енгл.* Normal Melting-point Agarose) и остављене да се суше. За комет тест су коришћена два слоја агарозе и коришћено је 4 ml хепаринизоване крви. Крв је помешана са RPMI 1640 медијумом који садржи EDTA и наслојавана на Histopaque-1077, а затим је центрифугирана 15 min на 1900 rpm како би се изоловали лимфоцити. Лимфоцити који су формирали бели прстен испод крвне плазме су покупљени и два пута ресуспендовани са RPMI-ом. Након центрифугирања од 10 min на 1800 rpm, супернатант је уклоњен, а лимфоцити су ресуспендовани поново са RPMI-ом и додавани ћелијским културама (по 50 µl). Поред лимфоцита и PBS-а, ћелијској култури пацијената и здравих особа су додаване и различите концентрације ацетонског, воденог и етанолног екстракта, а затим су инкубиране 30 min. Након истека инкубационог периода, ћелије су центрифугиране на 2000 rpm, 5 min. Вијабилност ћелија је одређена коришћењем теста са трипан плавим и била је >85%, а у 10 µl хомогенизоване ћелијске суспензије добијено је 1×10^5 ћелија/ml. Помешано је 100 µl ћелијског талога (око 10 000 ћелија) са 100 µl 1% агарозе ниске тачке топљења (*енгл.* Low Melting-point Agarose) и стављено на предметно стакло (90 µl по гелу).

Плочице су стављене на лед пар секунди, како би се стегао агарозни гел, а онда су преливане хладним лизирајућим раствором (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) у коме су стајале 2 сата. Након тога, плочице су поређане у кадицу за хоризонталну електрофорезу и преливане хладним, свеже припремљеним алкалним електрофоретским пуфером (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH ≥ 13) где су стајале 30 min, а затим је пуштена електрофореза у трајању од 30 min на 25 V и 300 mA. Након завршене електрофорезе, плочице су испирани 3 пута по 5 min са Tris-HCl-ом (0,4 M Tris, pH 7,5) и испирани дестилованом водом, како би се снизио pH и тиме избегло ометање приликом бојења препарата са етидијум бромидом (2 $\mu\text{g/ml}$). Цео експеримент је одрађен у затамљеној просторији, како би се спречило додатно оштећење молекула ДНК под утицајем UV зрачења. Ћелије су анализирани под флуоресцентним микроскопом са камером (Nikon E50i), на увећању 400x. За сваког донора и за сваку појединачну концентрацију је визуелно анализирано 100 насумично одабраних ћелија, односно 50 ћелија по гелу (два понављања). Свака ћелија је према интензитету флуоресценције у репу комете класификована у пет класа од 0 до 4 (слика 18).



Слика 18. Класе комета: класа 0 – нема оштећења, класа 1 – низак ниво оштећења, класа 2 – средњи ниво оштећења, класа 3 – висок ниво оштећења и класа 4 – потпуно оштећење

Ниво ДНК оштећења за сваки узорак је израчунат као проценат ДНК (%ДНК) оштећења преко формуле:

$$\% \text{ДНК оштећења} = \text{класа1} + \text{класа2} + \text{класа3} + \text{класа4}$$

и преко индекса генетичког оштећења (GDI - Genetic Damage Index), по следећој формули (Pitarque и сар., 1999):

$$\text{GDI} = \frac{\text{класа1} + 2 \times \text{класа2} + 3 \times \text{класа3} + 4 \times \text{класа4}}{\text{класа0} + \text{класа1} + \text{класа2} + \text{класа3} + \text{класа4}}$$

3.4. Цитокинезис - блок микронуклеус тест

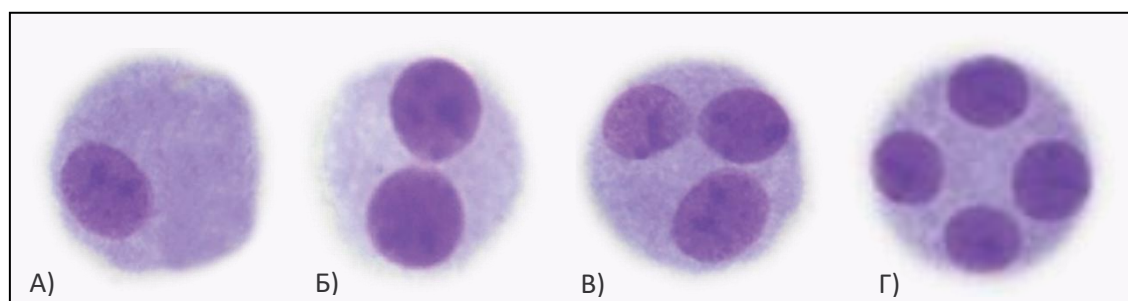
Пуна периферна крв сваког донора (0,5 ml) је засејана у 5 ml комплетне подлоге за култивацију лимфоцита, PB-Max XenoType. Културе су инкубирани 72 сата на температури од 37°C. Ћелијским културама је 44-ог сата од почетка инкубације додат раствор цитохалазина Б у концентрацији од 4 $\mu\text{g/ml}$. Након истека 72. сата инкубације, вршена је препарација ћелијских култура, према стандардној процедури. Ћелијске културе су центрифугиране 12 min на 1800 rpm, а затим два пута третиране хладним (4°C) хипотоничним раствором 0,56% KCl. Фиксација материјала је вршена фиксативом (три пута) који се састоји од метанола и глацијалне сирћетне киселине у

односу 3:1. Добијена ћелијска суспензија је разливена у капима на чиста, сува и хладна предметна стакла. Препарати су сушени под светлосном лампом, а затим на ваздуху. Након сушења, препарати су бојени 12 min у 2% раствору гимзе. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Nikon E50i), на увећању 400x. Анализирано је 1000 БН ћелија по донору (Fenech, 2020).

У циљу утврђивања NDI-а, анализирано је 500 ћелија са једним, два, три и четири једра (Слика 19), а резултати су добијени израчунавањем по формули:

$$NDI = \frac{(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4)}{N}$$

при чему M1-M4 представљају број ћелија са 1-4 једра, а N је укупан број анализираних ћелија (Fenech, 2007).



Слика 19. Приказ ћелије са: А) једним Б) два В) три и Г) четири једра

3.5. Узорковање и идентификација гљиве за екстракцију

Испитивана врста узоркована је на територији Предела изузетних одлика „Власина“, на локалитету Власина Рид, Средња река, UTM поље FN03 (N 42.746585, E 22.304437), на надморској висини од 1410 m, у септембру 2018. године. Идентификација испитиване врсте извршена је помоћу стандардног кључа (Uzelac, 2009). Ексикат се чува на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу (DBFS 1).

3.6. Поступак прављења екстракта гљиве

Претходно осушени у мраку, на собној температури и фино уситњени талуси (помоћу млина) гљиве *L. betulinus* су екстраховани са растварачима различите поларности: ацетоном, водом и етанолом (100 g гљиве са 500 ml растварача) у Soxhlet апарату (Soxtherm S 306, Гехардт, Немачка) око 4 сата на температури од 56,5°C. Екстракти су профилирани кроз Whatman No. 1 филтер папир и концентровани на ротационом вакуум упаривачу, под сниженим притиском, на температури од 40°C.

Добијени екстракти чувани су на –20°C, чиме је спречена могућност деградације биоактивних молекула. За даља тестирања, екстракти различитих

концентрација добијени су растварањем одређене количине суве материје у одређеној запремини растварача фосфатног пуфера (PBS, *енгл.* Phosphate-buffered saline).

3.7. Тестиране концентрације екстракта гљиве

За испитивање потенцијалног генопротективног дејства различитих екстраката (ацетон, вода и етанол) гљиве *L. betulinus* на лимфоците периферне крви пацијената са КВБ, коришћене су четири различите концентрације (50, 100, 150 и 200 µg/ml) применом комет теста. Такође су и код здравих особа испитивана ова три екстракта у четири тестиране концентрације. Истовремено је постављана негативна (нетретиране ћелије) и позитивна контрола (ћелије третиране само мутагеном - H₂O₂, 10 µg/ml).

3.8. Фитохемијска анализа гљиве *Lenzites betulinus*

3.8.1. Одређивање садржаја минерала

За испитивање садржаја минерала (макро- и микроелемената) коришћен је микроталасни систем (Ethos, Италија) са HPR-1000/10S сегментисаним ротором високог притиска (Petrović и сар., 2023а). Коришћене су PTFE посуде (запремине од 100 ml) које су опремљене са QS-50 кварцним додацима. Око 25 mg узорка гљиве (са прецизношћу ± 1 mg) је стављено у два кварцна додатка и помешано са 2 × 5 ml HNO₃ (65 теж.%, Suprapur®) и 2 × 0,5 ml H₂O₂ (30 теж.%, Suprapur®, Merck KGaA, Немачка). Температура је постепено подизана на 180°C у првих 15 min, па је у наредних 20 min температура била константно на 180°C, а затим се нагло смањила до собне температуре. После хлађења и без филтрације, раствори су разблажени са ултра чистом водом до константне запремине од 25 ml у фласку (4 g узорка у 25 ml). Ултра чиста вода са проводљивошћу од 0,05 µS/cm је припремљена коришћењем апарата Barnstead™ GenPure™ Pro. Садржај макроелемената [калцијум (Ca), гвожђе (Fe), калијум (K), магнезијум (Mg), натријум (Na), фосфор (P), сумпор (S)] и елемената у траговима [алуминијум (Al), бакар (Cu), манган (Mn), цинк (Zn), селен (Se), кадмијум (Cd), хром (Cr), литијум (Li), никал (Ni), арсен (As), баријум (Ba), олово (Pb), силицијум (Si), стронцијум (Sr)] у узорцима гљиве је испитан помоћу индуктивно спрегнуте плазме оптичком емисионом спектрометријом (ICP-OES, *енгл.* inductively coupled plasma optical emission spectrometry), (iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific, Уједињено Краљевство). Раствори за калибрацију су направљени од четири сертифицикована стандардна раствора плазме: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, SpecpureR, 1000 µg/mL и Mercury, plasma standard solution, SpecpureR, Hg 1000 µg/ml (оба су од Alfa Aesar GmbH & Co KG, Немачка); SS-Low Level Elements ICV Stock и ILM 05.2 ICS Stock 1 (оба су VHG Labs, Inc-Part of LGC Standards, Манчестер, САД). Концентрације присутних минерала у гљиви су изражене као mg/kg.

3.8.2. Одређивање садржаја шећера и шећерних алкохола

Узорак гљиве (0,2 g) је растворен у 10 ml ултра чисте воде, а смеша је хомогенизована на магнетној мешалици на 900 rpm, 2 сата. Супернатант је одвојен центрифугирањем на 14000 rpm током 20 min и профилиран кроз нитроцелулозни филтер (величина пора < 0,22 µm).

За испитивање садржаја шећера и шећерних алкохола у гљиви, коришћени су стандарди (сорбитол, трехалоза, арабиноза, глукоза, фруктоза, сахароза, тураноза, глицерол, галактитол, галактоза, рибоза, изомалтоза, изомалтотриоза, малтоза, малтотриоза, манитол, ксилоза, мелибиоза, паноза, рамноза, рафиноза и стахиоза), као и реагенси и растварачи високе чистоће. Стандарди глукозе, фруктозе и сахарозе су набављени од Tokyo Chemical Industry, TCI (Белгија, Европа), док су остали стандарди набављени од Sigma-Aldrich (Steinheim, Немачка). Натријум хидроксид и натријум ацетат трихидрат су добијени од Merck (Darmstadt, Немачка). Сви водени раствори су припремљени коришћењем ултра чисте воде (ThermoFisher TKA MicroPure систем за пречишћавање, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Стандардни раствор глукозе је припремљен у ултра чистој води у концентрацији од 100 ng/ml. Стандарди за калибрацију су направљени разблажењем ових основних раствора ултра чистом водом. Коришћена је мешавина за контролу квалитета ради праћења рада инструмената и то разблажењем стандарда до концентрација од 20 ng/ml.

Хроматографска анализа је изведена помоћу система за течну хроматографију DIONEX ICS 3000 DP са кватернарном градијентном пумпом на Carbo Pac®PA100 перикларној анион-измењивачкој колони (4 × 250 mm) на 30°C (Dionex, Sunnyvale, САД). Мобилна фаза се састојала од следећих линеарних градијената (брзина протока 0,7 ml/min): 0–5 min, 85% (C), 15% (A); 5–5,1 min, 83% (C), 15% (A), 2% (B); 5,1–12 min, 83% (C), 15% (A), 2% (B); 12–12,1 min, 81% (C), 15% (A), 4% (B); 12,1–20 min 81% (C), 15% (A), 4% (B); 20–20,1 min 60% (C), 20% (A), 20% (B); 20,1–30,0 min 60% (C), 20% (A) 20% (B); са накнадним радом од 85% C и 15% A током 15 min да би се уравнотежио систем, где А представља 600 mM натријум хидроксида, В је био 500 mM натријум ацетат, а C ултра чиста вода. Сваки узорак (25 μl) је убачен са ICS AS-DV 50 аутосамплером (Dionex, Sunnyvale, САД). Електрохемијски детектор се састојао од злата као радне електроде и Ag/AgCl као референтне електроде. Границе детекције (LOD, *енгл.* Limit of Detection) и границе квантификације (LOQ, *енгл.* Limit of Quantification) су израчунате из регресионе линије за тачке близу очекиване границе, користећи следеће једначине:

$$\text{LOD} = (3.3 \times \text{SD}) / a$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{SD}) / a$$

где је СД (стандардна девијација) одговора (вредност стандардне грешке за коефицијент „а“) и а је вредност нагиба добијена из линеарне регресије (Fotirić Akšić и сар., 2015). Опоравак шећера и шећерних алкохола су дати преко следеће реакције

$$F/(F_0 + A) \times 100\%$$

где је F концентрација шећера или шећерних алкохола у узорку са додацима, F_0 је концентрација шећера или шећерних алкохола у узорку без додатака, а А је концентрација са додатком (Gorjanović и сар., 2020). Концентрација угљених хидрата добијена са калибрационе криве је помножена са разблажењем и одузета од тежине узорка.

3.8.3. Одређивање садржаја масних киселина

Суви узорак гљиве (2 g) је екстрахован са 100 ml петролеј етра хексана у Soxhlet апарату (Soxtherm S 306, Гехардт, Немачка), под сниженим притиском и константном температуром од 150°C током 3 сата. Суви остатак је пребачен у стаклену епрувету и масне киселине су растворене у n-хексану (2,40 ml). Супернатант је мешан са 2 ml 3 M раствора КОН у етанолу током 60 s у ултразвучном купатилу на 70°C, а затим је додато 2 ml 2 M раствора HCl у етанолу (1,20 ml) и смеша је поново третирана ултразвучним сигнаlima. После формирања слојева додато је 3 ml хексана, а слој хексана је пребачен у бочицу и чуван на -20°C. 1 ml раствора је пребачен у волуметријски балон од 10 ml и разблажен хексаном до ознаке. Овај раствор (1 ml), који је садржао метил естре масних киселина, помешан је са 50 ml претходно направљеног раствора метил нонадеканоата (C19:0) (интерни стандард) у хексану (3,20 g/l) и користи се за даљу анализу.

Анализа масних киселина је обављена на Focus GC у комбинацији са PolarisQ масеним спектрометром (Thermo Fisher, САД). Брзина протока је била 1 ml/min, а хелијум је коришћен као гас носач. Температурни програм пећнице почиње од 50°C/min као почетне температуре и повећава се на 200°C са корацима од 25°C/min, а затим 3°C/min до 230°C (држано 18 min). Ињектор је био у подељеном режиму (50:1), док су температуре ињектора, преносне линије и јонског извора биле 250°C и 260°C. (Lazić и сар., 2024).

3.8.4. Одређивање садржаја органских киселина

Узорак гљиве је припремљен на исти начин као и за утврђивање садржаја шећера. За одређивање органских киселина у гљиви коришћени су стандардни раствори лимунске, малеинске, јабучне, пирогрођане, шикимичне, млечне, пропионске, бутирне, хининске, оксалне и фумарне киселине. Калибрациони стандарди су припремљени из стандардних раствора разблажењем ултра чистом водом. Мешавина за контролу квалитета коришћена за праћење рада инструмента је припремљена разблажењем стандарда до концентрација од 10 ng/mL.

Анализа је одрађена на хроматографском сету Dionex ICS-3000 који се састоји од једне пумпе, детектора проводљивости (ASRS ULTRA II (4 mm), са режимом рециклирања), генератора елуента (калијум хидроксид) са Chromeleon® хроматографском радном станицом и Chromeleon 6.7 софтвером за управљање хроматографијом. Сва одвајања су обављена на 30°C коришћењем заштитне [Dionex™ IonPac™ AG15 (4 x 50 mm, P/N 053942)] и аналитичке [Dionex™ IonPac™ AS15 IC (4 x 250 mm, P/N 053940)] колоне. Мобилна фаза је била 38 mM КОН са континуираном брзином протока од 1 ml/min. Поред тога, примењени су следећи услови: температура колоне је била 30°C, температура ћелије за проводљивост је била 35°C, а струја супресора је била 95 mA. Противпритисак је био ≈18 Мра (Petrović и сар., 2022).

3.8.5. Одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида

Укупан садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима гљиве *L. betulinus* одређен је спектрофотометријском методом помоћу Folin-Ciocalteu реагенса (Wootton-Beard и сар., 2011) на $\lambda_{\text{max}} = 725 \text{ nm}$. За анализу су коришћени суви екстракти у концентрацији 1 mg/ml, а као стандард је коришћена гална

киселина. Узорак је добијен мешањем 0,5 ml раствореног екстракта са 2,5 ml Folin-Ciocalteu реагенса раствореног у дестилованој води и 2,5 ml 7% раствора NaHCO_3 . Концентрација укупних фенолних једињења је изражена као милиграми еквивалената галне киселине по граму екстракта (mg GAE/g сувог екстракта) применом једначине линеарне корелације ($y = 0,006x + 0,0069$; $r = 0,994$).

Укупан садржај флавоноида одређен је уз помоћ спектрофотометријске методе са алуминијум хлоридом (AlCl_3) (Quettier-Deleu и сар., 2000) на $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$. За анализу су коришћени суви екстракти у концентрацији 1 mg/ml, а рутин је коришћен као стандард. Узорак је добијен мешањем 0,5 ml екстракта са 1 ml 2% раствора AlCl_3 . Концентрација укупних флавоноида је изражена као милиграми еквивалената рутина по граму екстракта (mg RUE/g сувог екстракта) применом једначине линеарне корелације ($y = 0,014x + 0,027$; $r = 0,995$).

Одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида је рађено у трипликату.

3.8.6. Квантификација полифенолног састава

Радни раствори фенолних стандарда (0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 и 1,00 mg/ml) добијени су разблажењем основног раствора (1000 mg/L) у метанолу са 0,1% сирћетном киселином - мобилна фаза (елуент А) и у ултрачистој води и ацетонитрилу (елуент Б) и чувано је у мраку на 4°C.

Анализа полифенолног састава екстракта гљиве је одрађена по протоколу који су дали Ђорђановић и сар. (2020). За раздвајање, идентификацију и квантификовање полифенолних компоненти у узорку гљиве је коришћен Dionex Ultimate 3000 UHPLC (енгл. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography) систем опремљен са diode array detector који је повезан са TSQ Quantum Access Maxtriple-quadrupole масеним спекрометром (Thermo Fisher Scientific, Базел, Швајцарска) са извором јона у облику јонизације електроспрејом (200°C) у негативном режиму (од 100 to 1000 m/z) и троструким квадруполним (UHPLC-DADMS/MS). За одређивање и квантификацију полифенола коришћен је напон прскања 5 kV, а температура капилара је била 300°C.

Стационарна фаза је била Synchronis C18 колона (димензија 100 x 2,1 mm), са величином честица 1,7 μm , а мобилна фаза се састојала од (А) 0,01% сирћетне киселине и (Б) ацетонитрила (MS grade), који су коришћени у следећем градијенту елуирања: 5% В (0,0-1,0 min), 5-95% В (1,0-16,0 min), 95-5% В (16,0-16,1 min) и 5% В (током 4 min). Брзина протока је била 0,300 mL/min, а таласне дужине DAD детектора су биле 254 и 280 nm, а сва испитивања су обављена на 40°C. Квантификација полифенола је заснована на анализи молекуларног јона и два најинтензивнија фрагмента MS2 спектра за сваки стандард. Анализе су рађене у три понављања. За контролу инструмента коришћен је софтвер Xcalibur (верзија 2.2). Фенолне киселине и флавоноиди су идентификовани директним поређењем са комерцијалним стандардима. Укупна количина сваког циљаног једињења у екстракту гљиве израчуната је на основу калибрационих крива чистих једињења (калибрациони нивои у опсегу од 1 ng/ml до 50 $\mu\text{g/ml}$) и изражена као mg/kg.

3.9. Статистичка обрада резултата

Добијени резултати истраживања су статистички обрађени применом софтверског пакета SPSS за Windows, верзија 20. Резултати су приказани као средња вредност ($\bar{X}$) $\pm$ СД. Резултати се сматрају статистички значајним уколико је * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0005$. Подаци о %ДНК оштећења, GDI, MN и NDI код пацијената и здравих контрола подвргнути су Шапиро-Вилковом тесту нормалности, који је показао нормалну дистрибуцију. Због тога су разлике између контролних узорака и пацијената са ДНК оштећењем и хромозомских аберација одређене t -тестом за независне узорке. Испитиване варијабле су упоређене биваријантним корелационим тестом и Пирсоновим коефицијентом корелације. Урађена је вишеструка регресиона анализа за процену односа између различитих варијабли. За поређење различитих третмана (ацетонског, воденог и етанолног) екстраката са одговарајућим контролама коришћена је једнофакторска анализа варијансе (енгл. ANOVA, analysis of variance) и Tukey *post-hoc* тест. За обраду резултата хемијских анализа коришћен је софтверски програм Microsoft Excel 2010.

4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Резултати истраживања приказани су у Табелама 3-29 и Графиконима 1-34. У првом делу, приказани су резултати промена у геному пацијената и контрола који су процењивани на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома. У другом делу приказани су резултати ефеката различитих врста екстракта гљиве (ацетонски, водени и етанолни) на терапијом/зрачењем-индуковано геномско оштећење код пацијената са КВБ, као и резултати анализе хемијског састава гљиве *L. betulinus*.

4.1. Геномска нестабилност у лимфоцитима периферне крви анализираних узорак

Резултати ове студије су показали да су пацијенти са КВБ имали веће терапијом-индуковане промене у геному процењиване на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома у односу на здраве особе (Табела 3). Код пацијената, старости од 48 до 68 година, %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 34 до 79% (код жена 40-79% и код мушкараца 34-67%), GDI од 0,91 до 1,80 (код жена 1,05-1,80 и код мушкараца 0,91-1,78), фреквенца МН од 17 до 29 (код жена 17-29 и код мушкараца 17-28), а NDI од 1,22 до 1,78 (код жена 1,21-1,56 и код мушкараца 1,43-1,78). Код здравих особа, старости од 49 до 66 година, %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 9 до 31%, GDI од 0,29 до 0,47, МН од 5 до 12, а NDI од 1,50 до 1,87.

Од укупно 60 испитиваних пацијената, 38 је живело у градским подручјима, а 22 у сеоским подручјима, при чему је %ДНК оштећења код особа у градским подручјима варирао од 34 до 79%, GDI је варирао од 0,91 до 1,78, фреквенца МН од 17 до 28 и NDI од 1,21 до 1,78, а у сеоским подручјима %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 40 до 70%, GDI од 1,05 до 1,80, фреквенца МН од 17 до 29 и NDI од 1,30 до 1,54. Код здравих особа које су живе у градским подручјима %ДНК оштећења се кретао од 9 до 31%, GDI од 0,29 до 0,47, фреквенца МН од 5 до 12 и NDI од 1,51 до 1,87, док код оних у сеоским подручјима, %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 11 до 25%, GDI од 0,29 до 0,42, фреквенца МН од 6 до 12 и NDI од 1,50 до 1,82.

Код пацијената пушача ($n = 29$), %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 34 до 79%, GDI од 0,91 до 1,80, фреквенца МН од 17 до 29 и NDI од 1,26 до 1,54, док је код бивших пушача ($n = 10$) опсег варирања за %ДНК оштећења био од 44 до 60%, за GDI од 1,18 до 1,48, за фреквенцу МН од 19 до 28 и за NDI од 1,30 до 1,78. Код пацијената непушача ($n = 21$), %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 40 до 65%, GDI од 1,05 до 1,68, фреквенца МН од 17 до 28 и NDI од 1,21 до 1,56. Здраве особе су биле претежно непушачи ($n = 21$) и код њих је %ДНК оштећења био у рангу од 9 до 26%, GDI од 0,29 до 0,47, фреквенца МН од 5 до 12 и NDI од 1,50 до 1,87, док је код пушача ($n = 9$) %ДНК оштећења био у рангу од 20 до 31, GDI од 0,31 до 0,45, фреквенца МН од 7 до 12 и NDI од 1,54 до 1,79.

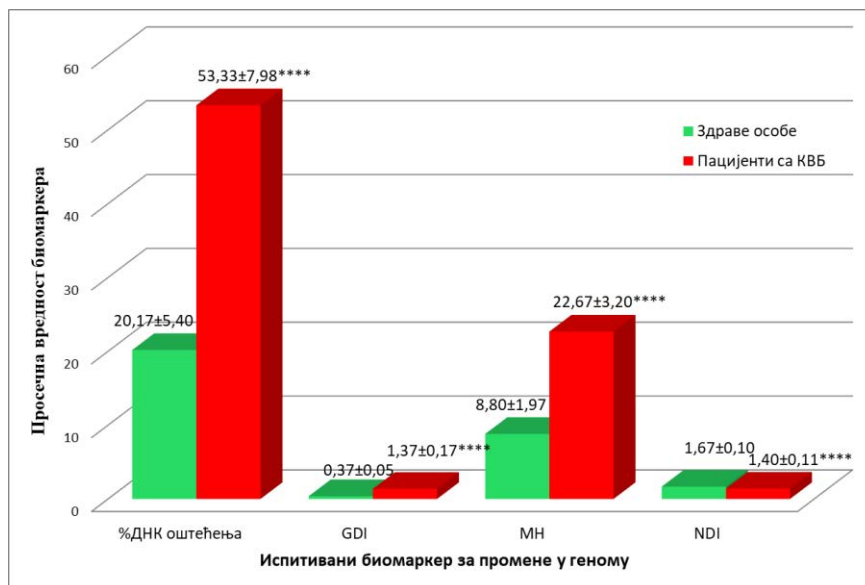
Табела 3. Промене у геному пацијената са кардиоваскуларним болестима и здравих особа процењиваних на нивоу молекула ДНК и хромозома

Донор	Старост (год.)	Пол	Пушач/ непушач/ бивши пушач	Село/ град	Породична анамнеза	%ДНК оштећења	GDI	МН/ 1000 БН ћел.	NDI
Здраве особе									
1.	55	Ж	-	град	-	22	0,47	11	1,51
2.	51	Ж	-	град	+	9	0,32	9	1,85
3.	50	М	-	село	-	13	0,32	9	1,65
4.	54	Ж	-	град	+	11	0,38	10	1,63
5.	55	Ж	-	село	-	24	0,35	11	1,67
6.	66	М	+	град	-	31	0,44	11	1,54
7.	49	Ж	+	град	+	22	0,36	9	1,60
8.	61	М	-	град	+	23	0,38	8	1,71
9.	61	М	-	град	-	13	0,39	10	1,66
10.	52	Ж	+	град	-	20	0,33	7	1,62
11.	66	М	-	град	+	22	0,36	10	1,68
12.	65	М	-	град	-	19	0,34	9	1,71
13.	63	Ж	-	град	-	17	0,30	8	1,65
14.	56	Ж	-	град	-	20	0,37	7	1,70
15.	65	М	-	село	+	25	0,41	12	1,50
16.	52	Ж	-	село	-	14	0,30	7	1,78
17.	61	Ж	+	град	+	27	0,45	11	1,57
18.	50	М	-	село	-	20	0,29	6	1,80
19.	63	М	+	град	+	28	0,42	10	1,60
20.	63	Ж	+	град	-	20	0,31	8	1,66
21.	52	М	-	град	-	16	0,38	8	1,73
22.	61	Ж	-	село	-	24	0,42	11	1,50
23.	53	Ж	-	село	-	22	0,36	7	1,70
24.	63	Ж	-	град	-	26	0,43	11	1,63
25.	64	Ж	+	град	-	24	0,45	12	1,57
26.	54	М	+	град	-	20	0,33	7	1,69
27.	50	М	+	град	+	25	0,38	8	1,79
28.	50	М	-	град	+	20	0,29	5	1,87
29.	50	М	-	град	-	17	0,32	6	1,80
30.	50	М	-	село	-	11	0,31	6	1,82
Опсег варирања	49-66	Ж/М	+/-	село /град	-/+	9-31	0,29-0,47	5-12	1,50- 1,87
Пацијенти са кардиоваскуларним болестима									
1.	57	Ж	-	град	+	48	1,27	20	1,49
2.	58	Ж	+	град	-	58	1,32	23	1,48
3.	59	М	Б.п	село	+	45	1,19	26	1,54
4.	63	М	Б.п	село	-	42	1,26	19	1,46
5.	52	М	-	град	-	47	1,13	22	1,30
6.	50	М	Б.п.	село	-	43	1,15	24	1,53
7.	63	М	-	град	-	53	1,11	17	1,52
8.	62	Ж	-	град	-	46	1,10	20	1,56
9.	61	Ж	-	село	-	54	1,17	26	1,32
10.	62	Ж	-	село	+	34	0,91	22	1,46
11.	58	Ж	+	град	+	57	1,14	20	1,38
12.	58	Ж	+	село	+	47	1,21	17	1,42
13.	65	Ж	-	град	-	60	1,24	18	1,41
14.	59	Ж	-	село	+	46	1,15	26	1,50

Наставак Табеле 3

Донор	Старост (год.)	Пол	Пушач/ непушач/ бивши пушач	Село/ град	Породична анамнеза	%ДНК оштећења	GDI	МН/ 1000 БН ћел.	NDI
15.	52	М	-	град	+	47	1,05	18	1,47
16.	59	М	-	град	-	54	1,28	21	1,40
17.	64	М	+	град	+	51	1,46	18	1,52
18.	48	М	-	град	+	40	1,16	18	1,49
19.	51	М	Б.п.	село	+	53	1,39	19	1,48
20.	59	Ж	Б.п.	село	-	61	1,44	22	1,30
21.	56	Ж	-	град	-	52	1,40	27	1,24
22.	53	М	+	град	-	50	1,38	25	1,33
23.	61	Ж	+	град	+	60	1,50	18	1,36
24.	53	Ж	+	село	+	58	1,47	25	1,33
25.	56	Ж	-	село	+	50	1,36	17	1,47
26.	55	М	+	град	+	57	1,42	26	1,30
27.	63	М	+	град	+	58	1,48	26	1,27
28.	52	М	+	град	+	54	1,34	24	1,34
29.	60	М	+	град	+	60	1,47	25	1,30
30.	64	Ж	-	град	+	56	1,54	28	1,23
31.	65	М	Б.п.	село	+	50	1,48	28	1,41
32.	52	М	Б.п.	град	-	47	1,18	19	1,78
33.	53	М	+	град	+	67	1,78	22	1,48
34.	60	М	+	село	+	55	1,41	20	1,52
35.	49	М	-	село	+	43	1,32	22	1,52
36.	61	М	Б.п.	град	-	57	1,45	24	1,55
37.	53	Ж	+	село	+	50	1,47	24	1,38
38.	53	М	+	село	-	57	1,43	22	1,38
39.	56	М	Б.п.	град	-	49	1,33	22	1,40
40.	62	М	+	град	+	61	1,53	26	1,34
41.	50	М	+	град	+	50	1,32	21	1,41
42.	51	М	+	град	-	56	1,49	24	1,48
43.	50	М	Б.п.	град	-	44	1,40	22	1,37
44.	53	Ж	+	село	+	70	1,80	29	1,31
45.	57	М	+	село	-	61	1,52	22	1,30
46.	54	М	+	село	+	46	1,38	20	1,46
47.	50	М	+	град	+	45	1,36	21	1,37
48.	68	Ж	+	град	+	64	1,51	26	1,29
49.	65	Ж	-	град	-	59	1,47	24	1,37
50.	66	Ж	-	град	+	59	1,57	25	1,32
51.	53	Ж	+	село	-	54	1,35	23	1,53
52.	67	Ж	-	град	+	65	1,65	26	1,32
53.	60	Ж	+	град	-	49	1,29	20	1,54
54.	58	Ж	-	село	+	54	1,43	24	1,30
55.	55	Ж	+	град	+	50	1,47	22	1,49
56.	60	Ж	-	град	+	60	1,68	27	1,21
57.	61	Ж	+	село	+	40	1,23	20	1,41
58.	60	Ж	-	град	+	57	1,47	28	1,22
59.	63	Ж	+	град	+	61	1,34	23	1,34
60.	62	Ж	+	град	+	79	1,54	26	1,26
Опсег варирања	48-68	Ж/М	+/-/б.п.	село/ град	+/-	34-79	0,91-1,80	17-29	1,22-1,78

Пацијенти са КВБ имају значајно веће оштећење генома ($p < 0,0005$) у односу на контроле (%ДНК оштећења: $53,33 \pm 7,98$ наспрам $20,17 \pm 5,40$; $t = 23,262$, $df = 80,085$, $p < 0,0005$; GDI: $1,37 \pm 0,17$ наспрам $0,37 \pm 0,05$; $t = 41,284$, $df = 77,429$, $p < 0,0005$; МН/1000 БН ћелија: $22,67 \pm 3,20$ наспрам $8,80 \pm 1,97$, $t = 25,255$, $df = 84,074$, $p < 0,0005$), а значајно нижи NDI ($1,40 \pm 0,11$ наспрам $1,67 \pm 0,10$; $t = 11,550$, $df = 61,247$, $p < 0,0005$), Графикон 1.



Графикон 1. Упоредна анализа промена у геному пацијената и здравих особа који су процењивани на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома (Студентов t -тест, $****p < 0,0005$)

Жене са КВБ су имале незначајно већи ($p > 0,05$) просечан %ДНК оштећења у односу на мушкарце са истом болешћу ($54,80 \pm 8,53$ наспрам $51,87 \pm 7,25$; $t = 1,436$, $df = 58$), незначајно већи GDI ($1,39 \pm 0,18$ наспрам $1,35 \pm 0,17$, $t = 0,924$, $df = 58$), као и фреквенцу МН ($23,20 \pm 3,44$ наспрам $22,10 \pm 2,90$, $t = 1,339$, $df = 58$), а значајно већи NDI ($1,37 \pm 0,10$ наспрам $1,43 \pm 0,11$, $t = 2,195$, $df = 58$, $p < 0,05$).

Пацијенти из сеоских подручја имали су незначајно мањи ($p > 0,05$) просечан %ДНК оштећења од пацијената из градских подручја ($52,05 \pm 7,19$ наспрам $54,08 \pm 8,41$, $t = 0,950$, $df = 58$), мањи GDI ($1,36 \pm 0,15$ наспрам $1,37 \pm 0,18$, $t = 0,166$, $df = 58$), исту фреквенцу МН ($22,59 \pm 3,29$ наспрам $22,68 \pm 3,20$, $t = 0,108$, $df = 58$) и већи NDI ($1,42 \pm 0,09$ наспрам $1,39 \pm 0,12$, $t = 1,080$, $df = 58$).

Између пацијената пушача и непушача није било значајне разлике ($p > 0,05$) у просечном %ДНК оштећења ($54,10 \pm 9,50$ наспрам $53,48 \pm 6,58$, $t = 0,260$, $df = 48$), GDI ($1,40 \pm 0,17$ наспрам $1,35 \pm 0,19$, $t = 0,960$, $df = 48$), фреквенци МН ($22,76 \pm 2,86$ наспрам $22,57 \pm 3,82$, $t = 0,190$, $df = 35,416$) и NDI ($1,39 \pm 0,09$ наспрам $1,39 \pm 0,11$, $t = 0,126$, $df = 35,769$). Није било значајне разлике ($p > 0,05$) ни у просечном %ДНК оштећења између пушача и бивших пушача ($54,10 \pm 9,50$ наспрам $50,80 \pm 5,65$, $t = 1,033$, $df = 37$), у просечном GDI ($1,40 \pm 0,17$ наспрам $1,33 \pm 0,12$, $t = 1,221$, $df = 37$) и фреквенци МН ($22,76 \pm 2,86$ наспрам $22,50 \pm 3,03$, $t = 0,242$, $df = 37$), док је била значајна разлика у просечном NDI ($1,39 \pm 0,09$ наспрам $1,48 \pm 0,13$, $t = 2,526$, $df = 37$, $p < 0,05$). Такође, није било значајне разлике ($p > 0,05$) ни између пацијената непушача и бивших пушача у %ДНК оштећења

($53,48 \pm 6,58$ наспрам $50,80 \pm 5,65$, $t = 1,105$, $df = 29$), GDI ($1,35 \pm 0,19$ наспрам $1,33 \pm 0,12$, $t = 0,403$, $df = 26,977$), МН ($22,57 \pm 3,82$ наспрам $22,50 \pm 3,06$, $t = 0,052$, $df = 29$), али је било значајне разлике у NDI ($1,39 \pm 0,11$ наспрам $1,48 \pm 0,13$, $t = 2,085$, $df = 29$, $p < 0,05$).

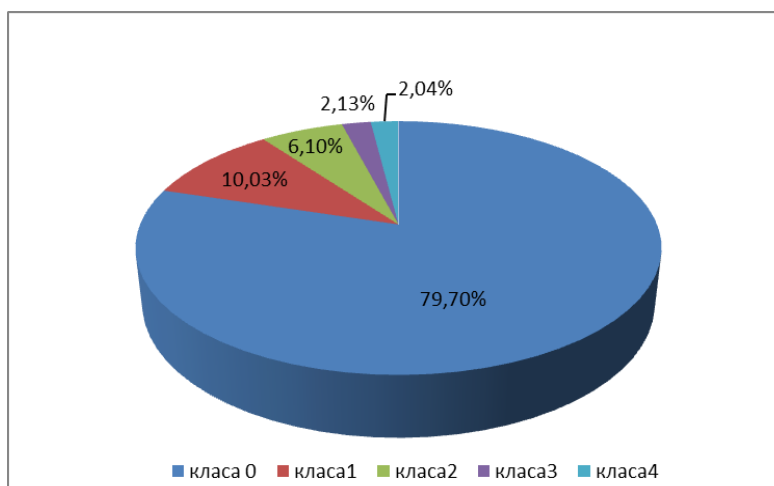
4.2. Базални ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа

У Табели 4 су приказани резултати појединачног %ДНК оштећења, GDI, дистрибуција класа комета као и њихов опсег варирања. Проценат ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа се кретао у опсегу од 9 до 31% (код мушкараца од 11 до 31% и код жена од 9 до 27%), а GDI је варирао од 0,29 до 0,47 (код мушкараца од 0,29 до 0,44 и код жена од 0,30 до 0,47).

Табела 4. Оксидационо оштећење молекула ДНК у лимфоцитима здравих особа

Донор	Старост (год.)	Пол	Анализирано ћелија	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
				0	1	2	3	4		
1.	55	Ж	100	78	7	8	4	3	22	0,47
2.	51	Ж	100	91	0	1	2	6	9	0,32
3.	50	М	100	87	4	3	2	4	13	0,32
4.	54	Ж	100	89	0	3	0	8	11	0,38
5.	55	Ж	100	76	14	9	1	0	24	0,35
6.	66	М	100	69	22	7	0	2	31	0,44
7.	49	Ж	100	78	12	6	4	0	22	0,36
8.	61	М	100	73	19	6	1	1	23	0,38
9.	61	М	100	87	2	1	5	5	13	0,39
10.	52	Ж	100	80	13	3	2	2	20	0,33
11.	66	М	100	78	14	3	4	1	22	0,36
12.	65	М	100	81	5	13	1	0	19	0,34
13.	63	Ж	100	83	6	10	0	1	17	0,30
14.	56	Ж	100	80	5	13	2	0	20	0,37
15.	65	М	100	75	16	2	7	0	25	0,41
16.	52	Ж	100	86	0	13	0	1	14	0,30
17.	61	Ж	100	73	13	11	2	1	27	0,45
18.	50	М	100	80	9	10	0	0	20	0,29
19.	63	М	100	72	19	6	1	2	28	0,42
20.	63	Ж	100	80	13	2	3	2	20	0,31
21.	52	М	100	84	7	2	1	6	16	0,38
22.	61	Ж	100	76	15	3	3	3	24	0,42
23.	53	Ж	100	78	14	4	2	2	22	0,36
24.	63	Ж	100	74	17	4	2	3	26	0,43
25.	64	Ж	100	76	9	10	4	1	24	0,45
26.	54	М	100	80	12	4	3	1	20	0,33
27.	50	М	100	75	15	8	1	1	25	0,38
28.	50	М	100	80	13	5	2	0	20	0,29
29.	50	М	100	83	6	7	4	0	17	0,32
30.	50	М	100	89	0	6	1	4	11	0,31
Опсег варирања	49-66	Ж/М	100	69-91	0-22	1-13	0-7	0-8	9-31	0,29-0,47

Просечан %ДНК оштећења код здравих особа је био $20,17 \pm 5,40$, а GDI $0,37 \pm 0,05$ (Графикон 1). У лимфоцитима периферне крви здравих особа, у највећем проценту су биле запажене ћелије без оштећења, класа комета 0 (79,70%), са опсегом варирања од 69 до 91%, а најмање су биле заступљене ћелије са скоро потпуним оштећењем, класа комета 4, (2,04%) са опсегом варирања од 0 до 8% (Графикон 2). Пирсонов коефицијент корелације је показао да су %ДНК оштећења и GDI у значајној позитивној корелацији ($r = 0,602$, $p = 0,000$).



Графикон 2. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима здравих особа

Запажена је статистички значајна разлика у нивоу ДНК оштећења између особа старости од 49 до 59 и особа старости од 60 до 66 година. Особе старости до 59 година су имале значајно мањи %ДНК оштећења у односу на старије особе ($18,00 \pm 4,86$ наспрам $23,00 \pm 4,85$, $t = 2,795$, $df = 28$, $p < 0,01$), као и GDI ($0,34 \pm 0,04$ наспрам $0,40 \pm 0,05$, $t = 2,714$, $df = 28$, $p < 0,05$).

Није било значајне разлике ($p > 0,05$) у просечном %ДНК оштећења, као и GDI између мушкараца и жена (%ДНК оштећења: $20,20 \pm 5,68$ у односу на $20,13 \pm 5,29$, $t = 0,033$, $df = 28$; GDI: $0,36 \pm 0,05$ у односу на $0,37 \pm 0,06$, $t = 0,829$, $df = 28$).

Од укупно анализираних 30 здравих особа, осам је било из сеоских подручја, а 22 особе из градских подручја. Особе из сеоских подручја имале су незначајно мањи %ДНК оштећења и GDI у односу на популацију из градских подручја ($19,13 \pm 5,62$ наспрам $20,55 \pm 5,40$, $t = 0,631$, $df = 28$, $p > 0,05$ за %ДНК оштећења и $0,35 \pm 0,05$ наспрам $0,37 \pm 0,05$, $t = 1,292$, $df = 28$, $p > 0,05$ за GDI).

Пушење је значајно утицало на повећање %ДНК оштећења. Пушачи су имали значајно већи %ДНК оштећења у односу на непушаче ($24,11 \pm 3,98$ наспрам $18,48 \pm 5,09$, $t = 2,949$, $df = 28$, $p < 0,01$), док се GDI није значајно разликовао ($0,39 \pm 0,06$ наспрам $0,36 \pm 0,05$, $t = 1,402$, $df = 28$, $p > 0,05$). Бивших пушача није било међу здравом популацијом.

Здраве особе са позитивном породичном анамнезом за КВБ нису имале значајно повећан просечан %ДНК оштећења и GDI у односу на особе са негативном породичном анамнезом (%ДНК оштећења: $21,20 \pm 6,39$ наспрам $19,65 \pm 4,92$, $t = 0,736$, $df = 28$, $p > 0,05$; GDI: $0,38 \pm 0,05$ наспрам $0,36 \pm 0,06$, $t = 0,706$, $df = 28$, $p > 0,05$).

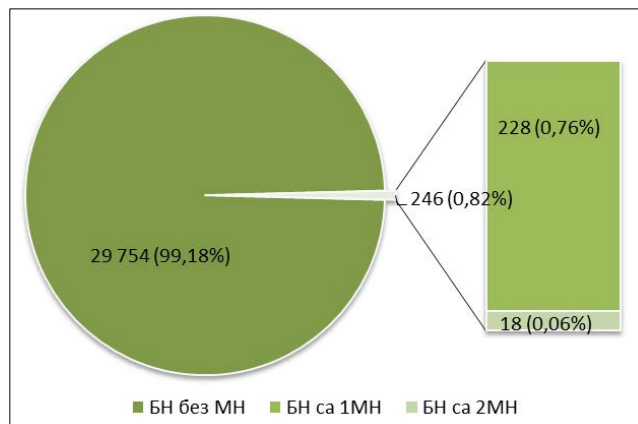
4.3. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви здравих особа

У Табели 5 су дате појединачне фреквенце МН, НП и НПМ, дистрибуција МН и NDI, са опсезима варирања, за 30 здравих донора. Укупно је анализирано 30 000 БН ћелија (1000 БН ћелија/донору). Фреквенца МН је варирала од 5 до 12 МН/1000 БН ћелија (код жена: 7-12 МН/1000 БН ћелија и код мушкараца: 5-12 МН/1000 БН ћелија), док се NDI кретао у опсегу од 1,50 до 1,87, без значајне разлике у опсегу варирања код мушкараца и жена (код жена: 1,50-1,85 и код мушкараца: 1,50-1,87). НП су уочени код 5 особа (0-2/1000 БН ћелија), док НПМ нису запажени. Најзаступљеније су биле БН ћелије са 1МН (опсег варирања: 4-12 ћелија), знатно ређе са 2МН (опсег варирања: 1-2 ћелије), док БН ћелије са 3 и више МН нису запажене. Пирсонов коефицијент корелације је показао да су фреквенце МН и NDI у значајној негативној корелацији ($r = -0,790$, $p = 0,000$).

Табела 5. Фреквенца микронуклеуса, дистрибуција микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе у лимфоцитима здравих особа

Донор	Старост (год.)	Пол	Анализирано БН ћел.	МН/ 1000 БН ћел.	Број БН ћел. са МН	Дистрибуција МН		НП	NDI
						1МН	2МН		
1.	55	Ж	1000	11	10	9	1	/	1,51
2.	51	Ж	1000	9	9	9	/	1	1,85
3.	50	М	1000	9	9	9	/	/	1,65
4.	54	Ж	1000	10	9	8	1	/	1,63
5.	55	Ж	1000	11	10	9	1	1	1,67
6.	66	М	1000	11	9	7	2	2	1,54
7.	49	Ж	1000	9	9	9	/	/	1,60
8.	61	М	1000	8	8	8	/	/	1,71
9.	61	М	1000	10	9	8	1	/	1,66
10.	52	Ж	1000	7	7	7	/	/	1,62
11.	66	М	1000	10	8	6	2	1	1,68
12.	65	М	1000	9	8	7	1	/	1,71
13.	63	Ж	1000	8	8	8	/	/	1,65
14.	56	Ж	1000	7	6	5	1	/	1,70
15.	65	М	1000	12	12	12	/	/	1,50
16.	52	Ж	1000	7	7	7	/	/	1,78
17.	61	Ж	1000	11	10	9	1	/	1,57
18.	50	М	1000	6	6	6	/	/	1,80
19.	63	М	1000	10	9	8	1	/	1,60
20.	63	Ж	1000	8	7	6	1	/	1,66
21.	52	М	1000	8	8	8	/	/	1,73
22.	61	Ж	1000	11	10	9	1	1	1,50
23.	53	Ж	1000	7	7	7	/	/	1,70
24.	63	Ж	1000	11	10	9	1	/	1,63
25.	64	Ж	1000	12	10	8	2	/	1,57
26.	54	М	1000	7	7	7	/	/	1,69
27.	50	М	1000	8	8	8	/	/	1,79
28.	50	М	1000	5	5	5	/	/	1,87
29.	50	М	1000	6	5	4	1	/	1,80
30.	50	М	1000	6	6	6	/	/	1,82
Опсег варирања	49-66	Ж/М	1000	5-12	5-12	4-12	1-2	0-2	1,50-1,87

Просечна фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви здравих особа је била $8,80 \pm 1,97/1000$ БН ћелија, а просечан NDI је био $1,67 \pm 0,10$ (Графикон 1). Дистрибуција МН/1000 БН ћелија здравих особа је показала да је од укупно 30 000 анализираних ћелија 246 (0,82%) ћелија имало МН, као и да су ћелије са 1МН биле најзаступљеније (0,76%), док су БН ћелије са 2МН биле доста ређе (0,06%). Ћелије са више од 2 МН нису запажене (Графикон 3).



Графикон 3. Дистрибуција бинуклеусних ћелија у лимфоцитима здравих особа

Запажена је значајна разлика у просечној фреквенци МН и NDI у лимфоцитима здравих особа старости од 49 до 59 и особа старости од 60 до 66 година. Особе старости до 59 година су имале значајно нижу фреквенцу МН и виши NDI у односу на особе од 60 до 66 година ($7,82 \pm 1,78$ МН/1000 БН наспрам $10,08 \pm 1,44$ МН/1000 БН, $t = 3,727$, $df = 28$, $p < 0,01$ и $NDI 1,72 \pm 0,10$ наспрам $1,61 \pm 0,07$, $t = 3,192$, $df = 28$, $p < 0,05$).

Пол испитаника није значајно утицао на фреквенцу МН и NDI. Жене су имале незначајно већу просечну фреквенцу МН и нижи NDI у односу на мушкарце ($9,27 \pm 1,83$ МН/1000 БН наспрам $8,33 \pm 2,06$ МН/1000 БН, $t = 1,312$, $df = 28$, $p > 0,05$ и $NDI 1,64 \pm 0,09$ наспрам $1,70 \pm 0,10$, $t = 1,682$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Донори из сеоских подручја су имали приближно исте просечне фреквенце МН у односу на доноре из градских подручја ($8,63 \pm 2,46$ МН/1000 БН наспрам $8,86 \pm 1,83$ МН/1000 БН, $t = 0,288$, $df = 28$, $p > 0,05$), као и NDI ($1,68 \pm 0,13$ наспрам $1,67 \pm 0,10$, $t = 0,143$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Здраве особе пушачи су имале незначајно веће просечне фреквенце МН у односу на непушаче ($9,22 \pm 1,86$ МН/1000 БН наспрам $8,62 \pm 2,04$ МН/1000 БН, $t = 0,762$, $df = 28$, $p > 0,05$) и незначајно нижи NDI ($1,62 \pm 0,08$ наспрам $1,69 \pm 0,10$, $t = 1,682$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Особе са позитивном породичном анамнезом су имале незначајно ($p > 0,05$) већу фреквенцу МН у односу на особе са негативном ($9,20 \pm 1,93$ наспрам $8,60 \pm 2,01$, $t = 0,780$, $df = 28$) и приближно исти NDI ($1,68 \pm 0,12$ наспрам $1,67 \pm 0,09$, $t = 0,262$, $df = 28$).

4.4. Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом

У Табелама 6 и 7 приказане су појединачне вредности и опсег варирања терапијом-индукованог нивоа ДНК оштећења и дистрибуција класа ћелија у лимфоцитима пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије.

Терапијом-индукован %ДНК оштећења код пацијената са коронарном болешћу непосредно пре коронарне ангиографије је варирао од 34 до 61% (код мушкараца: 40-60% и код жена: 34-61%), док је GDI варирао од 0,91 до 1,54 (код мушкараца: 1,11-1,48 и код жена: 0,91-1,54). Најзаступљеније су биле ћелије без оштећења (класа комета 0), са опсегом варирања од 39 до 66%. Код пацијената са нестабилном ангином пекторис (n = 15), %ДНК оштећења је варирао од 34 до 60%, а GDI од 0,91 до 1,32. Код пацијената са акутним инфарктом миокарда (n = 15), %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 40 до 61%, а GDI од 1,16 до 1,54 (Табела 6). Пирсонов коефицијент корелације је показао значајну позитивну корелацију између %ДНК оштећења и GDI ($r = 0,701$, $p = 0,000$).

Табела 6. Терапијом-индуковано оштећење молекула ДНК у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализирано ћелија	Дг	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
					0	1	2	3	4		
1.	57	Ж	100	НАП	52	9	16	6	17	48	1,27
2.	58	Ж	100	НАП	42	24	10	8	16	58	1,32
3.	59	М	100	НАП	55	12	9	7	17	45	1,19
4.	63	М	100	НАП	58	4	10	10	18	42	1,26
5.	52	М	100	НАП	53	6	23	11	7	47	1,13
6.	50	М	100	НАП	57	0	23	11	9	43	1,15
7.	63	М	100	НАП	47	24	11	7	11	53	1,11
8.	62	Ж	100	НАП	54	12	14	10	10	46	1,10
9.	61	Ж	100	НАП	56	3	23	4	14	54	1,17
10.	62	Ж	100	НАП	66	4	12	9	9	34	0,91
11.	58	Ж	100	НАП	43	20	22	10	5	57	1,14
12.	58	Ж	100	НАП	53	8	20	3	16	47	1,21
13.	65	Ж	100	НАП	40	14	33	8	5	60	1,24
14.	59	Ж	100	НАП	54	8	20	5	13	46	1,15
15.	52	М	100	НАП	53	12	18	11	6	47	1,05
16.	59	М	100	АИМ	46	16	16	8	14	54	1,28
17.	64	М	100	АИМ	49	9	9	13	20	51	1,46
18.	48	М	100	АИМ	60	5	5	19	11	40	1,16
19.	51	М	100	АИМ	47	6	20	15	12	53	1,39
20.	59	Ж	100	АИМ	39	18	17	12	14	61	1,44
21.	56	Ж	100	АИМ	48	13	8	13	18	52	1,40
22.	53	М	100	АИМ	51	7	13	11	18	50	1,38
23.	61	Ж	100	АИМ	40	18	14	8	20	60	1,50
24.	53	Ж	100	АИМ	42	11	17	18	12	58	1,47
25.	56	Ж	100	АИМ	50	9	14	9	18	50	1,36
26.	55	М	100	АИМ	43	13	15	17	12	57	1,42
27.	63	М	100	АИМ	42	16	11	14	17	58	1,48
28.	52	М	100	АИМ	46	12	18	10	14	54	1,34
29.	60	М	100	АИМ	40	13	19	16	12	60	1,47
30.	64	Ж	100	АИМ	44	12	9	16	19	56	1,54
Опсег варирања	48-65	Ж/М	100	НАП/АИМ	39-66	0-24	5-33	3-19	5-20	34-61	0,91-1,54

НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ – акутни инфаркт миокарда

Проценат ДНК оштећења се повећао код пацијената са акутним коронарним синдромом, након седам дана од коронарне ангиографије, у односу на ниво оштећења пре коронарне ангиографије и кретао у опсегу од 43 до 70% (код мушкараца од 43 до 70% и код жена од 49 до 69%), као и GDI који је варирао од 1,09 до 1,68 (код мушкараца: 1,21-1,63 и код жена: 1,09-1,68). И након коронарне ангиографије, најзаступљеније су биле ћелије без оштећења, са опсегом варирања од 30 до 57%. Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације утврђена је статистички значајна позитивна корелација између %ДНК оштећења и GDI ($r = 0,626$, $p = 0,000$).

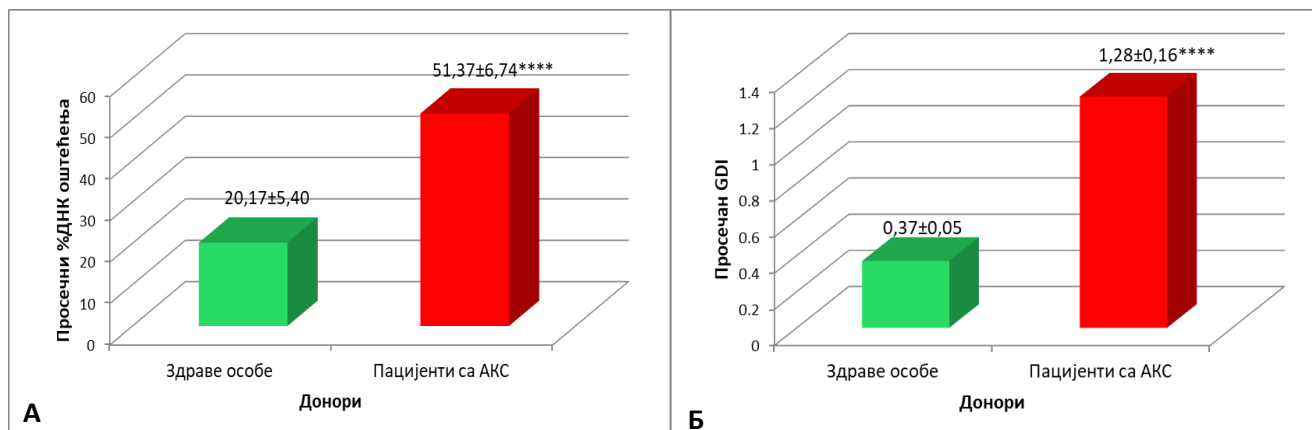
Код пацијената са нестабилном ангином пекторис, %ДНК оштећења је варирао од 49 до 66%, а појединачна вредност GDI-а је варирао од 1,09 до 1,61, док се код пацијената са акутним инфарктом миокарда %ДНК оштећења кретао од 43 до 70%, а GDI од 1,28 до 1,68 (Табела 7).

Табела 7. Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализ. ћел.	Дг	Дозе зрачења (mGy)	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
						0	1	2	3	4		
1.	57	Ж	100	НАП	1085	37	15	17	19	12	63	1,54
2.	58	Ж	100	НАП	270	34	12	24	19	11	66	1,61
3.	59	М	100	НАП	212	46	13	18	11	13	54	1,30
4.	63	М	100	НАП	664	40	10	20	13	17	60	1,57
5.	52	М	100	НАП	668	49	4	30	7	10	51	1,25
6.	50	М	100	НАП	311	48	10	20	14	8	52	1,24
7.	63	М	100	НАП	628	48	10	23	11	8	52	1,21
8.	62	Ж	100	НАП	110	51	17	11	14	7	49	1,09
9.	61	Ж	100	НАП	68	51	13	12	8	16	49	1,25
10.	62	Ж	100	НАП	77	43	20	16	13	8	57	1,23
11.	58	Ж	100	НАП	44	39	18	24	11	8	61	1,31
12.	58	Ж	100	НАП	373	43	18	20	5	14	57	1,29
13.	65	Ж	100	НАП	102	37	18	24	9	12	63	1,41
14.	59	Ж	100	НАП	497	50	12	14	8	16	50	1,28
15.	52	М	100	НАП	500	47	16	18	7	12	53	1,21
16.	59	М	100	АИМ	588	50	3	11	14	22	50	1,55
17.	64	М	100	АИМ	1775	30	15	28	14	13	70	1,65
18.	48	М	100	АИМ	69	57	/	6	12	20	43	1,28
19.	51	М	100	АИМ	1436	40	6	28	8	18	52	1,58
20.	59	Ж	100	АИМ	692	48	11	10	6	25	60	1,49
21.	56	Ж	100	АИМ	762	31	24	23	13	9	69	1,45
22.	53	М	100	АИМ	720	47	2	20	17	14	53	1,49
23.	61	Ж	100	АИМ	825	33	23	11	15	18	67	1,62
24.	53	Ж	100	АИМ	346	50	16	14	10	20	50	1,54
25.	56	Ж	100	АИМ	411	50	7	9	11	23	50	1,50
26.	55	М	100	АИМ	816	34	18	21	13	14	66	1,55
27.	63	М	100	АИМ	143	36	14	19	17	14	64	1,59
28.	52	М	100	АИМ	254	43	9	20	13	15	57	1,48
29.	60	М	100	АИМ	246	32	20	15	19	14	68	1,63
30.	64	Ж	100	АИМ	420	39	13	10	17	21	61	1,68
Опсег варирања	48-65	Ж/М	100	НАП/ АИМ	44-1775	30-57	0-24	6-30	5-19	7-25	43-70	1,09-1,68

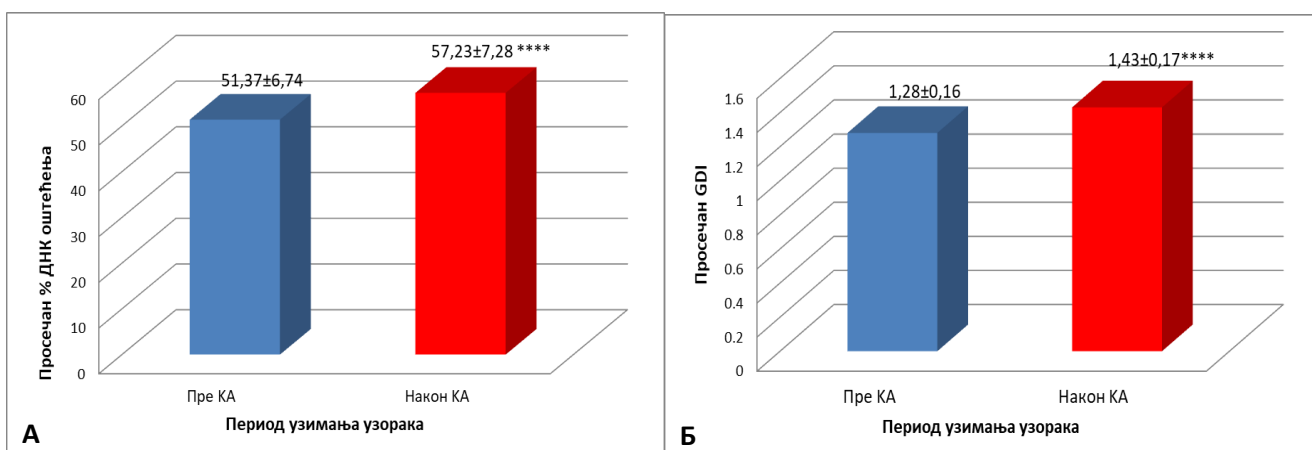
НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ – акутни инфаркт миокарда

На Графикону 4 су приказани резултати просечног %ДНК оштећења и GDI код здравих особа и пацијената са акутним коронарним синдромом. Пацијенти су имали значајно већи терапијом-индукован просечан %ДНК оштећења и GDI у односу на здраве особе (%ДНК оштећења: $t = 18,774$, $df = 29$, $p < 0,0005$; GDI: $t = 30,736$, $df = 29$, $p < 0,0005$).



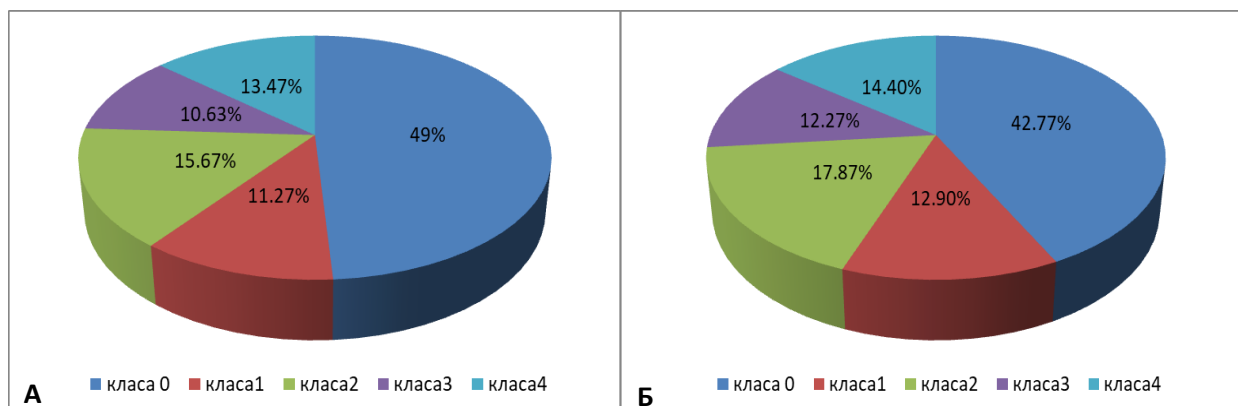
Графикон 4. Просечан А) %ДНК оштећења и Б) индекс генетичког оштећења у лимфоцитима здравих особа и пацијената са акутним коронарним синдромом којима је ординирана одговарајућа терапија (Студентов t -тест, **** $p < 0,0005$)

Након коронарне ангиографије, при просечној дози зрачења од $527,73 \pm 461,19$ mGy, пацијенти су имали значајно повећање просечног %ДНК оштећења ($t = 4,448$, $df = 29$, $p < 0,0005$) и GDI ($t = 10,063$, $df = 29$, $p < 0,0005$) у односу на ниво ДНК оштећења у лимфоцитима истих пацијената пре коронарне ангиографије (Графикон 5).



Графикон 5. Упоредна анализа нивоа геномског оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије: А) %ДНК оштећења и Б) индекс генетичког оштећења (Студентов t -тест, **** $p < 0,0005$)

Анализом дистрибуције комета, примећено је да су најзаступљеније биле ћелије без оштећења (49%). Проценат ћелија са оштећењем (класе комета 1-4) био је повећан за око 6%, у односу на проценат истих ћелија пре коронарне ангиографије (Графикон 6).



Графикон 6. Дистрибуција класа ћелија у односу на ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената А) пре и Б) након коронарне ангиографије

Пацијенти млађи од 60 година (од 48 до 59) имали су незначајно нижи ниво ДНК оштећења у односу на пацијенте старије од 60 година ($50,89 \pm 5,76$ према $52,18 \pm 8,42$, $t = 0,497$, $df = 28$, $p > 0,05$ за %ДНК оштећења и $1,27 \pm 0,12$ према $1,30 \pm 0,21$, $t = 0,264$, $df = 28$, $p > 0,05$ за GDI).

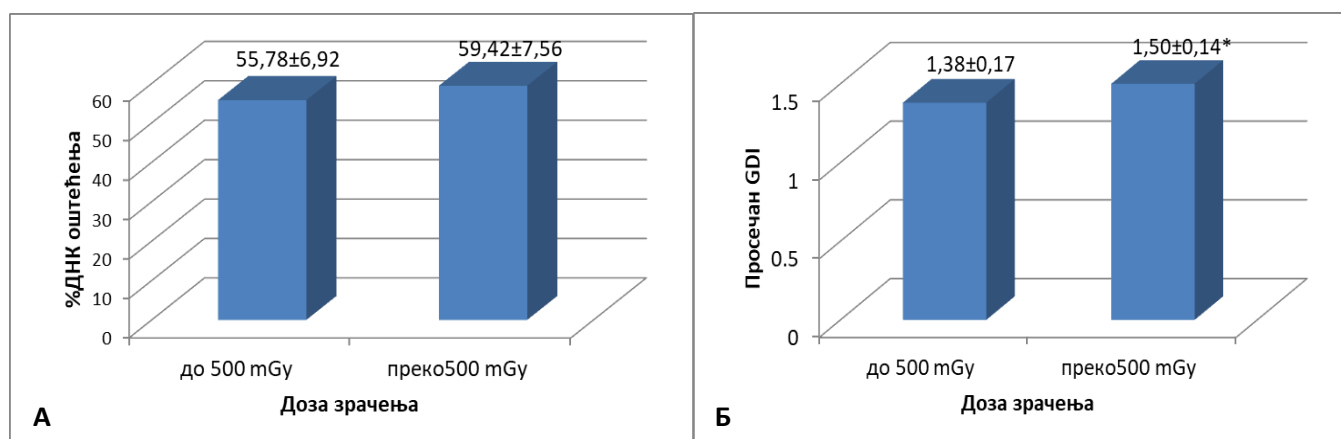
Није запажена значајна разлика у просечном %ДНК оштећења и GDI у лимфоцитима периферне крви пацијената мушког и женског пола. Жене са дијагностикованим акутним коронарним синдромом су имале незначајно већи %ДНК оштећења у односу на мушкарце ($52,47 \pm 7,39$ наспрам $50,27 \pm 6,09$, $t = 0,890$, $df = 28$, $p > 0,05$), док је просечан GDI био исти ($1,29 \pm 0,17$ наспрам $1,29 \pm 0,15$, $t = 0,057$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Од укупно 30 пацијената са акутним коронарним синдромом, 11 је било из сеоских подручја, а 19 из градских подручја. Пацијенти из сеоских подручја су имали значајно нижи %ДНК оштећења и незначајно ниже GDI вредности у односу на исте биомаркере код пацијената из градских подручја ($47,82 \pm 7,55$ наспрам $53,42 \pm 5,43$, $t = 2,359$, $df = 28$, $p < 0,05$ за %ДНК оштећења; $1,31 \pm 0,15$ наспрам $1,24 \pm 0,16$, $t = 1,091$, $df = 28$, $p > 0,05$ за GDI).

Просечан %ДНК оштећења и GDI су се значајно разликовали између пушача и непушача. Пацијенти пушачи су имали значајно већи %ДНК оштећења и GDI у односу на непушаче (%ДНК оштећења: $54,54 \pm 4,77$ наспрам $49,08 \pm 7,24$, $t = 2,241$, $df = 23$, $p < 0,05$ и GDI $1,37 \pm 0,11$ наспрам $1,19 \pm 0,16$, $t = 3,258$, $df = 23$, $p < 0,01$). Међутим, није постојала значајна разлика ($p > 0,05$) између непушача и бивших пушача. Бивши пушачи су имали незначајно мањи %ДНК оштећења у односу на непушаче ($48,60 \pm 7,70$ наспрам $49,08 \pm 7,24$, $t = 0,123$, $df = 15$) и незначајно већи GDI ($1,29 \pm 0,15$ наспрам $1,19 \pm 0,16$, $t = 1,314$, $df = 15$). Пушачи су имали незначајно ($p > 0,05$) већи ниво ДНК оштећења у односу на бивше пушаче (%ДНК оштећења: $54,54 \pm 4,77$ наспрам $48,60 \pm 7,70$, $t = 1,998$, $df = 16$; GDI: $1,37 \pm 0,11$ наспрам $1,29 \pm 0,15$, $t = 1,095$, $df = 16$).

Пацијенти са позитивном породичном анамнезом за КВБ су имали незначајно већи %ДНК оштећења и GDI у односу на пацијенте са негативном породичном анамнезом (%ДНК оштећења: $52,88 \pm 6,15$ наспрам $49,38 \pm 7,21$, $t = 1,433$, $df = 28$, $p > 0,05$ и GDI: $1,33 \pm 0,15$ наспрам $1,22 \pm 0,15$, $t = 1,844$, $df = 28$, $p > 0,05$).

У исто време анализиран је и ефекат укупне дозе јонизујућег зрачења на ниво ДНК оштећења. Са повећањем дозе јонизујућег зрачења, незначајно се повећавао просечан %ДНК оштећења, а значајно GDI у односу на ниже дозе (до 500 mGy) јонизујућег зрачења (%ДНК оштећења: $59,42 \pm 7,56$ у односу на $55,78 \pm 6,92$, $t = 1,361$, $df = 28$, $p > 0,05$; GDI: $1,50 \pm 0,14$ у односу на $1,38 \pm 0,17$, $t = 1,964$, $df = 28$, $p < 0,01$). Резултати су приказани на Графикону 7.



Графикон 7. Разлике у нивоу А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења при укупној дози до 500 mGy и преко 500 mGy (Студентов t -тест, * $p < 0,05$)

У Табели 8 су приказани резултати просечног %ДНК оштећења и GDI, као и дистрибуција класа ћелија од 0 до 4 код пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда, пре и након коронарне ангиографије. Пацијенти са нестабилном ангином пекторис су имали значајно већи %ДНК оштећења и GDI вредности након коронарне ангиографије ($p < 0,0005$), при просечној дози зрачења од $373,93 \pm 298,45$ mGy. Код пацијената са акутним инфарктом миокарда је такође постојала значајна разлика у просечном GDI ($p < 0,0005$) након коронарне ангиографије при просечној дози зрачења од $633,53 \pm 468,86$ mGy, док није било разлике у просечном %ДНК оштећења. Најзаступљеније су биле ћелије без оштећења код обе групе пацијената, али се након коронарне ангиографије проценат истих ћелија смањιο, док се проценат ћелија са оштећењем повећао. Код нестабилне ангине пекторис проценат неоштећених ћелија након коронарне ангиографије се смањιο за 8%, а код акутног инфаркта миокарда проценат истих ћелија након коронарне ангиографије је смањен за око 5%.

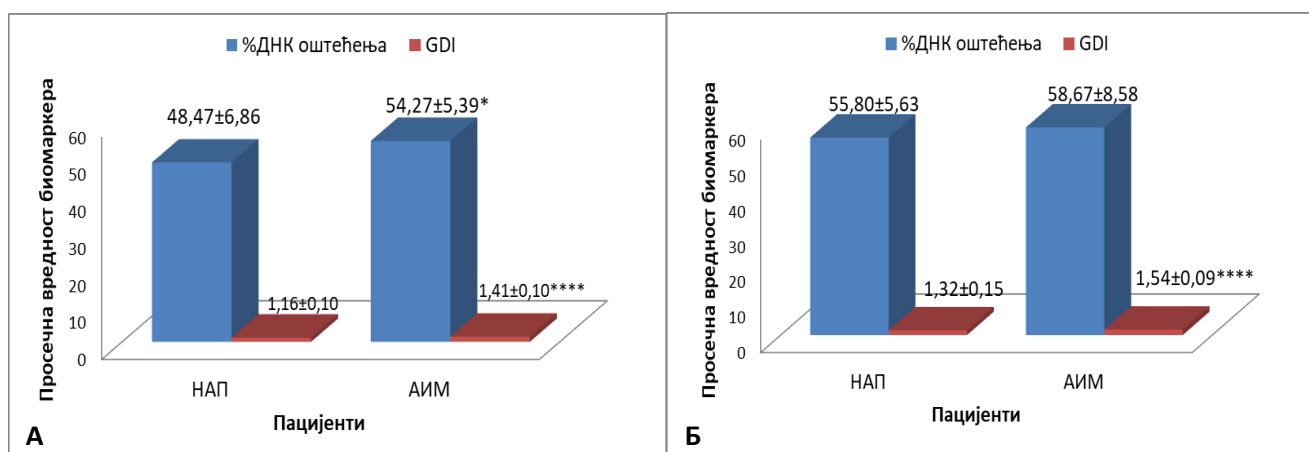
Табела 8. Терапијом-индукован %ДНК оштећења и индекс генетичког оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда пре и након коронарне ангиографије

Дг			N	Старост (год.)	Доза зрачења	Број анализ. ћел.	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
							0	1	2	3	4		
НАП	Пре	КА	15		/	1500	52,20±6,77	10,67±7,37	17,60±6,74	8,00±2,62	11,53±4,64	48,47±6,86	1,16±0,10
				58,60± 4,42									
	Након	КА	15		373,93±298,43	1500	44,20±5,63	13,73±4,27	19,40±5,11	11,27±4,17	11,40±3,27	55,80±5,63**	1,32±0,15*
АИМ	Пре	КА	15		/	1500	45,80±5,45	11,87±4,10	13,67±4,43	13,27±3,58	15,40±3,27	54,27±5,39	1,41±0,10
				56,93 ± 4,98									
	Након	КА	15		633,53 468,86	1500	40,67±8,24	12,40±7,04	16,33±6,96	13,27±3,56	17,33±4,47	58,67±8,58	1,54±0,09**

НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ-акутни инфаркт миокарда; КА-коронарна ангиографија

статистички значајно повећање геномског оштећења након КА (Студентов *t*-тест; **НАП: %ДНК: $t = 3,198$, $df = 26,974$, $p < 0,01$; GDI: $t = 4,452$, $df = 24,459$, $p < 0,01$; **АИМ:** %ДНК: $t = 1,681$, $df = 28$, $p > 0,05$; GDI: $t = 3,686$, $df = 27,945$, $p < 0,01$)

На Графикону 8 је приказана упоредна анализа нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда, пре и након коронарне ангиографије. Пацијенти са инфарктом миокарда имали су значајно већи просечан %ДНК оштећења и GDI од пацијената са нестабилном ангином пекторис пре коронарне ангиографије (%ДНК: $t = 2,780$, $df = 14$, $p < 0,05$; GDI: $t = 6,500$, $df = 14$, $p < 0,0005$). Када се упореде резултати након коронарне ангиографије, такође је постојала статистички значајна разлика у GDI између пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда ($t = 5,061$, $df = 14$, $p < 0,0005$), док није било значајне разлике у просечном %ДНК оштећења, али је свакако након коронарне ангиографије било веће геномско оштећење код пацијената са акутним инфарктом миокарда ($t = 1,076$, $df = 14$, $p > 0,05$).



Графикон 8. Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда А) пре и Б) након коронарне ангиографије (Студентов t -тест, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0005$)

4.5. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом

Фреквенце МН, НП, НПМ, дистрибуција МН и NDI, као и њихов опсег варирања, у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије су приказане у Табелама 9 и 10.

Фреквенца МН код пацијената пре коронарне ангиографије је варијала од 17 до 28 МН/1000 БН ћелија (код жена од 18 до 28 МН/1000 БН ћелија и код мушкараца од 17 до 26/1000 БН ћелија), док је број БН ћелија са МН био у опсегу од 14 до 27. Код само три пацијента су уочени НПМ (0-1 НПМ/1000 БН ћелија), а НП запажени су код 13 пацијената (0-3/1000 БН ћелија). NDI се кретао у опсегу од 1,23 до 1,56 (код мушкараца од 1,27 до 1,56 и код жена од 1,23 до 1,54).

Код пацијената са нестабилном ангином пекторис фреквенца МН се кретала у опсегу од 17 до 26/1000 БН ћелија, а код пацијената са акутним инфарктом миокарда од 20 до 28/1000 БН ћелија. NDI код пацијената са нестабилном ангином пекторис је био у опсегу од 1,30 до 1,54, а код пацијената са акутним инфарктом миокарда од 1,23 до 1,56.

Најзаступљеније су биле БН ћелије са 1МН (опсег варирања: 10-26 ћелија), док су ћелије са 2, 3 и 4 МН биле знатно ређе заступљене (Табела 9).

Табела 9. Фреквенца микронуклеуса, нуклеусних пупољака, нуклеоплазматских мостова и индекс нуклеусне деобе код пацијената са акутним коронарним синдромом

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализ. БН ћелија	Дг	МН/ 1000 БН ћел.	Број БН ћел. са МН	Дистрибуција МН				НП	НПМ	NDI
							1МН	2МН	3МН	4МН			
1.	57	Ж	1000	НАП	20	16	12	4	/	/	2	/	1,49
2.	58	Ж	1000	НАП	26	25	23	1	1	/	3	/	1,54
3.	59	М	1000	НАП	19	16	15	/	/	1	2	/	1,46
4.	63	М	1000	НАП	22	18	16	1	/	1	/	/	1,30
5.	52	М	1000	НАП	17	17	17	/	/	/	1	/	1,52
6.	50	М	1000	НАП	17	15	14	/	1	/	2	/	1,42
7.	63	М	1000	НАП	18	17	16	1	/	/	/	/	1,41
8.	62	Ж	1000	НАП	18	16	14	2	/	/	/	/	1,47
9.	61	Ж	1000	НАП	21	17	13	4	/	/	/	/	1,40
10.	62	Ж	1000	НАП	18	14	10	4	/	/	2	/	1,52
11.	58	Ж	1000	НАП	18	13	11	2	/	/	1	/	1,49
12.	58	Ж	1000	НАП	19	15	11	4	/	/	/	/	1,48
13.	65	Ж	1000	НАП	22	18	15	2	1	/	/	/	1,30
14.	59	Ж	1000	НАП	18	14	10	4	/	/	/	/	1,36
15.	52	М	1000	НАП	17	16	15	1	/	/	/	/	1,47
16.	59	М	1000	АИМ	23	18	14	3	1	/	3	1	1,48
17.	64	М	1000	АИМ	24	22	20	2	/	/	/	1	1,53
18.	48	М	1000	АИМ	20	18	16	2	/	/	/	/	1,56
19.	51	М	1000	АИМ	26	23	20	3	/	/	/	1	1,32
20.	59	Ж	1000	АИМ	22	21	20	1	/	/	2	/	1,46
21.	56	Ж	1000	АИМ	20	18	17	/	1	/	3	/	1,38
22.	53	М	1000	АИМ	26	25	24	1	/	/	/	/	1,50
23.	61	Ж	1000	АИМ	27	19	13	4	2	/	/	/	1,24
24.	53	Ж	1000	АИМ	25	25	25	/	/	/	/	/	1,33
25.	56	Ж	1000	АИМ	25	22	19	3	/	/	1	/	1,33
26.	55	М	1000	АИМ	26	20	15	4	1	/	/	/	1,30
27.	63	М	1000	АИМ	26	20	14	6	/	/	1	/	1,27
28.	52	М	1000	АИМ	24	17	11	5	1	/	/	/	1,34
29.	60	М	1000	АИМ	25	23	21	2	/	/	1	/	1,30
30.	64	Ж	1000	АИМ	28	27	26	1	/	/	/	/	1,23
Опсег варирања	48-65	Ж/М	1000	НАП/ АИМ	17-28	14-27	10-26	0-6	0-1	0-1	0-3	0-1	1,23- 1,56

НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ-акутни инфаркт миокарда

Појединачне фреквенце МН код пацијената са акутним коронарним синдромом након 7 дана од коронарне ангиографије су варирале од 19 до 31 МН/1000 БН ћелија (код мушкараца од 19 до 30/1000 БН ћелија; код жена од 18 до 28 МН/1000 БН ћелија), а NDI се кретао у опсегу од 1,19 до 1,51 (код мушкараца од 1,20 до 1,51 и код жена од 1,19 до 1,45). Код 16 пацијената су уочени НП (0-6/1000 БН ћелија), док су код 4 пацијента запажени НПМ (0-1/1000 БН ћелија).

Код пацијената са нестабилном ангином пекторис фреквенца МН је била у опсегу од 19 до 31/1000 БН ћелија, а NDI од 1,24 до 1,45. Код пацијената са инфарктом миокарда, фреквенца МН је варијала од 23 до 30/1000 БН ћелија, а NDI од 1,19 до 1,51. Најзаступљеније су биле БН ћелије са 1МН (у опсегу варирања од 13 до 26 ћелија), док су ћелије са 2, 3 и 4 МН биле ређе заступљене (Табела 10).

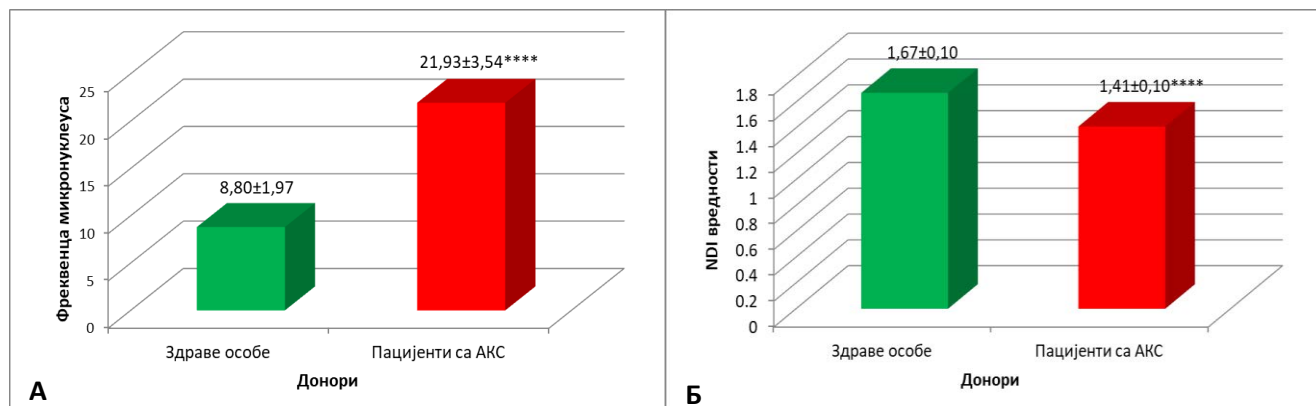
Табела 10. Фреквенца микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе код пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализ. БН ћел.	Дг	Дозе зрачења (mGy)	МН/1000 БН ћел.	Број БН ћел. са МН	Дистрибуција МН				НП	НПМ	NDI
								1МН	2МН	3МН	4МН			
1.	57	Ж	1000	НАП	1085	29	24	20	3	1	/	1	/	1,45
2.	58	Ж	1000	НАП	270	31	28	25	3	/	/	6	/	1,45
3.	59	М	1000	НАП	212	22	21	20	1	/	/	3	/	1,40
4.	63	М	1000	НАП	664	28	25	22	3	/	/	3	/	1,28
5.	52	М	1000	НАП	668	21	20	19	1	/	/	3	1	1,44
6.	50	М	1000	НАП	311	21	17	14	2	1	/	2	/	1,40
7.	63	М	1000	НАП	628	20	19	18	1	/	/	4	1	1,40
8.	62	Ж	1000	НАП	110	23	20	18	1	1	/	/	/	1,44
9.	61	Ж	1000	НАП	68	23	20	19	/	/	1	/	/	1,33
10.	62	Ж	1000	НАП	77	20	19	18	1	/	/	/	/	1,41
11.	58	Ж	1000	НАП	44	24	20	17	2	1	/	2	/	1,40
12.	58	Ж	1000	НАП	373	22	17	13	3	1	/	1	/	1,45
13.	65	Ж	1000	НАП	102	28	23	18	5	/	/	/	/	1,28
14.	59	Ж	1000	НАП	497	20	18	16	2	/	/	/	/	1,24
15.	52	М	1000	НАП	500	19	17	15	2	/	/	1	/	1,43
16.	59	М	1000	АИМ	588	26	25	24	1	/	/	4	1	1,51
17.	64	М	1000	АИМ	1775	24	20	17	2	1	/	1	/	1,46
18.	48	М	1000	АИМ	69	24	23	22	1	/	/	/	/	1,51
19.	51	М	1000	АИМ	1436	28	27	26	1	/	/	2	/	1,26
20.	59	Ж	1000	АИМ	692	23	20	18	1	1	/	2	/	1,44
21.	56	Ж	1000	АИМ	762	24	23	22	1	/	/	/	/	1,34
22.	53	М	1000	АИМ	720	28	22	17	4	1	/	/	/	1,34
23.	61	Ж	1000	АИМ	825	30	22	15	6	1	/	/	/	1,26
24.	53	Ж	1000	АИМ	346	26	25	24	1	/	/	1	1	1,31
25.	56	Ж	1000	АИМ	411	28	21	16	3	2	/	/	/	1,30
26.	55	М	1000	АИМ	816	29	24	19	5	/	/	1	/	1,21
27.	63	М	1000	АИМ	143	30	21	13	7	1	/	/	/	1,20
28.	52	М	1000	АИМ	254	27	22	18	3	1	/	/	/	1,30
29.	60	М	1000	АИМ	246	29	23	17	6	/	/	/	/	1,23
30.	64	Ж	1000	АИМ	420	30	28	26	2	/	/	/	/	1,19
Опсег варирања	48-65	Ж/М	1000	НАП/АИМ	44-1775	19-31	17-28	13-26	0-7	0-2	0-1	0-6	0-1	1,19-1,51

НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ-акутни инфаркт миокарда

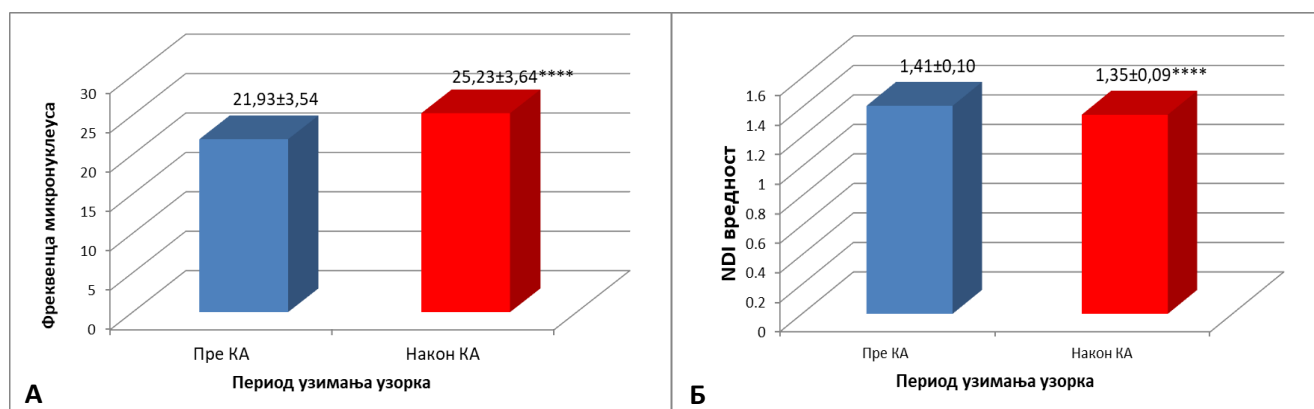
Фреквенце МН и NDI пре и након коронарне ангиографије су у значајној негативној корелацији (Пирсонов коефицијент корелације: $r = -0,557$, $p = 0,001$ пре; $r = -0,500$, $p = 0,005$ након КА), односно са снижавањем NDI-а повећавала се фреквенца МН.

ЦБМН тестом је показано да пацијенти са акутним коронарним синдромом имају значајно веће ($p < 0,0005$) просечне фреквенце МН у односу на здраве особе ($21,93 \pm 3,54$ у односу на $8,80 \pm 1,97$; $t = 16,260$, $df = 29$, $p < 0,0005$) и значајно нижи NDI ($1,41 \pm 0,10$ у односу на $1,67 \pm 0,10$; $t = 9,386$, $df = 29$, $p < 0,0005$), (Графикон 9).



Графикон 9. Просечне фреквенце А) микронуклеуса и Б) индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви здравих особа и пацијената са акутним коронарним синдромом (Студентов t -тест, **** $p < 0,0005$)

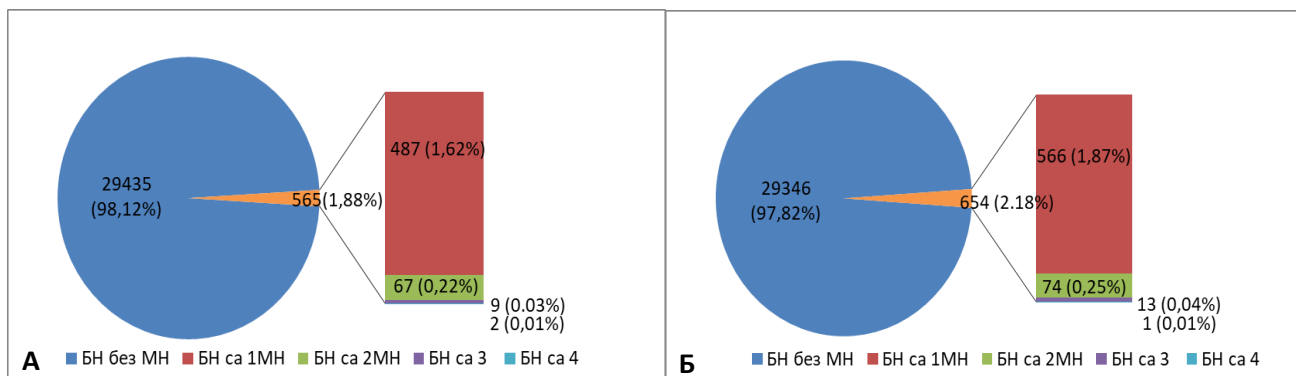
На Графикону 10 су приказане просечне фреквенце МН и NDI у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом. Пацијенти су имали значајно веће ($p < 0,0005$) просечне фреквенце МН након коронарне ангиографије у односу на просечне фреквенце МН у лимфоцитима истих пацијената пре коронарне ангиографије ($25,23 \pm 3,65$ у односу на $21,93 \pm 3,54$; $t = 10,023$, $df = 29$, $p < 0,0005$), и значајно нижи NDI ($1,35 \pm 0,09$ у односу на $1,41 \pm 0,10$; $t = 6,978$, $df = 29$, $p < 0,0005$).



Графикон 10. Резултати просечних фреквенци А) микронуклеуса и Б) индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије (Студентов t -тест, **** $p < 0,0005$)

Анализом дистрибуције МН код истих пацијената, уочено је да је од укупног броја анализираних БН ћелија (30 000), 565 (1,88%) ћелија имало МН, од чега је 487 (1,62%) било

са 1МН, 67 (0,22%) са 2МН, 9 (0,03%) са 3МН и 2 (0,01%) са 4 МН. Седам дана након коронарне ангиографије, код истих пацијената, број БН ћелија са МН је био 654 (2,18%), од којих су најзаступљеније биле БН ћелије са 1 МН (1,87%) и 2 МН (0,25%), 13 ћелија са 3 МН (0,04%), а запажена је само 1 БН ћелија са 4 МН (0,01%) (Графикон 11).



Графикон 11. Дистрибуција бинуклеусних ћелија код пацијената са акутним коронарним синдромом А) пре и Б) након коронарне ангиографије

У поређењу са здравим особама, просечна фреквенца НП је статистички значајно већа код пацијената са акутним коронарним синдромом ($0,20 \pm 0,48$ у односу на $0,80 \pm 1,06$, $t = 2,812$, $df = 40,529$, $p < 0,01$).

Пацијенти старости од 48 до 59 су имали незначајно нижу фреквенцу МН у односу на пацијенте старости од 60 до 65 година ($21,47 \pm 3,49$ наспрам $22,73 \pm 3,66$, $t = 0,932$, $df = 28$, $p > 0,05$) и значајно виши NDI ($1,43 \pm 0,08$ наспрам $1,36 \pm 0,10$, $t = 2,047$, $df = 28$, $p < 0,05$).

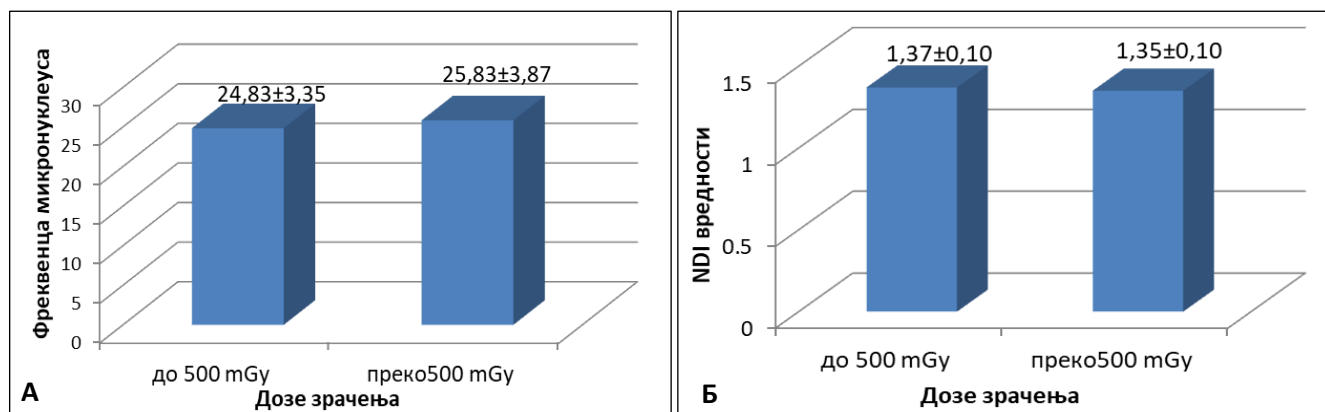
Није постојала статистички значајна разлика у просечним фреквенцама МН и NDI између мушких и женских пацијената са акутним коронарним синдромом. Мушкарци су имали већу фреквенцу МН у односу на жене ($22,07 \pm 3,65$ наспрам $21,80 \pm 3,55$, $t = 0,203$, $df = 28$, $p > 0,05$), а приближно исти NDI ($1,41 \pm 0,10$ наспрам $1,40 \pm 0,10$, $t = 0,293$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Пацијенти из сеоских подручја су имали ниже фреквенце МН у односу на пацијенте са акутним коронарним синдромом из градских подручја, али без статистичке значајности ($20,82 \pm 3,46$ наспрам $22,58 \pm 3,52$, $t = 1,329$, $df = 28$, $p > 0,05$), док им је NDI био сличан ($1,40 \pm 0,11$ наспрам $1,41 \pm 0,08$, $t = 0,101$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Просечна фреквенца МН је била значајно већа код пушача у односу на непушаче ($23,54 \pm 2,85$ наспрам $20,00 \pm 3,19$, $t = 2,931$, $df = 23$, $p < 0,01$), док се NDI није значајно разликовао ($1,41 \pm 0,10$ наспрам $1,43 \pm 0,09$, $t = 0,320$, $df = 23$, $p > 0,05$). Постојала је незначајна разлика између непушача и бивших пушача у фреквенци МН и NDI (МН: $20,00 \pm 3,19$ наспрам $22,40 \pm 4,34$, $t = 1,276$, $df = 15$, $p > 0,05$; NDI: $1,43 \pm 0,09$ наспрам $1,35 \pm 0,09$, $t = 1,516$, $df = 15$, $p > 0,05$), као и између пушача и бивших пушача (МН: $23,54 \pm 2,85$ наспрам $22,40 \pm 4,34$, $t = 0,659$, $df = 16$, $p > 0,05$; NDI: $1,41 \pm 0,10$ наспрам $1,35 \pm 0,09$, $t = 1,248$, $df = 16$, $p > 0,05$).

Фреквенце МН су биле незначајно веће код пацијената са позитивном породичном анамнезом, док је NDI био значајно нижи у односу на пацијенте са негативном анамнезом (МН: $22,88 \pm 3,62$ наспрам $20,69 \pm 3,15$, $t = 1,735$, $df = 28$, $p > 0,05$ и NDI: $1,37 \pm 0,10$ наспрам $1,45 \pm 0,07$, $t = 2,453$, $df = 28$, $p < 0,05$).

Није било значајне разлике у просечној фреквенци МН у лимфоцитима пацијената при дозама до 500 mGy и преко 500 mGy ($24,83 \pm 3,87$ наспрам $25,83 \pm 3,35$, $t = 0,730$, $df = 28$, $p > 0,05$), као ни у просечној NDI вредности ($1,35 \pm 0,10$ наспрам $1,37 \pm 0,10$, $t = 0,485$, $df = 28$, $p > 0,05$) (Графикон 12).



Графикон 12. Разлике у фреквенцама микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима пацијената при дозама А) до 500 mGy и Б) преко 500 mGy

У Табели 11 приказане су просечне фреквенце МН и NDI у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда пре и након коронарне ангиографије и дистрибуција МН. Анализом хромозомског оштећења у лимфоцитима периферне крви, пацијенти са нестабилном ангином пекторис, као и пацијенти са акутним инфарктом миокарда су имали значајну разлику ($p < 0,05$) у средњим вредностима МН и NDI-а пре и након коронарне ангиографије. Фреквенца МН је била значајно већа након коронарне ангиографије ($19,40 \pm 2,58$ пре и $23,40 \pm 3,80$ након КА код НАП и $24,47 \pm 2,36$ пре и $27,07 \pm 2,43$ након КА код АИМ). NDI је био значајно нижи након коронарне ангиографије, код нестабилне ангине пекторис је износио $1,44 \pm 0,08$ пре и $1,38 \pm 0,06$ након коронарне ангиографије, а код акутног инфаркта миокарда $1,37 \pm 0,11$ пре и $1,32 \pm 0,10$ након коронарне ангиографије.

Број БН ћелија са МН, као и број МН у БН ћелији је био повећан након коронарне ангиографије, код обе групе пацијената. Код пацијената са нестабилном ангином пекторис, непосредно пре коронарне ангиографије, 247 БН ћелија (1,65%) од укупно 30 000 анализираних је садржало МН, при чему су најзаступљеније биле ћелије са 1 МН (1,41%), а знатно ређе ћелије са 2 МН (0,20%), 3 МН (0,02%) и 4 МН (0,01%). Код истих пацијената након коронарне ангиографије, број БН ћелија са МН се повећао на 308/30 000 анализираних ћелија (2,05%), међу којима су најзаступљеније биле ћелије са 1 МН (1,81%), а најмање заступљене са 4 МН (0,01%). Код пацијената са акутним инфарктом миокарда, број БН ћелија са МН је био већи него код пацијената са нестабилном ангином пекторис након коронарне ангиографије. Од укупно 30 000 анализираних, запажено је 318 БН ћелија са МН (2,13%), а најзаступљеније су биле са 1 МН (1,83%), док са 4 МН нису запажене. Након коронарне ангиографије, код истих пацијената је запажен пораст броја БН ћелија са МН (346), међу којима су такође најзаступљеније биле са 1 МН (1,96%).

Табела 11. Просечне фреквенце микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда пре и након коронарне ангиографије

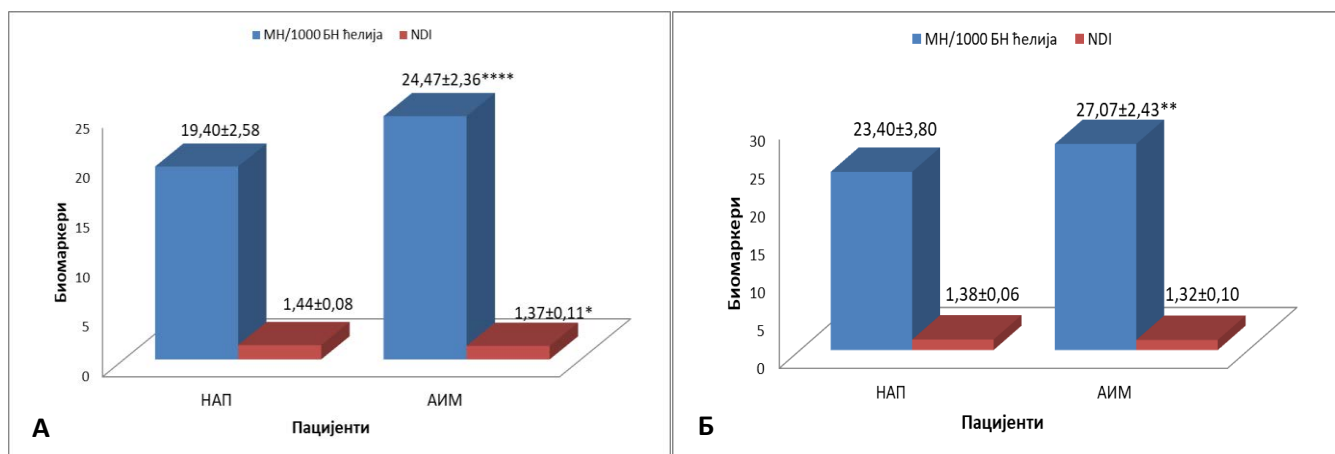
Дг	N	Старост (год.)	Доза зрачења	Број анализ. ћел.	Број БН ћел. са МН	МН/ 1000 БН ћел.	Дистрибуција МН				NDI
							1МН	2МН	3МН	4МН	
НАП	Пре КА	15	/	15000	247 (1,65%)	19,40±2,58	212 (1,41%)	30 (0,20%)	3 (0,02%)	2 (0,01%)	1,44±0,08
	Након КА	15	58,60± 4,42 373,93± 298,43	15000	308 (2,05%)	23,40±3,80****	272 (1,81%)	30 (0,20%)	5 (0,03%)	1 (0,01%)	1,38±0,06***
АИМ	Пре КА	15	/	15000	318 (2,13%)	24,47±2,36	275 (1,83%)	37 (0,25%)	6 (0,04%)	/	1,37±0,11
	Након КА	15	56,93 ± 4,98 633,53± 468,86	15000	346 (2,31%)	27,07±2,43****	294 (1,96%)	44 (0,29%)	8 (0,05%)	/	1,32±0,10***

% је израчунаван у односу на укупан број анализираних ћелија; НАП-нестабилна ангина пекторис; АИМ-акутни инфаркт миокарда

, * статистички значајно повећање МН/1000 БН ћелија и значајно смањење NDI-а након КА (Студентов *t*-тест; **НАП**: МН: $t = 7,611$, $df = 14$, $p < 0,0005$; NDI: $t = 5,981$, $df = 14$, $p < 0,0005$; **АИМ**: МН: $t = 8,107$, $df = 14$, $p < 0,0005$; NDI: $t = 4,049$, $df = 14$, $p < 0,001$)

Просечна вредност НП се незначајно повећала након коронарне ангиографије у односу на вредности пре коронарне ангиографије ($0,80 \pm 1,06$ у односу на $1,23 \pm 1,57$, $t = 1,632$, $df = 29$, $p > 0,05$).

ЦБМН тест је показао да је фреквенца МН у лимфоцитима пацијената са нестабилном ангином пекторис била нижа него код акутног инфаркта миокарда, пре ($t = 5,609$, $df = 27,762$, $p < 0,0005$) и након коронарне ангиографије ($t = 3,150$, $df = 23,851$, $p < 0,01$), док је NDI пре коронарне ангиографије био значајно већи код пацијената са нестабилном ангином пекторис него код инфаркта миокарда ($t = 2,082$, $df = 25,129$, $p < 0,05$). Међутим, није било значајне разлике у NDI након коронарне ангиографије код истих пацијената ($t = 1,875$, $df = 23,841$, $p > 0,05$) (Графикон 13).



Графикон 13. Упоредна анализа просечних фреквенци микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе А) пре и Б) након коронарне ангиографије код пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда (Студентов t -тест, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0005$)

У Табели 12 су приказани резултати корелационе и мултиваријабилне регресионе анализе. Анализом биваријантне корелације утврђене су значајне позитивне корелације између нивоа ДНК оштећења (%ДНК оштећења и GDI) и здравственог стања, укупне дозе Х-зрачења током коронарне ангиографије, крвног притиска (систолног и дијастолног (са прагом значајности)), пушења, биохемијских анализа (тропонин, уреа, креатинин, CRP, глукоза, СК, СК-МВ, Na и K) и терапије лековима за КВБ. Такође је утврђена позитивна значајна корелација између хромозомских аберација и здравственог стања, укупне дозе Х-зрачења током коронарне ангиографије, крвног притиска, пушења, биохемијских анализа (триглицериди, тропонин, уреа, креатинин, CRP, глукоза, СК, СК-МВ, Na и K) и целокупне терапије лековима за КВБ. Вредности тропонина биле су значајно повишене код пацијената са инфарктом миокарда у односу на пацијенте са нестабилном ангином пекторис, код којих су вредности овог маркера су биле у оквиру референтних вредности ($p = 0,004$).

Вишеструка линеарна регресиона анализа је здравствено стање, укупну дозу Х-зрачења, дијастолни крвни притисак, пушење цигарета, повишене вредности тропонина, урее, СК-МВ и Na, терапија АСЕ-инхибиторима, бета блокаторима и диуретицима детектовала као предикторе ДНК оштећења код акутног коронарног синдрома, док остале променљиве нису биле значајне. Здравствено стање, дозе Х-зрачења, пушење, повишен тропонин, уреа и СК-МВ, терапија лековима из групе АСЕ-инхибитора и бета блокатора су такође проузроковали повећање хромозомских аберација.

Табела 12. Биваријантна корелациона и мултиваријабилна регресиона анализа као предиктори геномских оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом

Променљиве	Биваријантна корелациона анализа						Мултиваријабилна регресиона анализа					
	%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса		%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса	
	г	р	г	р	г	р	β	р	β	р	β	р
Старост	0,055	0,674	0,112	0,396	0,202	0,121	0,166	0,331	0,026	0,248	0,185	0,302
Пол	0,011	0,931	0,021	0,871	0,023	0,860	-0,023	0,646	0,045	0,074	0,045	0,381
АКС	0,929	0,000	0,984	0,000	0,919	0,000	1,017	0,000	1,034	0,000	1,004	0,000
Х-зрачење током КА	0,598	0,000	0,637	0,000	0,643	0,000	0,536	0,000	0,525	0,000	0,490	0,000
Крвни притисак												
Систолни	0,485	0,000	0,496	0,000	0,516	0,000	-0,079	0,320	-0,064	0,091	-0,001	0,992
Дијастолни	0,252	0,054	0,311	0,016	0,338	0,009	0,074	0,305	0,087	0,012	0,096	0,199
Породична анамнеза за КВС болести	-0,130	0,321	0,099	0,454	0,095	0,471	-0,130	0,321	0,099	0,454	0,095	0,471
Пушење	0,512	0,000	0,609	0,000	0,519	0,000	0,137	0,038	0,062	0,046	0,179	0,009
Пребивалиште	-0,071	0,590	0,052	0,695	0,050	0,703	0,091	0,076	-0,049	0,064	-0,057	0,280
Лабораторијски параметри												
Холестерол	0,140	0,303	-0,092	0,500	-0,095	0,485	0,100	0,632	-0,008	0,950	0,082	0,617
HDL	-0,165	0,272	0,176	0,241	0,081	0,592	0,016	0,927	0,005	0,964	0,036	0,797
LDL	-0,199	0,180	0,156	0,295	0,172	0,249	-0,389	0,101	0,204	0,076	0,222	0,226
Триглицериди	-0,195	0,150	0,234	0,082	0,259	0,054	0,107	0,531	0,031	0,751	0,092	0,495
Тропонин	0,381	0,003	0,499	0,000	0,597	0,000	0,670	0,053	0,782	0,000	0,771	0,007
Уреа	0,708	0,000	0,731	0,000	0,700	0,000	0,720	0,014	0,690	0,000	0,609	0,009
Креатинин	0,471	0,000	0,503	0,000	0,442	0,001	-0,445	0,160	0,052	0,770	-0,052	0,831
CRP	0,337	0,017	0,394	0,005	0,391	0,005	0,431	0,178	-0,232	0,209	-0,217	0,381
Глукоза	0,489	0,000	0,528	0,000	0,576	0,000	-0,159	0,756	-0,554	0,071	-0,387	0,340
СК	0,472	0,001	0,542	0,000	0,541	0,000	0,746	0,255	0,211	0,572	0,372	0,465

Наставак Табеле 12

Променљиве	Биваријантна корелациона анализа						Мултиваријабилна регресиона анализа					
	%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса		%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса	
	г	р	г	р	г	р	β	р	β	р	β	р
СК-МВ	0,317	0,043	0,401	0,009	0,350	0,025	0,193	0,588	-0,417	0,051	-0,587	0,044
Na	0,345	0,016	0,351	0,014	0,200	0,174	-0,239	0,174	0,291	0,007	0,155	0,258
K	0,320	0,027	0,429	0,002	0,414	0,003	0,151	0,408	0,061	0,566	0,747	0,463
Терапија лековима												
АСЕ-инхибитори	0,811	0,000	-0,878	0,000	-0,807	0,000	0,309	0,020	-0,418	0,000	-0,360	0,013
Бета блокатори	0,841	0,000	-0,869	0,000	-0,793	0,000	0,561	0,053	-0,633	0,007	-0,779	0,015
Двојна антиагрегациона	0,814	0,000	-0,831	0,000	-0,746	0,000	-0,089	0,749	0,302	0,177	0,469	0,128
Диуретик	0,397	0,002	-0,395	0,002	-0,398	0,002	0,159	0,034	-0,110	0,065	-0,137	0,095
Статини	0,683	0,000	-0,714	0,000	-0,622	0,000	0,154	0,145	-0,170	0,046	-0,101	0,381
Антикоагуланти	0,631	0,000	-0,703	0,000	-0,657	0,000	-0,069	0,510	-0,037	0,657	-0,083	0,471

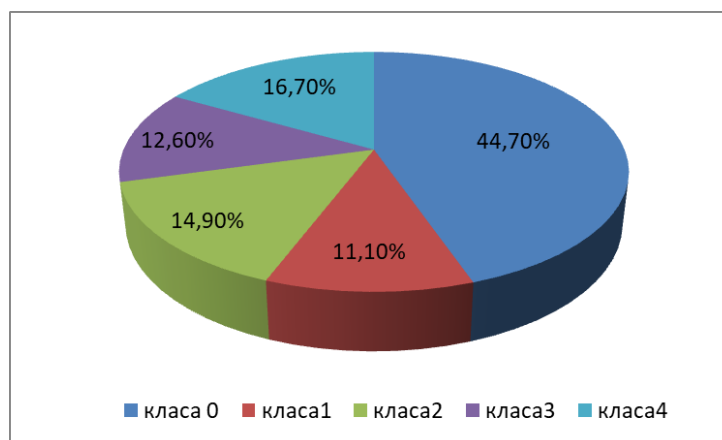
4.6. Оксидациони ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

У Табели 13 су приказане појединачне вредности нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом којима је ординирана терапија. Проценат ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 40 до 79% (код жена од 40 до 79% и код мушкараца од 43 до 67%), док је GDI био у опсегу од 1,18 до 1,80 (код жена од 1,23 до 1,80 и код мушкараца од 1,18 до 1,78). Најзаступљеније су биле ћелије без оштећења, класе комета 0, са опсегом варирања од 21 до 60%, док су остале класе биле мање заступљене. Пирсонов коефицијент корелације између %ДНК оштећења и GDI је био негативан и значајан ($r = 0,743$, $p = 0,000$).

Табела 13. Проценат ДНК оштећења, индекс генетичког оштећења и дистрибуција класа комета у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализ. ћелија	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
				0	1	2	3	4		
1.	65	М	100	50	8	9	10	23	50	1,48
2.	52	М	100	53	13	8	15	11	47	1,18
3.	53	М	100	33	7	27	15	18	67	1,78
4.	60	М	100	45	9	18	16	12	55	1,41
5.	49	М	100	57	4	5	18	16	43	1,32
6.	61	М	100	43	10	21	11	15	57	1,45
7.	53	Ж	100	50	5	11	16	18	50	1,47
8.	53	М	100	43	12	18	13	14	57	1,43
9.	56	М	100	51	9	13	10	17	49	1,33
10.	62	М	100	39	17	14	12	18	61	1,53
11.	50	М	100	50	10	14	10	16	50	1,32
12.	51	М	100	44	11	17	8	20	56	1,49
13.	50	М	100	56	0	9	18	17	44	1,40
14.	53	Ж	100	30	14	26	6	24	70	1,80
15.	57	М	100	39	10	23	16	12	61	1,52
16.	54	М	100	54	2	17	6	21	46	1,38
17.	50	М	100	55	0	15	14	16	45	1,36
18.	68	Ж	100	36	12	30	9	13	64	1,51
19.	65	Ж	100	41	11	19	18	11	59	1,47
20.	66	Ж	100	41	18	7	11	23	59	1,57
21.	53	Ж	100	46	18	8	11	17	54	1,35
22.	67	Ж	100	35	19	16	6	24	65	1,65
23.	60	Ж	100	51	3	24	10	12	49	1,29
24.	58	Ж	100	46	11	8	24	11	54	1,43
25.	55	Ж	100	50	8	9	11	22	50	1,47
26.	60	Ж	100	40	18	5	8	29	60	1,68
27.	61	Ж	100	60	1	12	10	17	40	1,23
28.	60	Ж	100	43	18	3	21	15	57	1,47
29.	63	Ж	100	39	21	18	11	11	61	1,34
30.	62	Ж	100	21	34	23	14	8	79	1,54
Опсег варирања	49-68	М/Ж	100	21-60	0-34	3-30	6-24	8-29	40-79	1,18-1,80

Просечан %ДНК оштећења код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом је био $55,30 \pm 8,73$, а GDI $1,46 \pm 0,14$. Анализом дистрибуције класа ћелија, у највећем проценту су биле запажене ћелије без оштећења (44,70%), док је 16,17% било ћелија са највећим оштећењем, класа комета 4 (Графикон 14).



Графикон 14. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

Пацијенти старости од 49 до 59 година су имали незначајно нижи %ДНК оштећења у односу на пацијенте старости од 60 до 68 година ($52,69 \pm 7,95$ наспрам $58,29 \pm 8,90$, $t = 1,821$, $df = 28$, $p > 0,05$) и незначајно нижи GDI ($1,44 \pm 0,16$ наспрам $1,47 \pm 0,13$, $t = 0,629$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Када је испитиван ефекат пола као фактора који такође може да утиче на геномско оштећење, жене су имале незначајно већи просечан %ДНК оштећења и GDI у односу на мушкарце (%ДНК оштећења: $58,07 \pm 9,45$ наспрам $52,53 \pm 7,22$, $t = 1,802$, $df = 28$, $p > 0,05$ и GDI: $1,49 \pm 0,15$ наспрам $1,43 \pm 0,13$, $t = 1,135$, $df = 28$, $p > 0,05$).

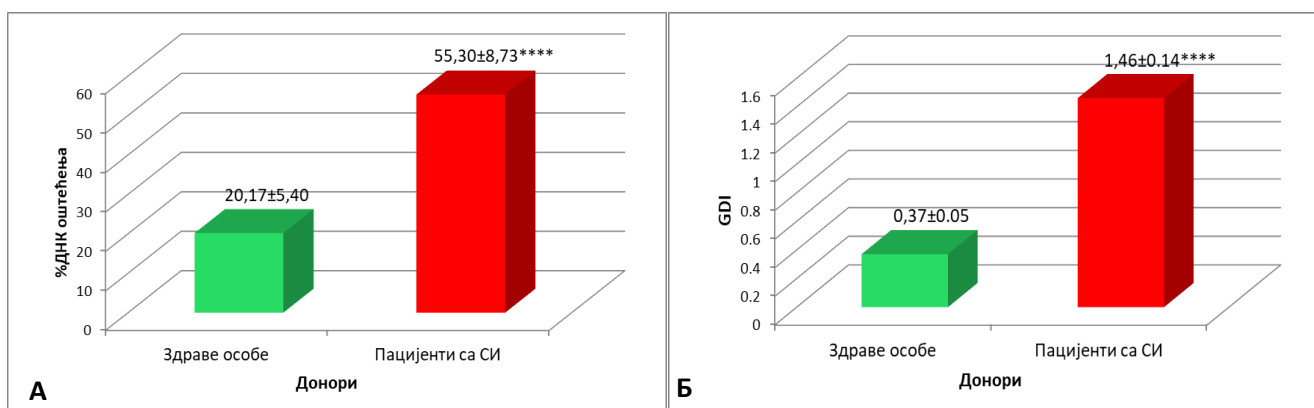
Није било значајне разлике у просечном %ДНК оштећења и GDI код пацијената пушача и непушача (%ДНК оштећења: $56,39 \pm 9,77$ у односу на $56,71 \pm 6,90$, $t = 0,080$, $df = 23$, $p > 0,05$; GDI: $1,46 \pm 0,15$ у односу на $1,51 \pm 0,13$, $t = 0,872$, $df = 23$, $p > 0,05$). Такође, није било значајне разлике у нивоу ДНК оштећења ни између пушача и бивших пушача (%ДНК оштећења: $56,39 \pm 9,77$ наспрам $49,40 \pm 4,83$, $t = 1,530$, $df = 21$, $p > 0,05$ и GDI: $1,46 \pm 0,15$ наспрам $1,37 \pm 0,12$, $t = 1,210$, $df = 21$, $p > 0,05$), као ни између непушача и бивших пушача (%ДНК оштећења: $56,71 \pm 6,90$ наспрам $49,40 \pm 4,83$, $t = 2,030$, $df = 10$, $p > 0,05$ и GDI: $1,51 \pm 0,13$ наспрам $1,37 \pm 0,12$, $t = 1,988$, $df = 10$, $p > 0,05$).

Пацијенти који су живели у урбаним срединама су имали незначајно већи ниво ДНК оштећења у односу на пацијенте који су живели у руралним пределима (%ДНК оштећења: $56,79 \pm 8,77$ наспрам $52,73 \pm 8,43$, $t = 1,239$, $df = 28$, $p > 0,05$ и GDI $1,46 \pm 0,15$ наспрам $1,44 \pm 0,14$, $t = 0,481$, $df = 28$, $p > 0,05$).

У погледу породичне анамнезе за КВБ, просечан %ДНК оштећења и GDI се нису значајно разликовали. Пацијенти са позитивном породичном анамнезом за КВБ

су имали незначајно већи ниво ДНК оштећења у односу на пацијенте са негативном породичном анамнезом (%ДНК оштећења: $56,30 \pm 9,89$ наспрам $53,30 \pm 5,67$, $t = 0,884$, $df = 28$, $p > 0,05$ и GDI: $1,49 \pm 0,15$ наспрам $1,39 \pm 0,11$, $t = 1,787$, $df = 28$, $p > 0,05$).

На Графикону 15 су приказани резултати просечног %ДНК оштећења и GDI у лимфоцитима периферне крви здравих особа и пацијената са СИ. Пацијенти су имали значајно већи ($p < 0,0005$) терапијом-индукован %ДНК оштећења ($55,30 \pm 8,73$) и GDI ($1,46 \pm 0,14$) у односу на контроле (%ДНК: $20,17 \pm 5,40$, $t = 18,750$, $df = 58$, $p < 0,0005$ и GDI: $0,37 \pm 0,05$, $t = 38,968$, $df = 58$, $p < 0,0005$). У поређењу са контролама, проценат ћелија без оштећења код пацијената је био око два пута мањи (79,70% према 44,70%), док је проценат ћелија са оштећењем (класе 1, 2, 3 и 4) био око 2,7 пута већи (20,26% према 55,30%).



Графикон 15. Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и здравих особа (Студентов t -тест, **** $p < 0,0005$)

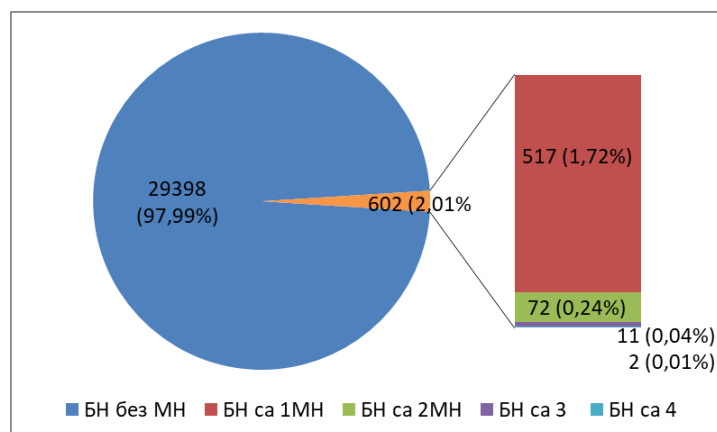
4.7. Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

У Табели 14 су дате појединачне фреквенце МН, њихова дистрибуција, фреквенце НП и НПМ, као и NDI за пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом. Фреквенца МН се кретала у опсегу од 19 до 29/1000 БН ћелија (код мушкараца од 19 до 28, а код жена од 20 до 29), а NDI од 1,21 до 1,78 (код мушкараца од 1,30 до 1,78, а код жена од 1,21 до 1,54). Код 12 пацијената су запажени НП (0-3/1000 БН ћелија), док НПМ нису уопште запажени. Најзаступљеније су биле БН ћелије са 1 МН, и то са опсегом варирања од 10 до 24 ћелије, затим БН ћелије са 2 МН (0-6 ћелија), док су БН ћелије са 3 и 4 МН биле знатно ређе заступљене.

Табела 14. Фреквенца микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

Пацијент	Старост (год.)	Пол	Анализ. БН ћел.	МН/ 1000 БН ћел.	Број БН ћел. са МН	Дистрибуција МН				НП	NDI
						1МН	2МН	3МН	4МН		
1.	65	М	1000	28	22	17	4	1	/	2	1,41
2.	52	М	1000	19	17	15	2	/	/	/	1,78
3.	53	М	1000	22	18	14	4	/	/	1	1,48
4.	60	М	1000	20	16	13	2	1	/	/	1,52
5.	49	М	1000	22	18	16	1	/	1	/	1,52
6.	61	М	1000	24	24	24	/	/	/	/	1,55
7.	53	Ж	1000	24	18	13	4	1	/	/	1,38
8.	53	М	1000	22	20	18	2	/	/	2	1,38
9.	56	М	1000	22	18	15	2	1	/	/	1,40
10.	62	М	1000	26	22	19	2	1	/	3	1,34
11.	50	М	1000	21	21	21	/	/	/	2	1,41
12.	51	М	1000	24	22	20	2	/	/	/	1,48
13.	50	М	1000	22	19	16	3	/	/	1	1,37
14.	53	Ж	1000	29	25	21	4	/	/	1	1,31
15.	57	М	1000	22	20	18	2	/	/	1	1,30
16.	54	М	1000	20	17	15	1	1	/	/	1,46
17.	50	М	1000	21	19	17	2	/	/	/	1,37
18.	68	Ж	1000	26	24	22	2	/	/	/	1,29
19.	65	Ж	1000	24	20	17	2	1	/	1	1,37
20.	66	Ж	1000	25	22	19	3	/	/	2	1,32
21.	53	Ж	1000	23	21	19	2	/	/	/	1,53
22.	67	Ж	1000	26	21	17	3	1	/	/	1,32
23.	60	Ж	1000	20	18	16	2	/	/	/	1,54
24.	58	Ж	1000	24	20	17	2	1	/	/	1,30
25.	55	Ж	1000	22	22	22	/	/	/	/	1,49
26.	60	Ж	1000	27	19	12	6	1	/	/	1,21
27.	61	Ж	1000	20	19	18	1	/	/	1	1,41
28.	60	Ж	1000	28	24	20	4	/	/	/	1,22
29.	63	Ж	1000	23	19	16	2	1	/	1	1,34
30.	50	Ж	1000	26	17	10	6	/	1	/	1,26
Опсег варирања	49-68	М/Ж	1000	19-29	16-25	10-24	0-6	0-1	0-1	0-3	1,21-1,78

Просечна терапијом-индукована фреквенца МН код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом је била $23,40 \pm 2,69$, а NDI је био $1,40 \pm 0,12$. Пирсонов коефицијент корелације је показао значајну негативну корелацију између фреквенце МН и NDI код пацијената са СИ ($r = -0,653$, $p = 0,000$). Анализом дистрибуције МН код истих пацијената је запажено да је од 30000 анализираних БН ћелија, 602 (2,01%) ћелије имало МН, од којих је 517 (1,72%) било са 1 МН, 72 (0,24%) са 2 МН, 11 (0,04%) са 3 МН и само 2 (0,01%) са 4 МН (Графикон 16).



Графикон 16. Дистрибуција бинуклеусних ћелија код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

Пацијенти старости од 49 до 59 година су имали значајно нижу просечну фреквенцу МН у односу на пацијенте старости од 60 до 68 година ($22,44 \pm 2,22$ наспрам $24,50 \pm 2,82$, $t = 2,239$, $df = 28$, $p < 0,05$), и незначајно већи просечан NDI ($1,44 \pm 0,12$ наспрам $1,36 \pm 0,11$, $t = 1,678$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Жене са дијагностикованом срчаном инсуфицијенцијом су имале значајно већу терапијом-индуковану просечну фреквенцу МН у односу на мушкарце ($24,47 \pm 2,64$ наспрам $22,33 \pm 2,35$, $t = 2,337$, $df = 28$, $p < 0,05$) и значајно нижи просечан NDI ($1,35 \pm 0,10$ наспрам $1,45 \pm 0,12$, $t = 2,468$, $df = 28$, $p < 0,05$).

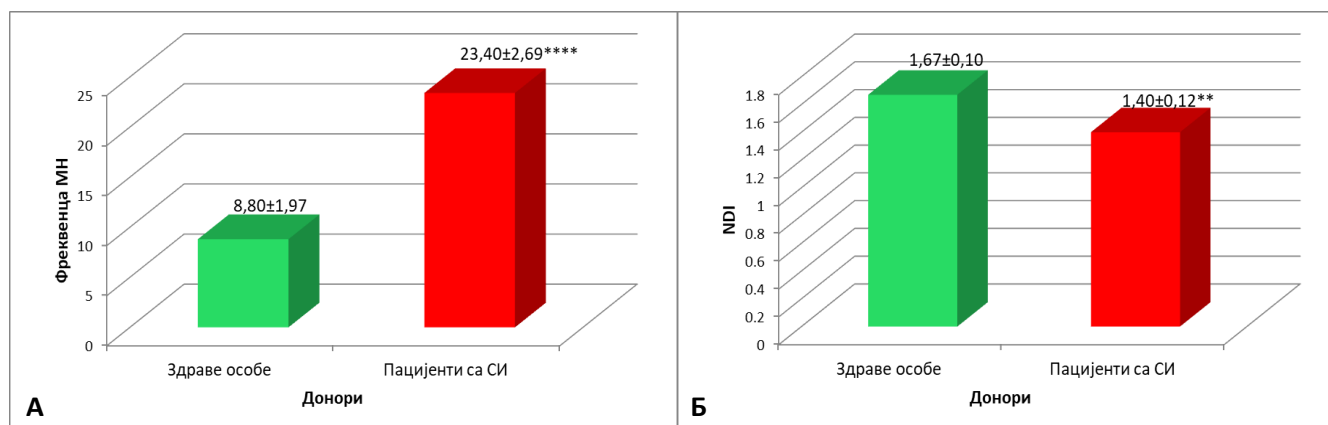
Резултати су показали да су непушачи имали значајно већу просечну фреквенцу МН у односу на пушаче ($25,14 \pm 2,04$ у односу на $22,83 \pm 2,57$, $t = 2,122$, $df = 23$, $p < 0,05$) и незначајно нижи просечан NDI ($1,32 \pm 0,10$ у односу на $1,40 \pm 0,09$, $t = 1,984$, $df = 23$, $p > 0,05$). Бивши пушачи су имали незначајно већу просечну фреквенцу МН у односу на пушаче ($23,00 \pm 2,83$ у односу на $22,83 \pm 2,57$, $t = 0,121$, $df = 21$, $p > 0,05$), али и већи NDI ($1,50 \pm 0,17$ у односу на $1,40 \pm 0,09$, $t = 1,760$, $df = 21$, $p > 0,05$), док су имали незначајно мању фреквенцу МН у односу на непушаче ($23,00 \pm 3,32$ у односу на $25,14 \pm 2,04$, $t = 1,395$, $df = 10$, $p > 0,05$) и значајно већи NDI ($1,50 \pm 0,17$ у односу на $1,32 \pm 0,10$, $t = 2,275$, $df = 10$, $p < 0,05$).

Пацијенти који су живели у сеоским подручјима су имали незначајно нижу просечну фреквенцу МН у односу на пацијенте који су живели у градским подручјима ($23,09 \pm 3,05$ наспрам $23,58 \pm 2,52$, $t = 0,473$, $df = 28$, $p > 0,05$), и незначајно виши NDI ($1,41 \pm 0,09$ наспрам $1,40 \pm 0,14$, $t = 0,308$, $df = 28$, $p > 0,05$).

Пацијенти са дијагностикованом СИ и позитивном породичном анамнезом за КВБ су имали значајно већу просечну фреквенцу МН у односу на пацијенте са негативном породичном анамнезом ($24,00 \pm 2,92$ у односу на $22,20 \pm 1,69$, $t = 2,135$, $df = 28$, $p < 0,05$) и значајно нижи NDI ($1,37 \pm 0,10$ наспрам $1,47 \pm 0,14$, $t = 2,392$, $df = 28$, $p < 0,05$).

Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом су имали значајно веће просечне фреквенце МН у односу на здраве особе ($23,40 \pm 2,69$ у односу на $8,80 \pm 1,97$; $t =$

23,999, $df = 58$, $p < 0,0005$) и нижи просечан NDI ($1,40 \pm 0,12$ у односу на $1,67 \pm 0,10$; $t = 9,490$, $df = 58$, $p < 0,01$), Графикон 17. Број БН ћелија са 1 МН је скоро за 2,5 пута био више заступљен код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом него код здравих особа.



Графикон 17. Просечне фреквенце микронуклеуса (А) и индекса нуклеусне деобе (Б) у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и здравих особа (Студентов t -тест, $^{**} p < 0,01$, $^{****} p < 0,0005$)

Резултати биваријатне корелације и анализе вишеструке линеарне регресије за пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом су приказани у Табели 15. Анализом биваријатне корелације утврђене су значајне корелације између нивоа ДНК оштећења/хромозомских аберација и здравственог стања, редуковане EF, крвног притиска, породичне анамнезе за КВБ, биохемијских параметара (холестерол, LDL, триглицериди, тропонин, proBNP, уреа, креатинин, CRP, глукоза, СК и К), терапије лековима (АСЕ-инхибитори, бета блокатори, двојна антиагрегациона терапија, диуретици, статини и антикоагулант), као и дужине узимања терапије за КВБ.

Коришћењем мултиваријабилне регресионе анализе здравствено стање (срчана инсуфицијенција), EF, повишени срчани маркери (тропонин и proBNP), повишени лабораторијски параметри попут LDL-а, урее, креатинина, CRP, глукозе, као и терапија лековима из групе АСЕ-инхибитора су се показали као предиктори ДНК оштећења и хромозомских аберација код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, док остале променљиве нису биле статистички значајне.

Табела 15. Биваријантна корелациона и мултиваријабилна регресиона анализа као предиктори геномских оштећења код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

Променљиве	Биваријантна корелациона анализа						Мултиваријабилна регресиона анализа					
	%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса		%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса	
	г	р	г	р	г	р	β	р	β	р	β	р
Старост	0,176	0,227	0,048	0,743	0,116	0,428	0,195	0,076	0,055	0,117	0,125	0,061
Пол	0,036	0,805	0,005	0,972	0,067	0,649	0,006	0,919	0,011	0,752	0,093	0,065
СИ	0,914	0,000	0,977	0,000	0,951	0,000	0,876	0,000	0,931	0,000	0,936	0,000
Ејекциона фракција	-0,941	0,000	-0,976	0,000	-0,933	0,000	-0,722	0,001	-0,976	0,000	0,933	0,000
Крвни притисак												
Систолни	0,517	0,000	0,543	0,000	0,513	0,000	0,122	0,321	0,044	0,542	0,006	0,953
Дијастолни	0,529	0,000	0,555	0,000	0,500	0,000	-0,040	0,722	0,018	0,787	0,047	0,595
Породична анамнеза за КВБ	0,605	0,000	0,613	0,000	0,624	0,000	0,008	0,923	0,034	0,467	0,004	0,955
Пушење	-0,151	0,300	-0,112	0,445	-0,145	0,321	-0,025	0,673	0,014	0,687	-0,022	-0,468
Пребивалиште	0,099	0,507	0,082	0,585	0,120	0,423	0,060	0,324	0,016	0,661	0,092	0,061
Лабораторијски параметри												
Холестерол	0,308	0,077	0,405	0,018	0,381	0,026	-0,108	0,447	-0,035	0,749	-0,004	0,975
HDL	-0,073	0,711	0,009	0,964	-0,014	0,943	-0,048	0,719	0,089	0,538	0,117	0,415
LDL	0,689	0,000	0,640	0,000	0,589	0,001	0,477	0,006	0,425	0,020	0,377	0,034
Триглицериди	0,555	0,001	0,629	0,000	0,579	0,000	-0,035	0,844	0,050	0,720	-0,107	0,513
Тропонин	0,346	0,051	0,361	0,046	0,339	0,057	0,391	0,007	0,353	0,003	0,393	0,004
proBNP	0,495	0,001	0,493	0,001	0,382	0,016	-1,604	0,004	-1,410	0,001	-1,826	0,001
Уреа	0,350	0,029	0,384	0,016	0,329	0,041	0,747	0,019	0,731	0,005	0,887	0,004
Креатинин	0,488	0,002	0,460	0,003	0,404	0,011	1,356	0,000	1,144	0,000	1,339	0,000
CRP	0,681	0,000	0,667	0,000	0,698	0,000	0,461	0,004	0,555	0,002	0,649	0,000
Глукоза	0,433	0,000	0,470	0,003	0,411	0,011	0,507	0,002	0,495	0,000	0,558	0,000
СК	0,262	0,112	0,325	0,046	0,297	0,070	0,892	0,124	0,687	0,129	1,082	0,045
СК-MB	0,219	0,194	0,291	0,081	0,284	0,089	-0,524	0,310	-0,303	0,449	-0,603	0,201
Na	0,189	0,292	0,174	0,334	0,179	0,319	0,121	0,377	0,072	0,626	0,064	0,655
K	0,419	0,015	0,415	0,016	0,440	0,010	0,073	0,676	-0,025	0,893	-0,098	0,595

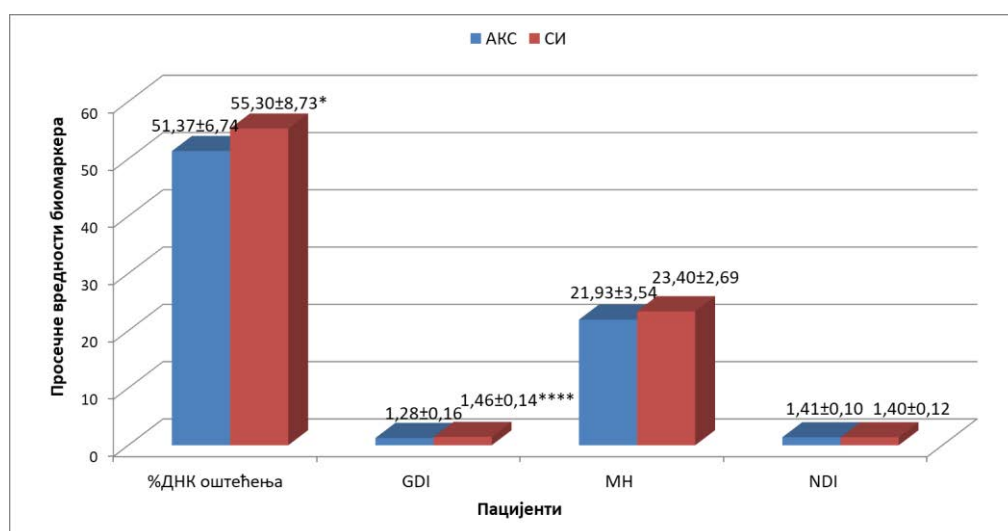
Наставак табеле 15

Променљиве	Биваријантна корелациона анализа						Мултиваријабилна регресиона анализа					
	%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса		%ДНК оштећења		Индекс генетичког оштећења		Фреквенца микронуклеуса	
	г	р	г	р	г	р	β	р	β	р	β	р
Терапија лековима												
АСЕ-инхибитори	-0,925	0,000	-0,977	0,000	-0,951	0,000	-1,198	0,002	-0,989	0,000	-0,834	0,005
Бета блокатори	-0,874	0,000	-0,934	0,000	-0,906	0,000	0,165	0,438	0,027	0,818	0,059	0,954
Двојна антиагрегациона	-0,812	0,000	-0,864	0,000	-0,829	0,000	0,012	0,926	-0,023	0,746	0,010	0,917
Диуретици	-0,884	0,000	-0,939	0,000	-0,929	0,000	0,056	0,791	-0,027	0,820	-0,140	0,384
Статини	-0,612	0,000	-0,656	0,000	-0,644	0,000	0,048	0,576	0,020	0,674	-0,010	0,885
Антикоагуланти	-0,538	0,000	-0,560	0,000	-0,504	0,000	0,031	0,685	0,029	0,497	0,112	0,096
Дужина узимања терапије	0,439	0,005	0,433	0,006	0,472	0,002	0,439	0,005	0,099	0,021	0,151	0,009

4.8. Упоредна анализа нивоа ДНК оштећења и хромозомских аберација код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом

Пацијенти са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом имају значајно већи просечан %ДНК оштећења, GDI и МН, а значајно нижи NDI у односу на здраве особе. Међутим, на Графикону 18 су приказани упоредни резултати нивоа ДНК оштећења и хромозомских аберација у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом.

Просечан %ДНК оштећења и GDI значајно су били већи у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом у односу на пацијенте са акутним коронарним синдромом (%ДНК оштећења: $55,30 \pm 8,73$ у односу на $51,37 \pm 6,74$; $t = 1,954$, $df = 58$, $p < 0,05$; GDI: $1,46 \pm 0,14$ наспрам $1,28 \pm 0,16$; $t = 4,412$, $df = 58$, $p < 0,0005$). Фреквенца МН је била незначајно већа код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, док је просечан NDI био приближно исти (Фреквенца МН: $23,40 \pm 2,69$ наспрам $21,93 \pm 3,54$, $t = 1,850$, $df = 54,102$, $p > 0,05$ и NDI: $1,40 \pm 0,12$ наспрам $1,41 \pm 0,10$, $t = 0,166$, $df = 58$, $p > 0,05$).



Графикон 18. Ниво геномске нестабилности код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом (Студентов t -тест, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0005$)

Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом имали су значајно већи просечан %ДНК оштећења, GDI и МН, али незначајно нижи NDI у односу на пацијенте са нестабилном ангином пекторис (%ДНК оштећења: $55,30 \pm 8,73$ наспрам $49,53 \pm 5,90$, $t = 2,302$, $df = 43$, $p < 0,05$; GDI: $1,46 \pm 0,14$ наспрам $1,27 \pm 0,12$, $t = 4,256$, $df = 43$, $p < 0,0005$; МН: $23,40 \pm 2,69$ наспрам $21,20 \pm 3,23$, $t = 2,419$, $df = 43$, $p < 0,05$; NDI: $1,40 \pm 0,12$ наспрам $1,46 \pm 0,08$, $t = 1,596$, $df = 43$, $p > 0,05$). Међутим, у односу на пацијенте са акутним инфарктом миокарда, пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом су имали незначајно већи просечан %ДНК оштећења, МН и NDI (%ДНК оштећења: $53,20 \pm 7,22$ наспрам $55,30 \pm 8,73$, $t = 0,803$, $df = 43$, $p > 0,05$; МН: $22,60 \pm 3,79$ наспрам $23,40 \pm 2,69$, $t = 0,818$, $df = 43$, $p > 0,05$; NDI: $1,36 \pm 0,09$ наспрам $1,40 \pm 0,12$, $p > 0,05$), као и значајно већи GDI ($1,27 \pm 3,79$ наспрам $1,46 \pm 0,14$, $t = 3,132$, $df = 43$, $p < 0,001$).

4.9. Ефекат гљиве на терапијом-индуковано геномско оштећење у лимфоцитима периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима

За испитивање генотоксичног потенцијала гљиве *L. betulinus* код здравих особа, коришћене су исте концентрације (50, 100, 150 и 200 µg/ml) ацетонског, воденог и етанолног екстракта. Као контролни третмани, коришћене су нетретиране ћелије (негативна контрола) и ћелије које су третиране само H₂O₂-ом (позитивна контрола).

У Табели 16 су приказани резултати појединачних вредности нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа након третмана ацетонским, воденим и етанолним екстрактом гљиве. У односу на негативну контролу, при дејству најниже концентрације ацетонског екстракта дошло је до незначајног повећања %ДНК оштећења са опсегом варирања од 11 до 30% и GDI-а са опсегом варирања од 0,28 до 0,49, док је при највишој концентрацији опсег варирања %ДНК оштећења био од 15 до 34% и GDI од 0,37 до 0,58. При најнижој концентрацији воденог екстракта дошло је до повећања %ДНК оштећења и то са опсегом варирања од 12 до 30% и GDI-а са опсегом од 0,30 до 0,52, док је при дејству највише испитиване концентрације опсег варирања %ДНК оштећења био од 20 до 36%, а GDI од 0,38 до 0,64. Ниво ДНК оштећења, при третману различитих концентрација етанолног екстракта се постепено повећавао у односу на негативну контролу. При концентрацији од 50 µg/ml, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 12 до 32%, а GDI од 0,31 до 0,52, док је при дејству концентрације од 200 µg/ml %ДНК оштећења био у опсегу варирања од 15 до 40%, а GDI од 0,41 до 0,73.

Анализом дистрибуције класа комета, уочено је да су након дејства свих тестираних концентрација ацетонског екстракта најзаступљеније биле класе комета 0. При концентрацији од 50 µg/ml опсег варирања ћелија без оштећења је био од 70 до 89%, а при концентрацији од 200 µg/ml опсег варирања је био од 66 до 85% (Графикон 19). Ћелије без оштећења су биле најзаступљеније и након третмана воденим екстрактом, у свим испитиваним концентрацијама. При најнижој концентрацији воденог екстракта, опсег варирања ћелија без оштећења је био од 68 до 88%, а ћелија са оштећењем од 0 до 7%, док је при највишој концентрацији опсег варирања ћелија без оштећења био од 64 до 80%, а ћелија са оштећењем од 1 до 7% (Графикон 20). Са повећањем концентрација етанолног екстракта, повећавао се и проценат ћелија са оштећењем, али су ипак најзаступљеније биле ћелије без оштећења са опсегом варирања од 68 до 88% при најнижој концентрацији и од 60 до 85% при највишој концентрацији (Графикон 21).

Табела 16. Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)

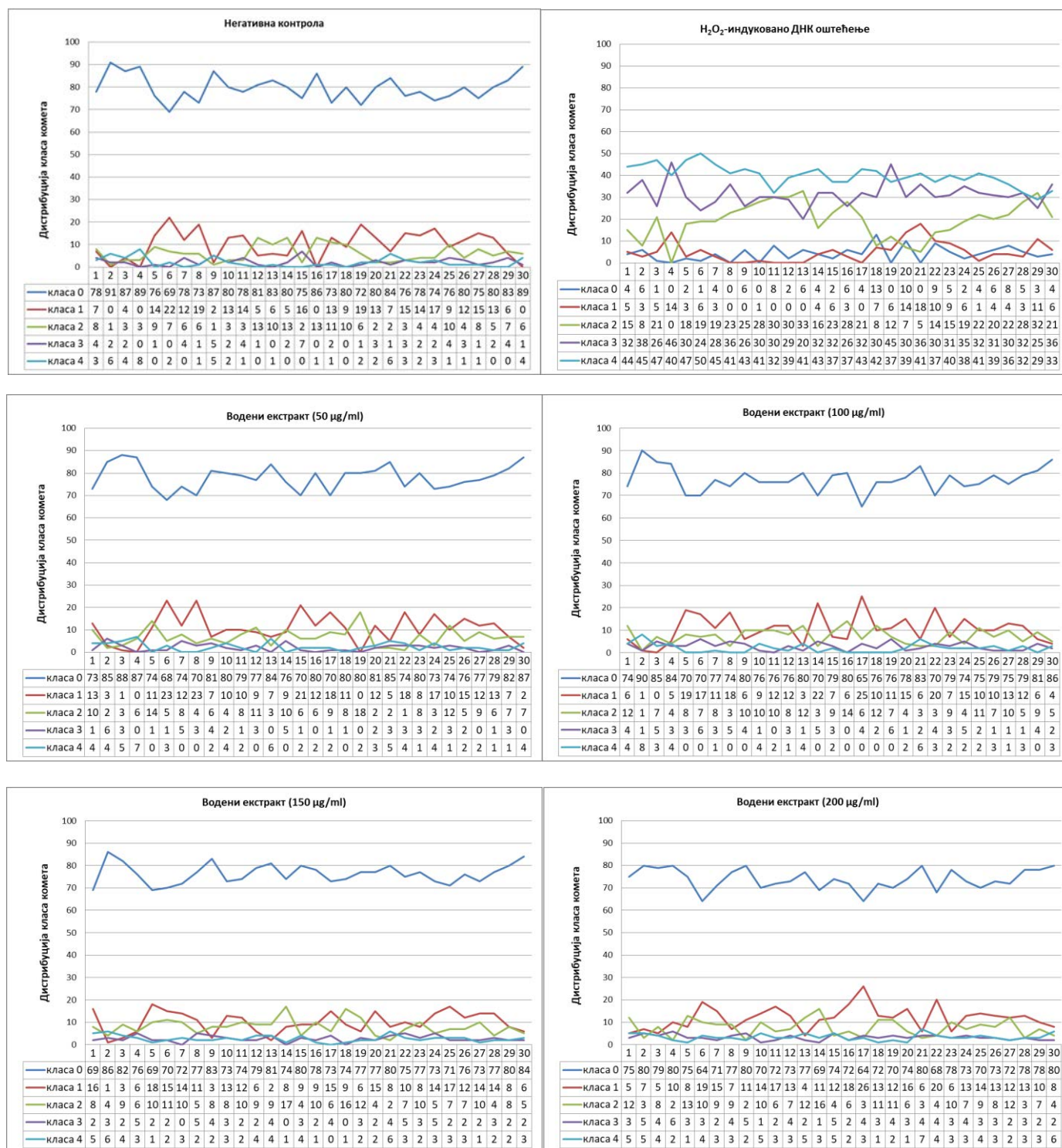
	Ниво ДНК оштећења	Негативна контрола	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
1.	%ДНК	22	96	20	23	25	28	27	26	31	25	25	29	33	40
	GDI	0,47	3,07	0,49	0,53	0,51	0,58	0,52	0,58	0,58	0,58	0,50	0,59	0,59	0,73
2.	%ДНК	9	94	14	22	24	24	15	10	14	20	13	16	20	20
	GDI	0,32	3,13	0,34	0,42	0,42	0,48	0,41	0,38	0,42	0,48	0,34	0,43	0,48	0,51
3.	%ДНК	13	99	12	13	22	27	12	15	18	21	19	20	22	24
	GDI	0,32	3,13	0,38	0,41	0,51	0,49	0,36	0,41	0,43	0,49	0,38	0,42	0,47	0,59
4.	%ДНК	11	100	16	13	21	23	13	16	24	20	22	20	24	32
	GDI	0,38	3,12	0,35	0,40	0,46	0,51	0,40	0,42	0,47	0,50	0,41	0,47	0,50	0,56
5.	%ДНК	24	98	27	31	36	33	26	30	31	25	20	18	27	25
	GDI	0,35	3,17	0,36	0,44	0,51	0,52	0,42	0,44	0,48	0,47	0,39	0,40	0,48	0,50
6.	%ДНК	31	99	28	28	29	34	32	30	30	36	32	35	30	33
	GDI	0,44	3,16	0,46	0,47	0,49	0,56	0,48	0,49	0,51	0,64	0,51	0,56	0,56	0,65
7.	%ДНК	22	96	24	23	23	28	26	23	28	29	21	26	27	33
	GDI	0,36	3,05	0,39	0,38	0,40	0,49	0,43	0,43	0,46	0,51	0,38	0,46	0,48	0,59
8.	%ДНК	23	100	22	30	29	30	30	26	23	23	31	27	30	34
	GDI	0,38	3,18	0,36	0,40	0,43	0,50	0,40	0,39	0,44	0,49	0,40	0,40	0,46	0,57
9.	%ДНК	13	94	12	18	19	25	19	20	17	20	29	26	31	30
	GDI	0,39	3,00	0,38	0,42	0,45	0,57	0,39	0,38	0,39	0,38	0,40	0,46	0,54	0,55
10.	%ДНК	20	100	20	23	22	21	20	24	27	30	24	17	21	38
	GDI	0,33	3,11	0,32	0,34	0,37	0,40	0,40	0,48	0,50	0,57	0,37	0,37	0,47	0,55
11.	%ДНК	22	92	24	22	20	17	21	24	26	28	30	28	23	26
	GDI	0,36	3,18	0,38	0,40	0,40	0,41	0,37	0,40	0,46	0,47	0,38	0,42	0,42	0,46
12.	%ДНК	19	98	20	22	26	25	23	24	21	27	15	21	20	30
	GDI	0,34	3,03	0,29	0,35	0,41	0,48	0,40	0,41	0,46	0,51	0,34	0,38	0,38	0,54
13.	%ДНК	17	94	15	17	17	22	16	20	19	23	20	24	24	25
	GDI	0,30	2,90	0,28	0,32	0,34	0,37	0,37	0,46	0,48	0,54	0,40	0,44	0,44	0,45
14.	%ДНК	20	96	17	20	20	25	24	30	26	31	26	24	19	25
	GDI	0,37	3,04	0,35	0,39	0,39	0,42	0,44	0,43	0,46	0,58	0,36	0,41	0,47	0,54
15.	%ДНК	25	98	24	26	28	31	30	21	20	26	32	35	30	37
	GDI	0,41	2,96	0,42	0,42	0,50	0,54	0,44	0,42	0,42	0,55	0,52	0,54	0,53	0,57
16.	%ДНК	14	94	17	15	21	18	20	20	22	28	20	24	20	29
	GDI	0,30	2,85	0,33	0,34	0,42	0,43	0,32	0,34	0,39	0,44	0,37	0,44	0,41	0,55

Наставак Табеле 16

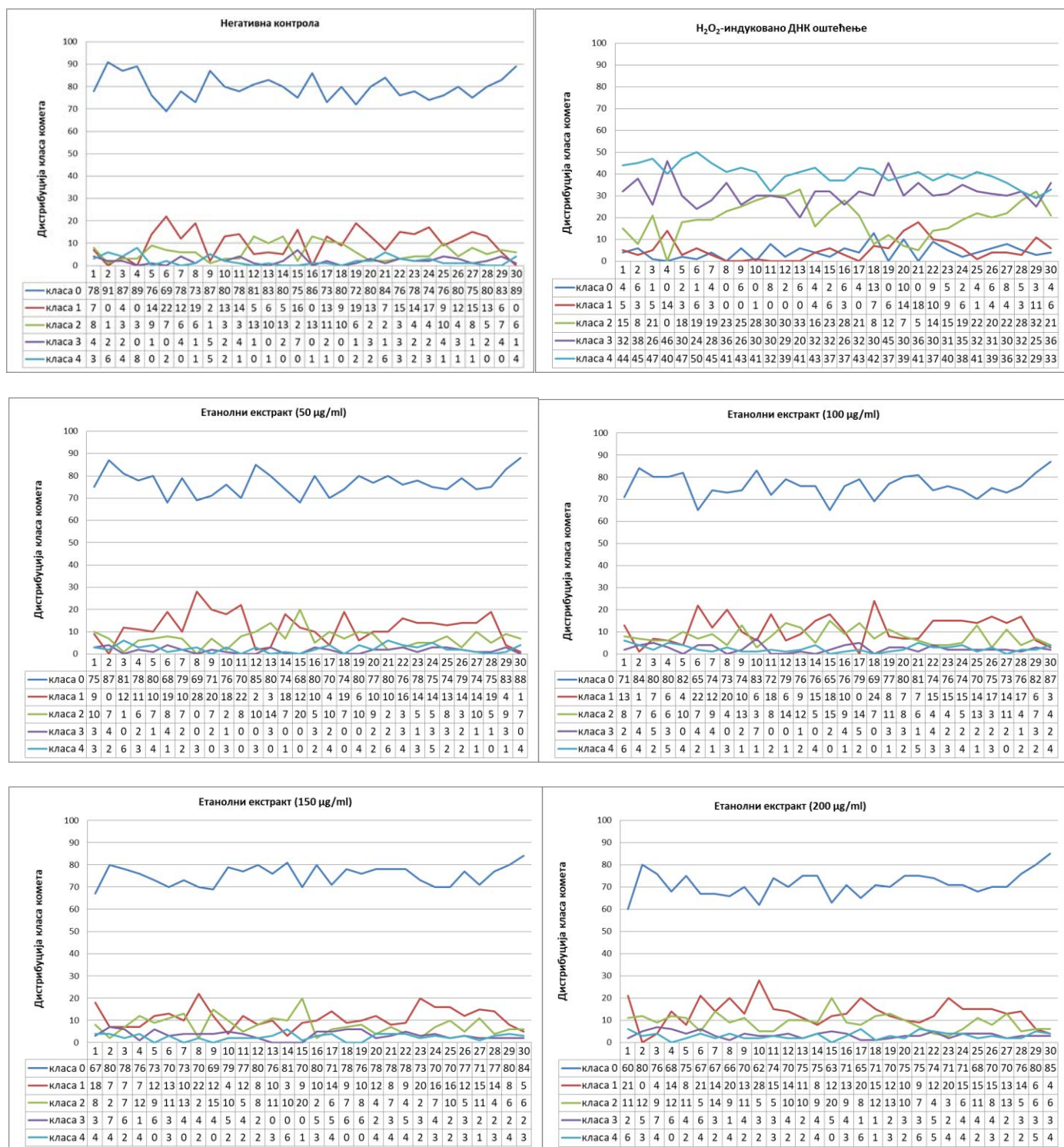
	Ниво ДНК оштећења	Негативна контрола	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
17.	%ДНК	27	96	30	27	33	30	30	35	27	36	30	21	29	35
	GDI	0,45	3,10	0,48	0,48	0,50	0,54	0,47	0,49	0,51	0,56	0,46	0,51	0,57	0,63
18.	%ДНК	20	87	23	17	20	21	20	24	26	28	26	31	22	29
	GDI	0,29	2,81	0,31	0,33	0,35	0,41	0,30	0,40	0,45	0,48	0,33	0,38	0,41	0,46
19.	%ДНК	28	100	30	24	25	27	20	24	23	20	20	23	24	30
	GDI	0,42	3,13	0,36	0,42	0,46	0,48	0,44	0,49	0,47	0,54	0,42	0,43	0,50	0,56
20.	%ДНК	20	90	20	23	21	20	19	22	23	26	23	20	22	25
	GDI	0,31	2,74	0,32	0,36	0,39	0,40	0,34	0,34	0,37	0,41	0,42	0,40	0,42	0,47
21.	%ДНК	16	100	13	15	19	19	15	17	20	20	20	19	22	25
	GDI	0,38	3,00	0,35	0,37	0,45	0,47	0,38	0,42	0,48	0,52	0,44	0,42	0,47	0,56
22.	%ДНК	24	91	25	25	27	27	26	30	25	32	24	26	22	26
	GDI	0,42	2,76	0,44	0,48	0,49	0,49	0,45	0,50	0,51	0,56	0,47	0,47	0,48	0,55
23.	%ДНК	22	95	21	22	24	25	20	21	23	22	22	24	27	29
	GDI	0,36	2,92	0,35	0,37	0,39	0,41	0,37	0,42	0,45	0,47	0,39	0,41	0,41	0,48
24.	%ДНК	26	98	27	28	29	30	27	26	27	27	25	26	30	29
	GDI	0,43	3,01	0,45	0,47	0,48	0,52	0,45	0,46	0,51	0,51	0,45	0,47	0,54	0,55
25.	%ДНК	24	96	25	27	28	30	26	25	29	30	26	30	30	32
	GDI	0,45	3,05	0,43	0,49	0,48	0,57	0,47	0,46	0,49	0,57	0,46	0,50	0,50	0,57
26.	%ДНК	20	94	22	20	21	24	24	21	24	27	21	25	23	30
	GDI	0,33	2,93	0,31	0,34	0,38	0,41	0,39	0,39	0,44	0,50	0,34	0,41	0,43	0,53
27.	%ДНК	25	92	23	26	27	26	23	25	27	28	26	27	29	30
	GDI	0,38	2,82	0,36	0,41	0,41	0,43	0,38	0,40	0,44	0,50	0,41	0,42	0,47	0,53
28.	%ДНК	20	95	20	22	23	25	21	21	23	22	25	24	23	24
	GDI	0,29	2,83	0,31	0,33	0,39	0,41	0,32	0,37	0,39	0,40	0,32	0,36	0,40	0,41
29.	%ДНК	17	97	20	20	21	23	18	19	20	22	17	18	20	20
	GDI	0,32	2,66	0,37	0,38	0,41	0,41	0,34	0,36	0,38	0,42	0,35	0,37	0,42	0,47
30.	%ДНК	11	96	11	12	13	15	13	14	16	20	12	13	16	15
	GDI	0,31	2,88	0,28	0,31	0,35	0,38	0,32	0,32	0,34	0,46	0,31	0,33	0,35	0,41
Опсег варирања	%ДНК	9-31	87-100	11-30	12-31	13-36	15-34	12-32	10-35	14-31	20-36	12-32	13-35	16-33	15-40
	GDI	0,29-0,47	2,66-3,18	0,28-0,49	0,31-0,53	0,34-0,51	0,37-0,58	0,30-0,52	0,32-0,58	0,34-0,58	0,38-0,64	0,31-0,52	0,33-0,59	0,35-0,59	0,41-0,73



Графикон 19. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus* in vitro



Графикон 20. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus* in vitro



Графикон 21. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus* *in vitro*

У односу на негативну контролу, просечан %ДНК оштећења и GDI у третираним ћелијским културама здравих донора су се постепено повећавали са повећањем концентрације три испитана екстракта, али без статистичке значајности. Просечан %ДНК оштећења у односу на концентрацију екстракта се кретао од $20,73 \pm 5,33$ до $25,10 \pm 4,69$ након третмана ацетонским екстрактом, од $21,87 \pm 5,47$ до $25,73 \pm 4,65$ након дејства воденог екстракта и од $23,20 \pm 5,25$ до $28,67 \pm 5,52$ након третмана етанолним екстрактом. Просечан GDI се кретао у опсегу од $0,37 \pm 0,06$ до $0,47 \pm 0,07$ након третмана са различитим концентрацијама ацетонског екстракта, од $0,40 \pm 0,05$ до $0,50 \pm 0,06$ након третмана воденим екстрактом и од $0,40 \pm 0,06$ до $0,54 \pm 0,07$ након третмана етанолним екстрактом (Табела 17). Пирсонов коефицијент корелације је показао позитивну статистички значајну корелацију између концентрација екстракта и %ДНК оштећења ($r = 0,343$, $p = 0,000$ за ацетонски екстракт; $r = 0,344$, $p = 0,000$ за водени екстракт; $r = 0,452$, $p = 0,000$ за етанолни екстракт), као и између концентрација екстракта и GDI-а ($r = 0,565$, $p = 0,000$ за ацетонски екстракт; $r = 0,652$, $p = 0,000$ за водени екстракт; $r = 0,701$, $p = 0,000$ за етанолни екстракт).

Табела 17. Просечне вредности нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа након третмана различитим концентрацијама ацетонског, воденог и етанолног екстракта гљиве *Lenzites betulinus in vitro*

Третман ($\mu\text{g/ml}$)	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
	0	1	2	3	4		
Негативна контрола	79,70 $\pm$ 5,52	10,03 $\pm$ 6,26	6,10 $\pm$ 3,69	2,13 $\pm$ 1,70	2,00 $\pm$ 2,10	20,17$\pm$5,40	0,37$\pm$0,05
<i>Ацетонски екстракт</i>							
50	79,27 $\pm$ 5,33	10,83 $\pm$ 6,63	6,03 $\pm$ 3,43	2,10 $\pm$ 1,79	1,87 $\pm$ 1,76	20,73$\pm$5,33	0,37$\pm$0,06
100	78,20 $\pm$ 5,09	10,17 $\pm$ 5,91	6,93 $\pm$ 4,27	2,67 $\pm$ 1,37	2,00 $\pm$ 1,74	21,80$\pm$2,09	0,39$\pm$0,05
150	76,23 $\pm$ 4,83	11,50 $\pm$ 5,20	7,53 $\pm$ 3,17	2,73 $\pm$ 1,39	2,07 $\pm$ 1,53	23,77$\pm$4,83	0,43$\pm$0,05
200	74,93 $\pm$ 4,69	11,57 $\pm$ 4,15	7,80 $\pm$ 3,09	3,13 $\pm$ 1,22	2,57 $\pm$ 1,61	25,10$\pm$4,69	0,47$\pm$0,07
<i>Водени екстракт</i>							
50	78,13 $\pm$ 5,47	10,63 $\pm$ 6,26	6,77 $\pm$ 3,85	2,00 $\pm$ 1,64	2,43 $\pm$ 1,92	21,87$\pm$5,47	0,40$\pm$0,05
100	77,23 $\pm$ 5,37	10,60 $\pm$ 6,20	7,37 $\pm$ 3,34	2,83 $\pm$ 1,74	2,00 $\pm$ 1,96	22,77$\pm$5,37	0,42$\pm$0,06
150	76,33 $\pm$ 4,40	10,07 $\pm$ 4,67	8,03 $\pm$ 3,40	2,67 $\pm$ 1,40	2,67 $\pm$ 1,45	23,67$\pm$4,40	0,45$\pm$0,05
200	73,93 $\pm$ 4,59	11,93 $\pm$ 5,03	5,57 $\pm$ 3,71	3,20 $\pm$ 1,21	3,33 $\pm$ 1,47	25,73$\pm$4,65	0,50$\pm$0,06
<i>Етанолни екстракт</i>							
50	76,80 $\pm$ 5,25	12,07 $\pm$ 6,73	7,07 $\pm$ 3,97	1,60 $\pm$ 1,33	2,37 $\pm$ 1,77	23,20$\pm$5,25	0,40$\pm$0,06
100	76,10 $\pm$ 5,25	11,30 $\pm$ 6,22	7,90 $\pm$ 3,59	2,33 $\pm$ 1,77	2,37 $\pm$ 1,59	23,90$\pm$5,25	0,44$\pm$0,06
150	75,33 $\pm$ 4,39	11,07 $\pm$ 4,49	7,73 $\pm$ 4,14	3,37 $\pm$ 1,92	2,50 $\pm$ 1,55	24,67$\pm$4,39	0,47$\pm$0,05
200	71,33 $\pm$ 5,52	13,20 $\pm$ 5,83	9,13 $\pm$ 3,63	3,43 $\pm$ 1,50	3,07 $\pm$ 1,60	28,67$\pm$5,52	0,54$\pm$0,07

Појединачне вредности нивоа ДНК оштећења (%ДНК оштећења и GDI) у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након третмана различитим концентрацијама (50, 100, 150 и 200 $\mu\text{g/ml}$) ацетонског, воденог и етанолног екстракта приказане су у Табели 18.

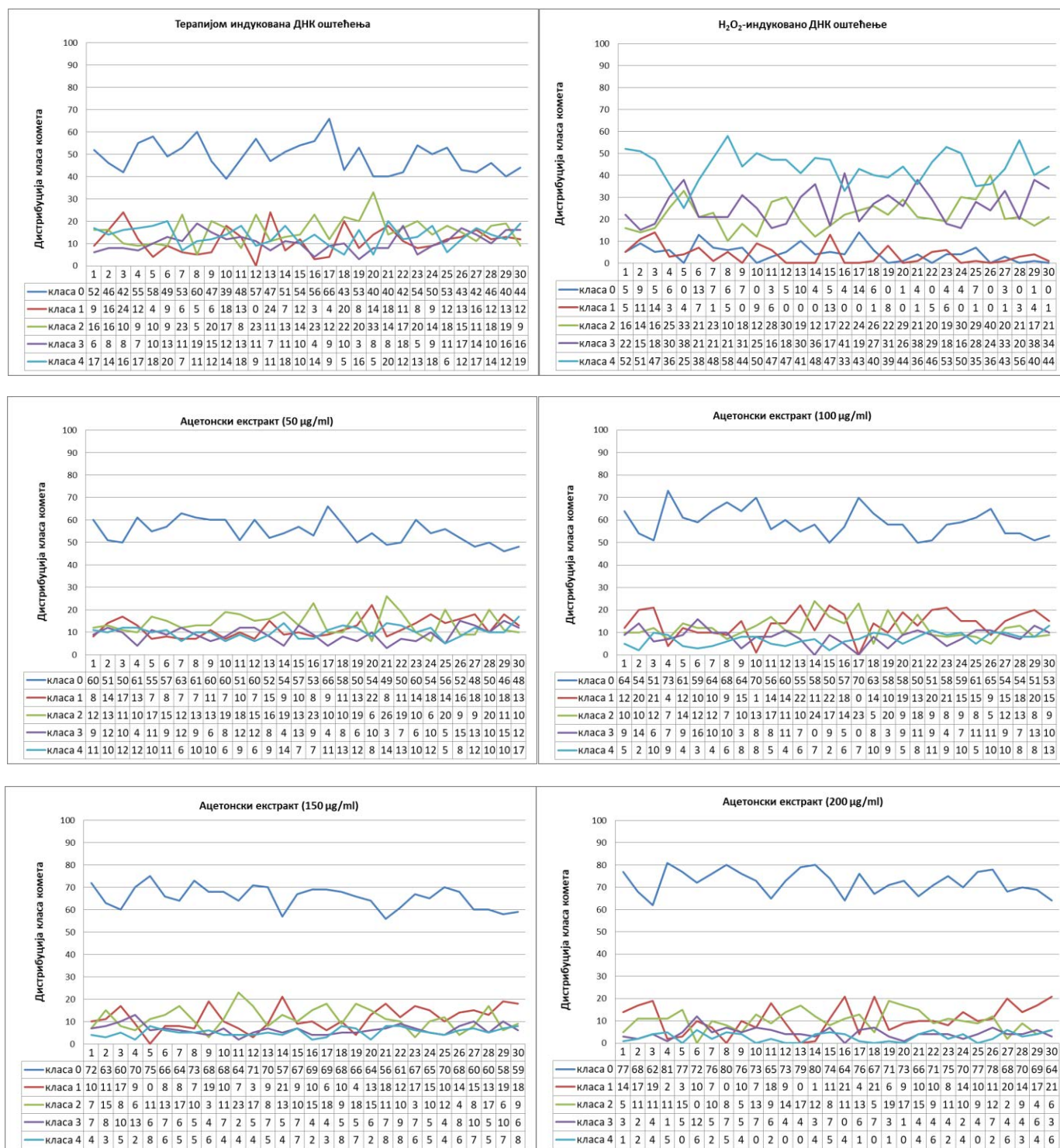
Код пацијената са терапијом-индукованим ДНК оштећењем, %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 34 до 61%, а GDI је био у опсегу од 0,91 до 1,54. Резултати су показали да се са повећањем концентрације ацетонског екстракта постепено редуковао ниво терапијом-индукованих ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената *in vitro*, где је %ДНК оштећења при највишој концентрацији био у опсегу варирања од 19 до 38%, а GDI од 0,40 до 0,70. При деловању концентрације од 50 $\mu\text{g/ml}$ воденог екстракта, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 35 до 60%, а GDI од 0,96 до 1,47, док је при концентрацији од 200 $\mu\text{g/ml}$ %ДНК оштећења био у опсегу варирања од 19 до 42%, а GDI од 0,49 до 0,88. Са повећањем концентрација етанолног екстракта, %ДНК оштећења и GDI су се редуковали. При најнижој концентрацији %ДНК оштећења је био у опсегу од 40 до 60%, а GDI од 1,02 до 1,49, док је при деловању највише концентрације %ДНК оштећења био у рангу од 21 до 47%, а GDI од 0,51 до 0,95.

Анализом дистрибуције класа комета, запажено је да се са порастом концентрација екстракта повећавао и проценат ћелија без оштећења. Највећи проценат ћелија без оштећења је запажен након третмана ћелија ацетонским екстрактом гљиве, са опсегом варирања од 46 до 66% при концентрацији од 50 $\mu\text{g/ml}$ и од 62 до 81% при концентрацији од 200 $\mu\text{g/ml}$ (Графикон 22). При дејству различитих концентрација воденог екстракта, проценат ћелија без оштећења је био најприсутнији и то при најнижој концентрацији је био у опсегу варирања од 40 до 65%, а при највишој концентрацији од 58 до 81% (Графикон 23). При најнижој концентрацији етанолног екстракта, проценат ћелија без оштећења је био у опсегу варирања од 40 до 60%, а при највишој концентрацији је био у опсегу варирања од 53 до 79% (Графикон 24).

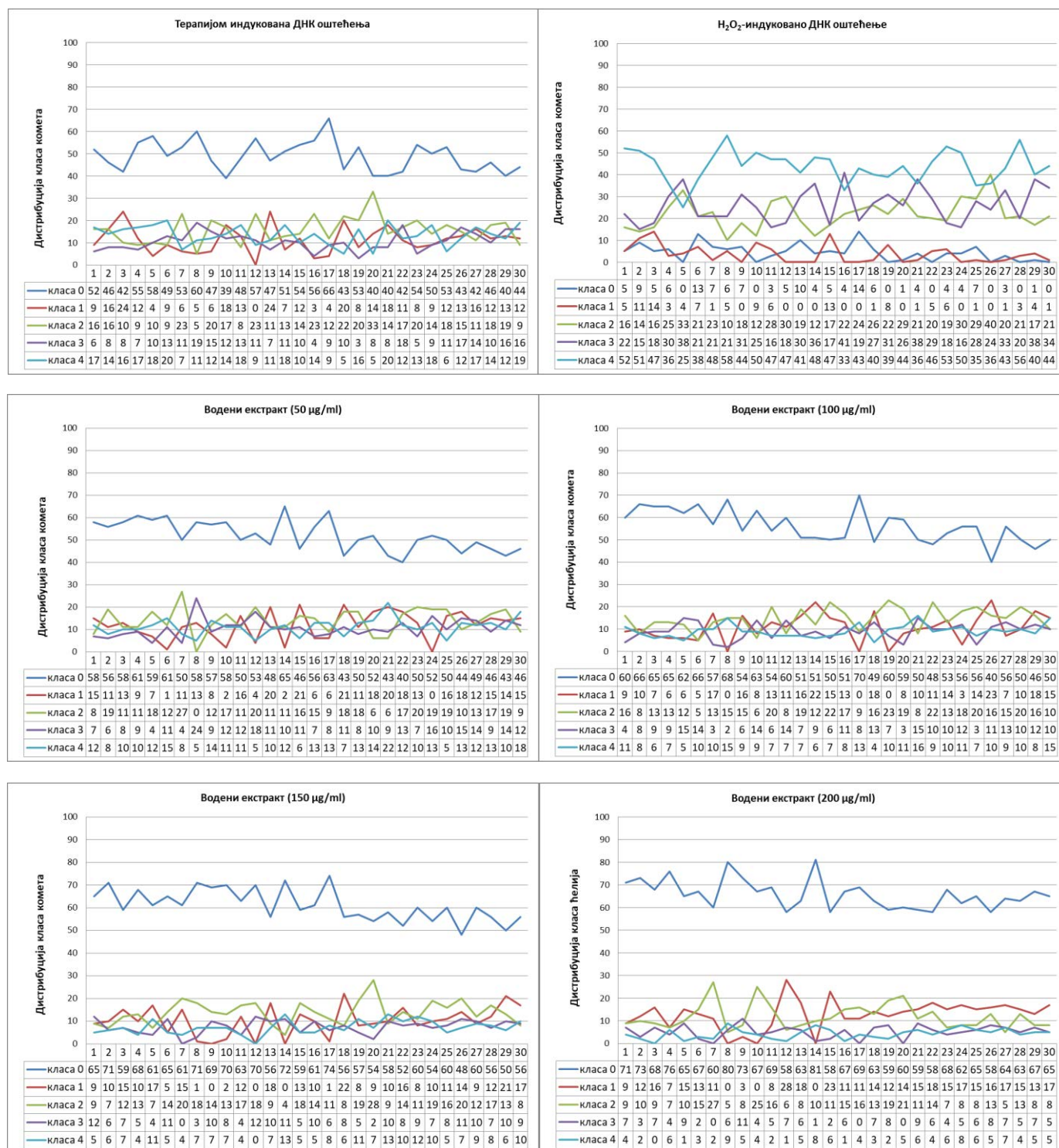
Табела 18. Терапијом-индуковани ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)

	Ниво ДНК оштећења	Th индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
1.	%ДНК	48	95	40	36	28	23	42	40	35	29	41	48	40	33
	GDI	1,27	3,11	1,03	0,79	0,61	0,49	1,00	0,97	0,83	0,64	1,05	0,83	0,84	0,80
2	%ДНК	58	95	50	49	40	38	42	35	41	32	47	43	35	23
	GDI	1,32	3,08	1,17	1,03	0,83	0,69	0,99	0,84	0,84	0,55	1,03	0,96	0,70	0,51
3.	%ДНК	45	94	39	27	30	19	39	35	32	24	42	48	34	35
	GDI	1,19	2,87	0,93	0,75	0,68	0,47	0,98	0,87	0,67	0,57	1,11	0,99	0,71	0,68
4.	%ДНК	42	100	45	39	25	23	41	38	39	35	45	40	30	23
	GDI	1,26	2,84	1,14	0,83	0,72	0,48	1,03	0,95	0,87	0,66	1,08	0,87	0,79	0,57
5.	%ДНК	47	93	37	36	36	24	50	43	39	40	47	42	32	25
	GDI	1,13	3,02	0,91	0,80	0,80	0,50	1,09	0,92	0,71	0,73	1,11	0,96	0,77	0,55
6.	%ДНК	43	95	40	40	29	27	47	40	30	42	47	40	34	27
	GDI	1,15	3,02	0,97	0,85	0,68	0,49	1,18	0,97	0,72	0,69	1,15	1,01	0,78	0,69
7.	%ДНК	53	90	48	45	30	21	52	49	44	37	60	54	46	36
	GDI	1,11	2,92	1,07	0,87	0,66	0,46	1,15	1,03	0,94	0,72	1,05	0,96	0,89	0,67
8.	%ДНК	46	95	43	50	33	26	54	50	41	42	50	61	56	43
	GDI	1,10	2,86	1,03	0,91	0,78	0,53	1,10	1,05	0,84	0,75	1,12	1,17	0,95	0,76
9.	%ДНК	54	96	47	43	31	36	44	49	39	33	52	46	50	39
	GDI	1,17	2,99	1,09	0,85	0,60	0,59	1,15	1,12	0,88	0,63	1,22	1,04	0,95	0,72
10.	%ДНК	34	86	34	30	31	24	37	30	26	31	47	40	36	31
	GDI	0,91	2,77	0,85	0,74	0,66	0,52	0,96	0,94	0,73	0,59	1,02	0,89	0,68	0,66
11.	%ДНК	57	94	42	37	32	33	57	51	44	37	50	47	41	35
	GDI	1,14	2,94	1,07	0,88	0,75	0,52	1,18	1,05	0,80	0,73	1,13	0,98	0,86	0,71
12.	%ДНК	47	100	50	42	34	29	50	40	43	41	51	50	44	39
	GDI	1,21	3,01	1,17	0,95	0,83	0,57	1,23	1,07	1,05	0,82	1,29	1,15	1,00	0,83
13.	%ДНК	60	99	46	42	36	27	48	41	46	40	54	50	51	38
	GDI	1,24	3,12	0,96	0,84	0,69	0,46	1,16	0,99	0,99	0,76	1,18	1,09	0,99	0,78
14.	%ДНК	46	96	40	42	33	25	50	47	40	32	40	44	37	30
	GDI	1,15	3,10	0,92	0,85	0,68	0,50	1,14	1,10	1,05	0,65	1,07	1,08	0,91	0,77
15.	%ДНК	47	93	44	39	30	23	50	44	40	35	45	40	32	30
	GDI	1,05	2,83	0,89	0,84	0,62	0,40	1,04	0,91	0,87	0,73	1,06	1,02	0,78	0,74

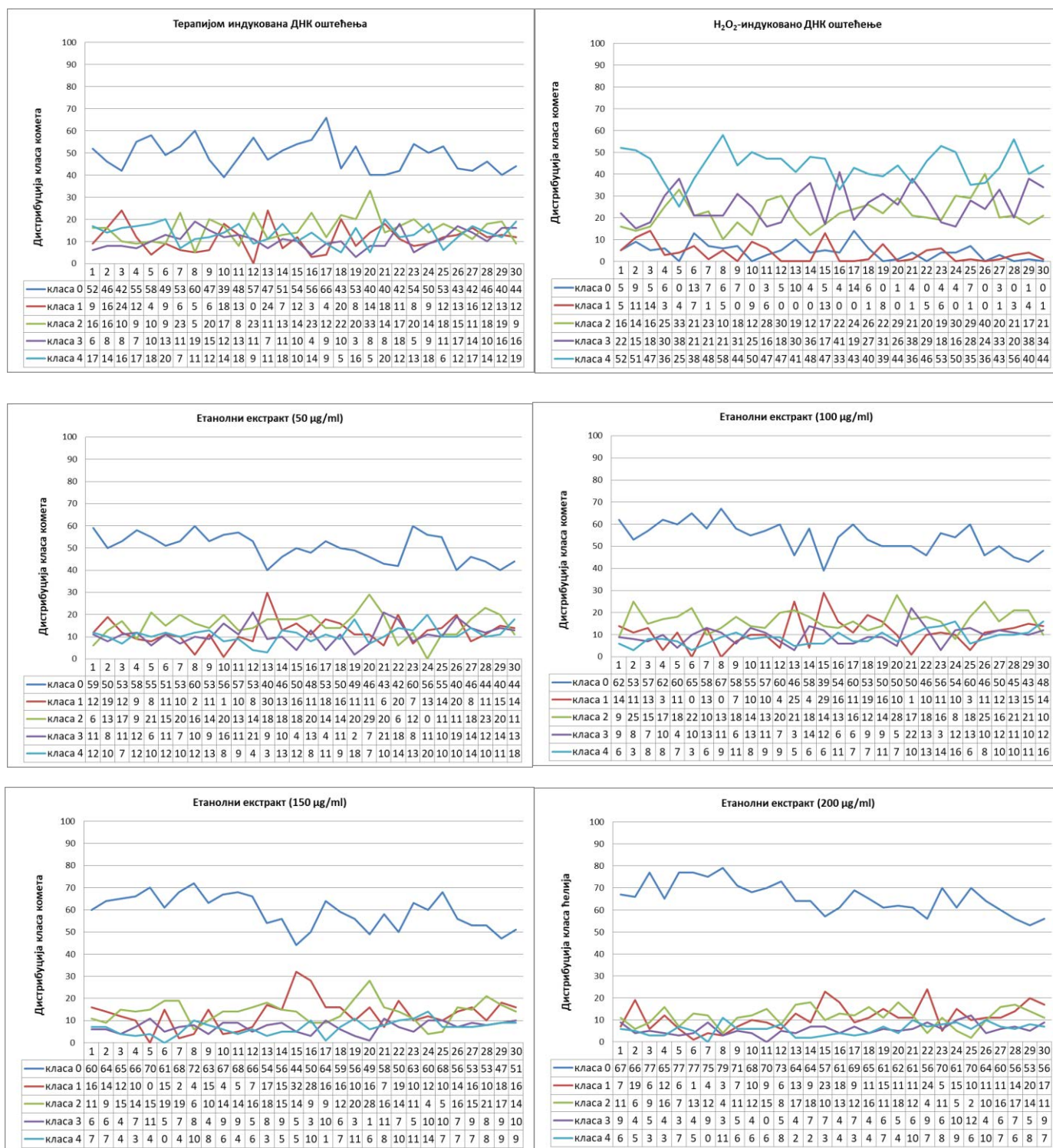
	Ниво ДНК оштећења	Th индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
16.	%ДНК	54	91	49	46	37	32	44	34	29	27	50	47	36	34
	GDI	1,28	2,88	1,16	0,90	0,77	0,53	0,99	0,82	0,66	0,49	1,09	0,97	0,78	0,63
17.	%ДНК	51	87	43	41	34	28	39	34	35	33	49	35	39	23
	GDI	1,46	2,64	1,09	0,94	0,79	0,70	1,18	0,97	0,86	0,61	1,22	0,86	0,68	0,59
18.	%ДНК	40	94	39	32	27	20	42	32	29	20	40	33	28	21
	GDI	1,16	3,20	1,00	0,77	0,62	0,57	1,05	0,96	0,74	0,64	1,12	0,95	0,80	0,64
19.	%ДНК	53	93	40	36	32	24	43	46	31	27	47	42	37	29
	GDI	1,39	3,05	0,95	0,76	0,61	0,51	1,15	1,00	0,86	0,72	1,18	1,05	0,79	0,68
20.	%ДНК	61	100	40	30	32	27	42	37	30	33	44	45	33	32
	GDI	1,44	3,08	0,93	0,83	0,69	0,54	1,16	0,98	0,80	0,78	1,21	1,09	0,83	0,70
21.	%ДНК	52	97	49	44	36	35	50	56	37	31	43	43	32	30
	GDI	1,40	2,98	1,18	0,92	0,75	0,62	1,18	0,99	0,74	0,63	1,19	1,05	0,76	0,63
22.	%ДНК	50	96	46	42	43	20	35	49	28	19	54	42	44	36
	GDI	1,38	3,24	1,15	0,87	0,78	0,50	1,02	0,97	0,93	0,55	1,31	1,06	0,92	0,74
23.	%ДНК	60	96	51	50	44	34	57	50	42	41	57	50	42	39
	GDI	1,50	3,01	1,25	1,14	0,99	0,60	1,47	1,36	1,10	0,88	1,49	1,41	1,04	0,93
24.	%ДНК	58	100	50	49	39	29	60	52	48	42	58	54	50	44
	GDI	1,47	3,16	1,22	1,09	0,91	0,64	1,39	1,21	1,08	0,80	1,42	1,37	1,08	0,87
25.	%ДНК	50	96	46	41	35	30	48	44	46	38	44	46	40	39
	GDI	1,36	3,08	1,08	0,94	0,70	0,56	1,38	1,19	1,09	0,80	1,26	1,26	1,06	0,91
26.	%ДНК	57	100	48	35	32	22	56	60	52	42	60	54	44	36
	GDI	1,42	2,96	1,11	0,92	0,70	0,54	1,35	1,28	1,15	0,86	1,39	1,23	0,95	0,87
27.	%ДНК	58	97	52	46	40	32	51	44	40	36	54	50	47	40
	GDI	1,48	3,12	1,23	1,06	0,89	0,60	1,28	1,12	0,99	0,76	1,42	1,20	1,01	0,89
28.	%ДНК	54	100	50	46	40	30	54	50	44	37	56	55	47	44
	GDI	1,34	3,29	1,20	0,97	0,72	0,56	1,28	1,20	0,99	0,72	1,33	1,28	1,08	0,93
29.	%ДНК	60	99	54	49	42	31	57	54	50	33	60	57	53	47
	GDI	1,47	3,12	1,25	1,07	0,71	0,59	1,34	1,18	1,01	0,70	1,41	1,31	1,15	0,95
30.	%ДНК	56	100	52	47	41	36	54	50	54	35	56	52	49	44
	GDI	1,54	3,20	1,37	1,15	0,86	0,66	1,41	1,25	1,00	0,68	1,47	1,34	1,10	0,94
Опсег варирања	%ДНК	34-61	86-100	34-54	27-50	25-44	19-38	35-60	30-60	26-54	19-42	40-60	33-61	28-56	21-47
	GDI	0,91-1,54	2,64-3,29	0,85-1,37	0,74-1,15	0,60-0,99	0,40-0,70	0,96-1,47	0,82-1,36	0,66-1,15	0,49-0,88	1,02-1,49	0,83-1,41	0,68-1,15	0,51-0,95



Графикон 22. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*



Графикон 23. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*



Графикон 24. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*

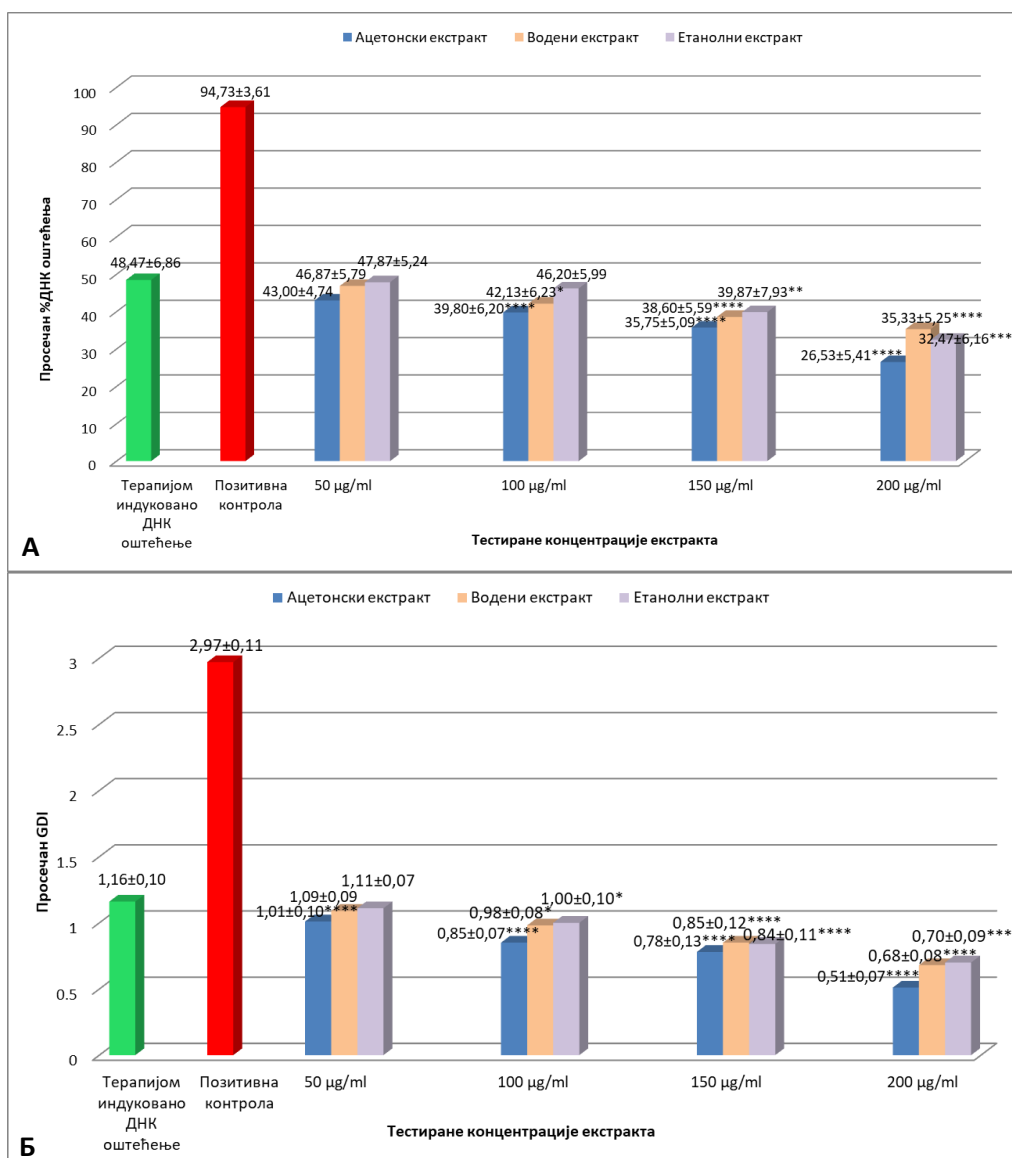
У поређењу са нивоом терапијом-индукованих ДНК оштећења пацијената са акутним коронарним синдромом, просечан %ДНК оштећења и GDI у третираним ћелијама се постепено редуковао са повећањем концентрације ацетонског екстракта гљиве, и то у свим тестираним концентрацијама (50, 100, 150 и 200 µg/ml). %ДНК оштећења је редукован са $51,37 \pm 6,74$ на $27,60 \pm 5,31$, а GDI са $1,28 \pm 0,16$ се редуковао на $0,55 \pm 0,07$. Водени и етанолни екстракти су такође проузроковали значајно смањење ($p < 0,0005$) нивоа ДНК оштећења, односно %ДНК оштећења се након дејства воденог екстракта значајно редуковао при дејству највише три концентрације ($44,13 \pm 7,63$ - $34,13 \pm 6,30$), а након дејства етанолног се редуковао у највише две концентрације ($40,63 \pm 7,51$ - $34,17 \pm 7,11$). GDI је био значајно снижен у свим тестираним концентрацијама након дејства воденог (са $1,28 \pm 0,16$ на $0,69 \pm 0,09$), а у највише три након дејства етанолног ($1,08 \pm 0,16$ - $0,74 \pm 0,13$) екстракта. Најзаступљеније су биле ћелије без оштећења при третману свих концентрација екстракта. Након дејства ацетонског екстракта проценат тих ћелија се повећао за око 24%, а након дејства воденог и етанолног екстракта повећао се за око 17% (Табела 19). Пирсонов коефицијент корелације је показао значајну негативну корелацију између %ДНК оштећења и концентрација екстракта ($r = -0,823$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,663$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,667$, $p = 0,000$ за етанолни екстракт), као и између концентрација екстракта и GDI ($r = -0,912$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,835$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,806$, $p = 0,000$ за етанолни екстракт).

Табела 19. Просечне вредности ДНК оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*

Третман (µg/ml)	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
	0	1	2	3	4		
Терапијом-индукована ДНК оштећења	48,63±6,74	11,27±5,89	15,97±5,85	10,63±4,08	13,47±4,41	51,37±6,74	1,28±0,16
H ₂ O ₂	4,43±3,77	3,63±4,09	21,83±6,73	26,03±7,75	43,90±7,28	95,57±3,77	3,02±0,15
Ацетонски екстракт							
50	54,87±5,16	11,77±4,12	14,13±4,97	9,07±3,31	10,17±2,77	45,13±5,16****	1,08±0,13****
100	58,97±6,31	13,97±5,80	11,87±4,82	8,13±3,66	7,07±2,79	41,03±6,34****	0,90±0,11****
150	65,60±4,98	11,40±5,15	11,23±4,87	6,47±2,30	5,27±1,89	34,40±4,98****	0,74±0,10****
200	72,40±5,31	10,80±6,45	10,03±4,47	4,47±2,37	2,77±2,14	27,60±5,31****	0,55±0,07****
Водени екстракт							
50	52,17±6,71	11,87±6,21	13,97±5,57	10,63±4,14	11,23±3,73	47,83±6,71	1,17±0,14**
100	56,20±7,31	10,83±6,09	14,63±4,93	9,13±3,84	9,17±2,88	44,13±7,63***	1,04±0,13****
150	61,20±6,96	10,17±6,18	13,73±5,12	7,60±3,08	7,30±2,98	39,13±7,44****	0,89±0,14****
200	65,87±6,30	12,76±6,32	11,83±5,55	5,23±2,81	4,30±2,28	34,13±6,30****	0,69±0,09****
Етанолни екстракт							
50	50,33±6,15	12,23±5,69	15,37±5,80	11,10±4,66	11,00±3,68	49,67±6,15	1,21±0,14
100	54,07±6,83	10,87±6,62	16,67±4,85	9,70±3,91	8,70±3,26	46,60±6,49	1,08±0,16****
150	59,37±7,51	12,87±6,86	14,00±5,02	7,07±2,60	6,70±3,11	40,63±7,51****	0,89±0,14****
200	65,83±7,11	11,23±5,75	11,37±4,35	5,77±2,50	5,77±2,62	34,17±7,11****	0,74±0,13****

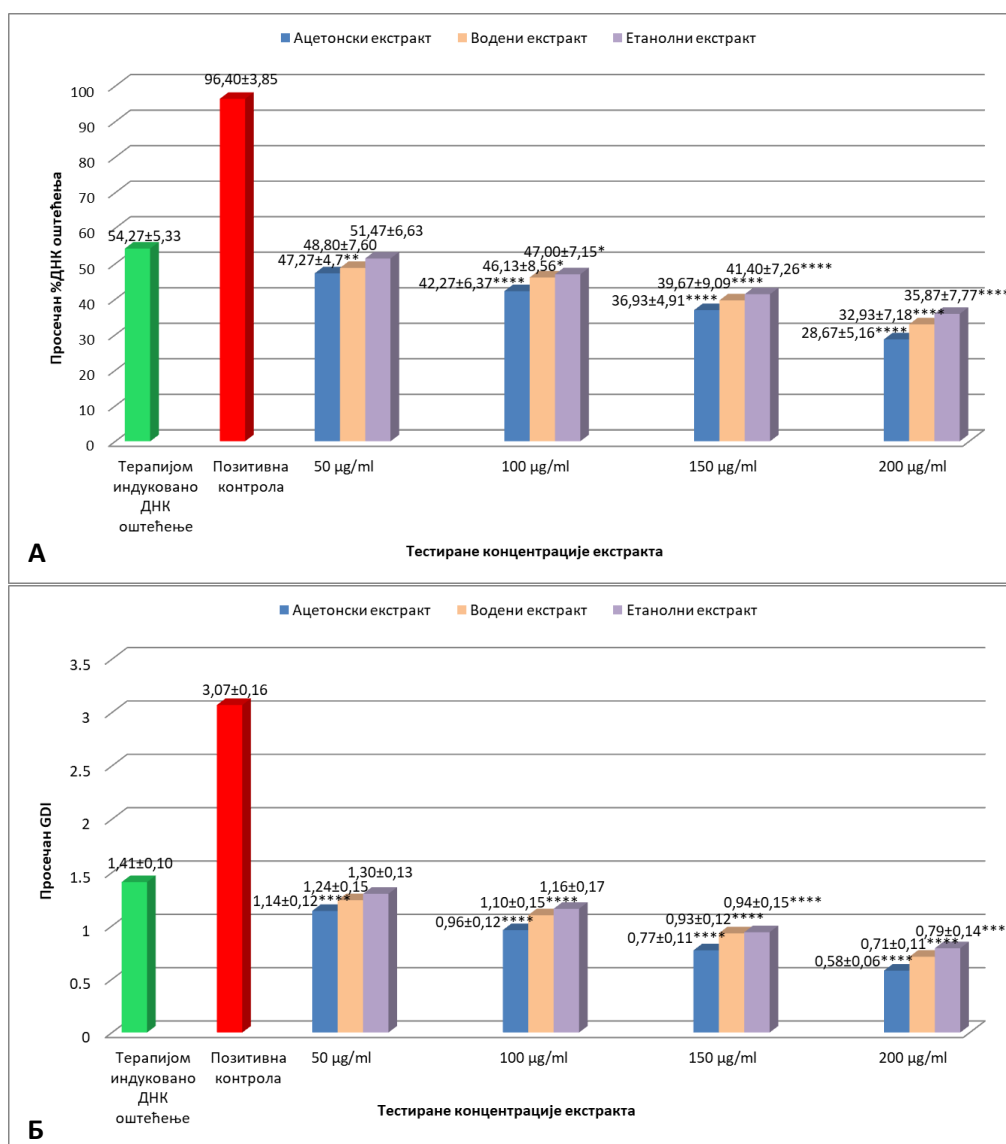
,*,**** статистички значајно редуковање %ДНК оштећења и GDI-а у односу на терапијом-индуковани ниво геномског оштећења код пацијената са АКС (ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0005$)

У поређењу са нивоом ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис ($48,47 \pm 6,83$ за %ДНК оштећења и $1,16 \pm 0,10$ за GDI), просечан %ДНК оштећења и GDI су се постепено редуковали у третману са различитим концентрацијама различитих екстраката гљиве *L. betulinus* (Графикон 25). При деловању највише три концентрације ацетонског екстракта значајно се редуковао %ДНК оштећења (од $39,80 \pm 6,20$ до $26,53 \pm 5,41$), док је у свим концентрацијама значајно редукован GDI (од $1,01 \pm 0,10$ до $0,51 \pm 0,07$). Слични резултати су запажени и након третмана воденим и етанолним екстрактом. Највише три тестиране концентрације воденог и највише две етанолног екстракта су значајно редуковале %ДНК оштећења (водени: од $42,13 \pm 6,23$ до $35,33 \pm 5,25$; етанолни: од $38,60 \pm 5,59$ до $32,47 \pm 6,16$), док су највише три концентрације оба екстракта значајно редуковале GDI (водени: од $0,98 \pm 0,08$ до $0,68 \pm 0,08$; етанолни: од $1,00 \pm 0,10$ до $0,70 \pm 0,09$).



Графикон 25. Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења код пацијената са нестабилном ангином пекторис у третману са различитим екстрактами гљиве *Lenzites betulinus in vitro* (ANOVA, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0005$)

Просечан %ДНК оштећења и GDI у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним инфарктом миокарда се постепено снижавао након третмана са различитим концентрацијама екстракта гљиве у односу на терапијом-индукована ДНК оштећења истих пацијената. Све тестиране концентрације ацетонског екстракта су значајно редуковале %ДНК оштећења (са $47,27 \pm 4,79$ на $28,67 \pm 5,16$) и GDI (са $1,14 \pm 0,12$ на $0,58 \pm 0,06$). Редуковање нивоа ДНК оштећења запажено је и након третмана различитим концентрацијама воденог и етанолног екстракта. Само најнижа концентрација ($50 \mu\text{g/ml}$) воденог екстракта није значајно мењала %ДНК оштећења и GDI, као и етанолног екстракта која није значајно мењала %ДНК оштећења, а концентрације од 50 и $100 \mu\text{g/ml}$ етанолног екстракта нису значајно мењале просечан GDI (Графикон 26).



Графикон 26. Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења код пацијената са акутним инфарктом миокарда у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus* (ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$)

Код пацијената са акутним коронарним синдромом код којих је рађена коронарна ангиографија, примећено је редуковање нивоа ДНК оштећења након третмана различитим концентрацијама ацетонског, воденог и етанолног екстракта испитиване гљиве (Табела 20). Код пацијената који су имали зрачењем-индукована додатна ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 43 до 70%, а GDI од 1,09 до 1,68. При третману најнижом концентрацијом ацетонског екстракта, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 37 до 69%, а GDI од 1,01 до 1,46. При третману највишом концентрацијом, %ДНК оштећења је опадао са опсегом варирања од 22 до 46%, а GDI је варирао од 0,46 до 0,80. Све тестиране концентрације воденог екстракта су постепено редуковале ниво зрачењем-индукованих ДНК оштећења у односу на ниво оштећења пре КА, тако да је при највишој тестираној концентрацији %ДНК оштећења био у опсегу варирања од 30 до 50%, а GDI се кретао од 0,58 до 1,03. Резултати ове студије су показали и редуковање зрачењем-индукованих ДНК оштећења у ћелијама пацијената након дејства различитих концентрација етанолног екстракта *in vitro*. Проценат ДНК оштећења је варирао од 44 до 76% при најнижој концентрацији екстракта, а при дејству највише концентрације је био у опсегу варирања од 30 до 52%. GDI се кретао у опсегу од 1,11 до 1,63 при концентрацији од 50 µg/ml, и од 0,70 до 1,15 при концентрацији од 200 µg/ml етанолног екстракта.

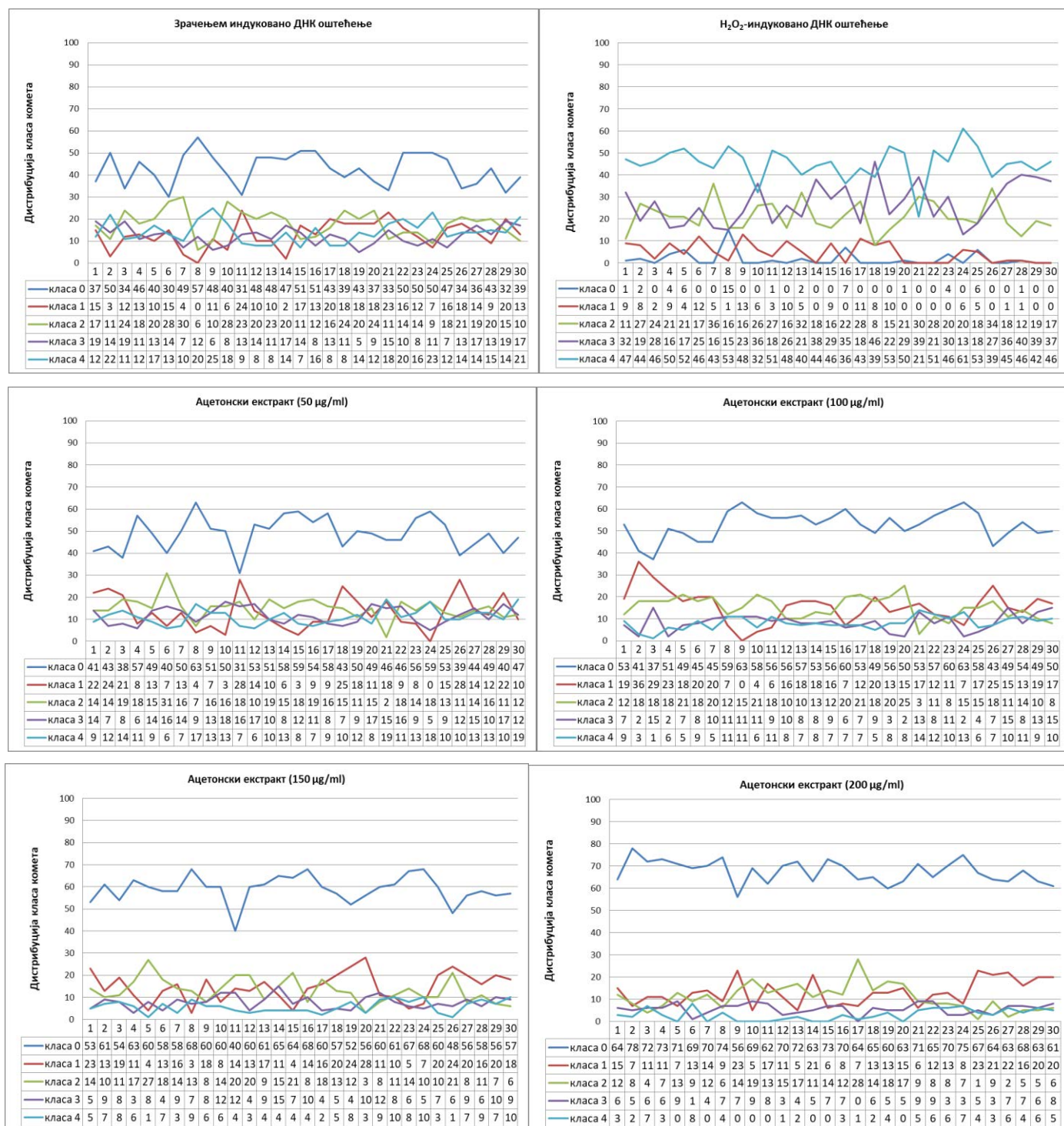
На Графиконима 27, 28 и 29 приказана је дистрибуција класа ћелија која показује да се проценат ћелија без оштећења након третмана анализираним екстрактима гљиве повећавао у односу на проценат истих ћелија код пацијената пре третмана. Највеће повећање процента ћелија без оштећења је запажено након третмана највишом тестираном концентрацијом (200 µg/ml) ацетонског екстракта, са опсегом варирања од 56 до 78%, док је при најнижој концентрацији опсег варирања био од 31 до 63% (Графикон 27). Проценат ћелија без оштећења се повећавао и са повећањем концентрације воденог екстракта, па је при најнижој испитиваној концентрацији опсег варирања био од 30 до 59%, а при највишој од 50 до 70% (Графикон 28). При најнижој концентрацији етанолног екстракта, проценат ћелија без оштећења је био у опсегу варирања од 24 до 56%, а при највишој концентрацији је био у опсегу варирања од 48 до 70% (Графикон 29).

Табела 20. Зрачењем-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)

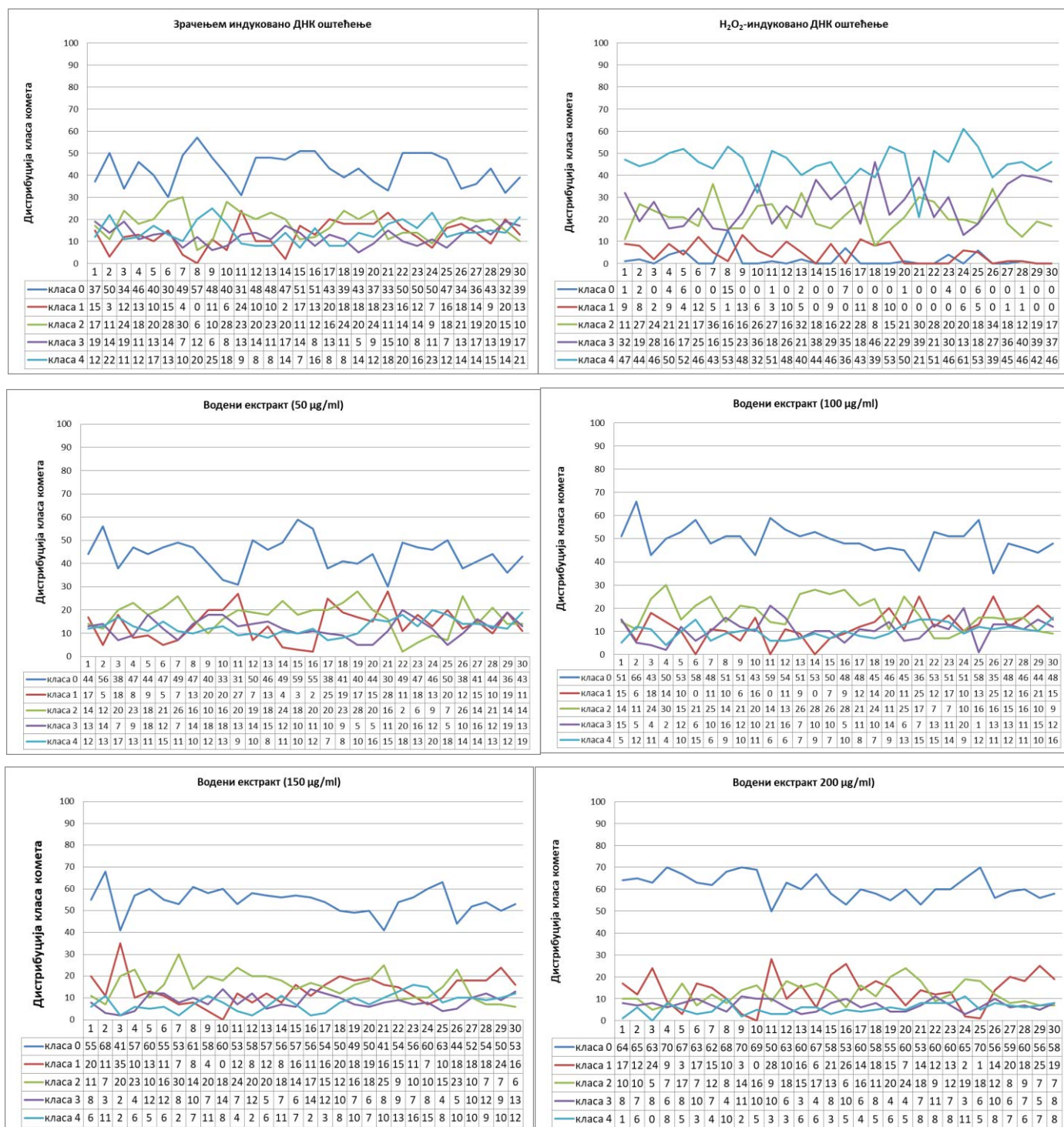
Ниво ДНК оштећења		Зрачењем-индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
1.	%ДНК	63	99	59	47	47	46	56	49	45	36	59	52	46	37
	GDI	1,54	3,15	1,28	1,00	0,86	0,69	1,32	1,08	0,90	0,65	1,42	1,15	0,91	0,76
2	%ДНК	50	98	57	59	39	22	44	34	32	35	56	56	43	43
	GDI	1,55	2,95	1,21	0,90	0,88	0,46	1,23	0,91	0,78	0,77	1,44	1,18	0,96	0,85
3.	%ДНК	66	100	62	63	46	28	72	57	59	37	76	68	55	38
	GDI	1,61	3,18	1,39	1,14	0,97	0,65	1,47	1,22	0,89	0,58	1,53	1,27	1,04	0,90
4.	%ДНК	54	96	43	49	37	27	53	50	43	30	48	53	40	43
	GDI	1,30	2,99	1,06	0,89	0,78	0,55	1,33	0,96	0,92	0,73	1,25	1,16	0,85	0,78
5.	%ДНК	60	94	51	51	40	29	56	47	40	33	50	51	48	30
	GDI	1,57	3,05	1,21	1,01	0,86	0,60	1,43	1,16	0,89	0,81	1,38	1,24	1,08	0,70
6.	%ДНК	70	100	60	55	42	31	53	42	45	37	53	49	32	36
	GDI	1,65	3,05	1,29	1,16	0,89	0,66	1,43	1,20	1,03	0,73	1,49	1,24	0,80	0,78
7.	%ДНК	51	100	40	55	42	30	51	52	47	38	53	47	43	37
	GDI	1,25	2,97	1,15	1,10	0,83	0,50	1,24	1,15	0,99	0,76	1,11	1,08	0,87	0,77
8.	%ДНК	43	85	37	41	32	26	53	49	39	32	47	55	40	42
	GDI	1,28	2,90	1,13	1,08	0,86	0,58	1,27	1,22	0,94	0,78	1,26	1,07	0,98	0,80
9.	%ДНК	52	100	49	37	40	44	60	49	42	30	64	51	41	30
	GDI	1,49	3,06	1,30	1,07	0,82	0,72	1,42	1,24	1,09	0,72	1,54	1,31	1,06	0,74
10.	%ДНК	60	100	50	42	40	31	67	57	40	31	59	51	49	37
	GDI	1,58	2,94	1,41	1,03	0,96	0,70	1,58	1,30	1,10	0,82	1,57	1,22	1,15	0,90
11.	%ДНК	69	99	69	44	60	38	69	41	47	50	57	56	46	37
	GDI	1,45	3,15	1,33	1,13	1,06	0,67	1,42	1,15	0,97	0,88	1,49	1,36	1,12	0,89
12.	%ДНК	52	100	47	44	40	30	50	46	42	37	50	42	49	40
	GDI	1,24	3,12	1,09	0,98	0,77	0,54	1,27	1,09	0,92	0,76	1,19	1,03	1,01	0,81
13.	%ДНК	52	98	49	43	39	28	54	49	43	40	49	46	40	38
	GDI	1,21	2,92	1,18	0,90	0,78	0,59	1,26	1,10	0,91	0,79	1,16	1,10	1,00	0,77
14.	%ДНК	53	100	42	47	35	37	51	47	44	33	59	55	44	38
	GDI	1,49	3,26	1,12	1,00	0,72	0,58	1,32	1,22	1,07	0,76	1,37	1,40	1,13	0,89
15.	%ДНК	49	100	41	44	36	27	41	50	43	42	44	51	50	366
	GDI	1,09	3,12	1,07	0,95	0,83	0,55	1,09	1,17	0,90	0,83	1,20	1,02	1,04	0,90

Наставак Табеле 20

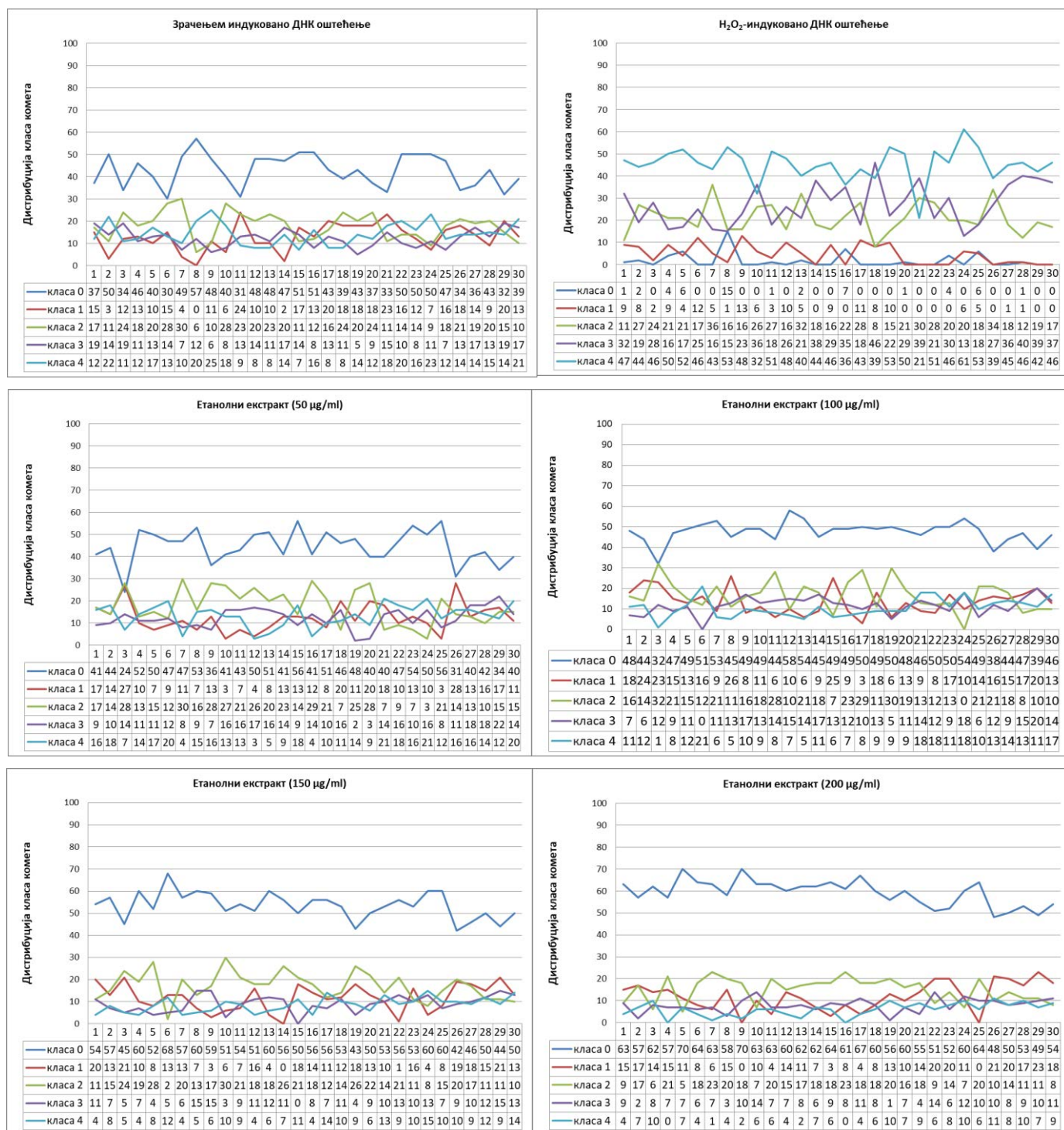
Ниво ДНК оштећења		Зрачењем-индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
16.	%ДНК	49	93	46	40	32	30	45	52	44	47	59	51	44	39
	GDI	1,25	2,93	1,08	0,93	0,76	0,65	1,23	1,20	0,95	0,88	1,28	1,19	0,90	0,78
17.	%ДНК	57	100	42	47	40	36	62	52	46	40	49	50	44	33
	GDI	1,23	2,93	1,01	1,03	0,72	0,67	1,23	1,19	0,94	0,80	1,20	1,23	1,12	0,89
18.	%ДНК	61	100	57	51	43	35	59	55	50	42	54	51	47	40
	GDI	1,31	3,18	1,16	1,03	0,81	0,67	1,24	1,20	1,06	0,84	1,26	1,15	1,13	0,92
19.	%ДНК	57	100	50	44	48	40	60	54	51	45	52	50	57	44
	GDI	1,29	3,18	1,15	0,94	0,92	0,80	1,28	1,20	1,11	0,91	1,23	1,17	1,18	0,96
20.	%ДНК	63	99	51	50	44	37	56	55	50	40	60	52	50	40
	GDI	1,41	3,29	1,24	1,03	0,76	0,64	1,34	1,31	1,01	0,87	1,21	1,20	1,07	0,91
21.	%ДНК	67	100	54	47	40	29	70	64	59	47	60	54	47	45
	GDI	1,62	3,01	1,43	1,18	0,99	0,71	1,53	1,40	1,30	1,03	1,58	1,49	1,20	0,98
22.	%ДНК	50	100	54	43	39	35	51	47	46	40	53	50	44	49
	GDI	1,54	3,23	1,37	1,26	0,96	0,79	1,47	1,25	1,12	0,95	1,48	1,40	1,18	1,04
23.	%ДНК	50	96	44	40	33	30	53	49	54	40	46	50	47	48
	GDI	1,28	3,14	1,15	1,00	0,83	0,62	1,30	1,20	1,16	0,86	1,21	1,14	1,08	0,98
24.	%ДНК	50	100	41	37	32	25	54	49	40	35	50	56	40	40
	GDI	1,50	3,29	1,23	0,95	0,82	0,59	1,47	1,26	1,11	0,93	1,48	1,36	1,19	1,01
25.	%ДНК	53	94	47	42	40	33	50	42	37	30	44	51	40	36
	GDI	1,21	3,07	1,08	0,83	0,73	0,56	1,21	0,96	0,84	0,75	1,17	1,14	0,99	0,94
26.	%ДНК	66	100	61	57	52	36	62	65	56	44	69	62	58	52
	GDI	1,55	3,05	1,26	1,10	0,88	0,60	1,50	1,40	1,19	1,00	1,53	1,46	1,26	1,15
27.	%ДНК	64	100	56	51	44	37	59	52	48	41	60	56	54	50
	GDI	1,59	3,25	1,39	1,22	0,91	0,71	1,47	1,29	1,08	0,82	1,57	1,34	1,18	1,04
28.	%ДНК	57	99	51	46	42	32	56	54	46	40	58	53	50	47
	GDI	1,48	3,29	1,26	1,09	0,92	0,63	1,40	1,5	1,04	0,81	1,46	1,30	1,21	1,06
29.	%ДНК	68	100	60	51	44	37	64	56	50	44	66	61	46	51
	GDI	1,63	3,23	1,35	1,14	0,92	0,72	1,52	1,26	1,05	0,82	1,61	1,44	1,24	1,03
30.	%ДНК	61	100	53	50	43	39	57	52	47	42	60	54	50	46
	GDI	1,68	3,29	1,46	1,18	0,97	0,76	1,54	1,33	1,15	0,89	1,63	1,43	1,28	1,03
Опсег варирања	%ДНК	43-70	85-100	37-69	37-63	32-60	22-46	41-72	34-65	32-59	30-50	44-76	42-68	32-58	30-52
	GDI	1,09-1,68	2,90-3,29	1,01-1,46	0,83-1,26	0,72-1,06	0,46-0,80	1,09-1,58	0,91-1,40	0,78-1,30	0,58-1,03	1,11-1,63	1,02-1,49	0,80-1,28	0,70-1,15



Графикон 27. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus* in vitro



Графикон 28. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*



Графикон 29. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*

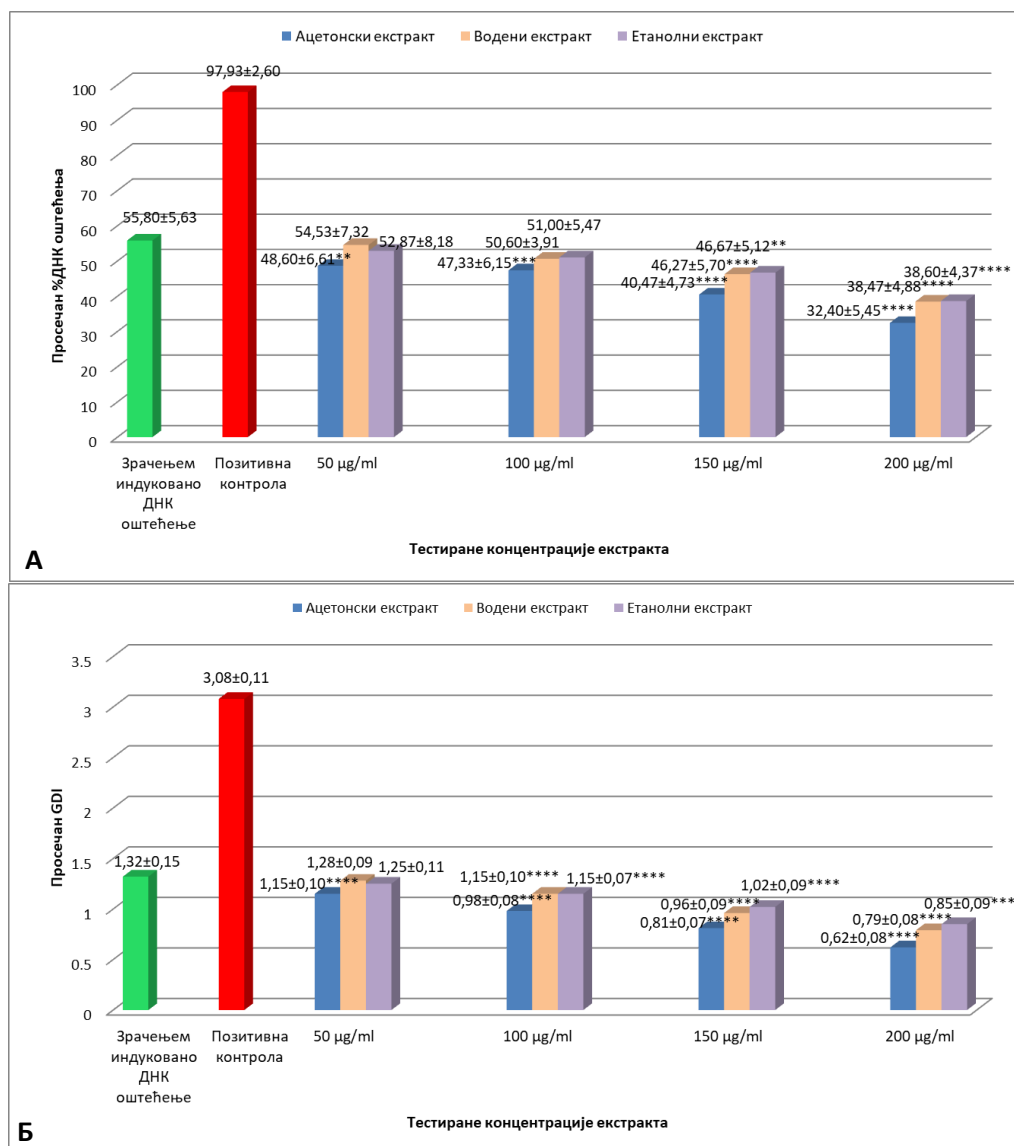
У односу на просечне вредности нивоа геномског оштећења пре третмана, %ДНК оштећења и GDI су се редуковали са повећањем концентрације испитиваних екстраката и то: након третмана ацетонским екстрактом, ниво ДНК оштећења се статистички значајно смањивао у свим концентрацијама (%ДНК оштећења: са $57,23 \pm 7,28$ на $32,83 \pm 5,64$; GDI: са $1,43 \pm 0,17$ на $0,64 \pm 0,08$), након третмана воденим екстрактом, ниво ДНК оштећења се значајно редуковао у највише три концентрације (%ДНК оштећења: $50,57 \pm 6,33$ - $38,60 \pm 5,41$; GDI: $1,20 \pm 0,12$ - $0,82 \pm 0,09$), а третман етанолним екстрактом је утицао на значајно редуковање %ДНК оштећења у највише две концентрације ($46,13 \pm 5,67$ - $40,73 \pm 5,84$) и GDI-а у највише три концентрације ($1,24 \pm 0,13$ - $0,90 \pm 0,11$). Посматрајући дистрибуцију ћелија, најзаступљеније су биле класе комета 0, где се њихов број повећао за око 25% након третмана ацетонским екстрактом, око 19% након третмана воденим екстрактом и за 16,5% након третмана етанолним екстрактом (Табела 21). Пирсонов коефицијент корелације је показао значајну негативну корелацију између %ДНК оштећења и концентрација екстракта ($r = -0,781$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,714$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,685$, $p = 0,000$ за етанолни). Значајна негативна корелација је постојала и између концентрација екстраката и GDI-а ($r = -0,922$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,866$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,802$, $p = 0,000$ за етанолни).

Табела 21. Просечне вредности ДНК оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*

Третман ($\mu\text{g/ml}$)	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
	0	1	2	3	4		
Зрачењем- индукована ДНК оштећења	$42,77 \pm 7,28$	$12,90 \pm 6,06$	$17,87 \pm 6,20$	$12,27 \pm 3,94$	$14,37 \pm 4,89$	$57,23 \pm 7,28$	$1,43 \pm 0,17$
H ₂ O ₂	$1,67 \pm 3,25$	$4,60 \pm 4,35$	$21,13 \pm 6,83$	$26,97 \pm 9,13$	$45,37 \pm 7,39$	$98,33 \pm 3,25$	$3,11 \pm 0,13$
Ацетонски екстракт							
50	$48,90 \pm 7,49$	$13,03 \pm 7,63$	$15,03 \pm 4,83$	$11,80 \pm 3,79$	$11,23 \pm 3,62$	$50,77 \pm 7,76^{**}$	$1,23 \pm 0,12^{****}$
100	$52,77 \pm 6,34$	$15,67 \pm 7,42$	$15,10 \pm 5,01$	$8,37 \pm 3,86$	$8,13 \pm 2,91$	$47,23 \pm 6,34^{****}$	$1,04 \pm 0,10^{****}$
150	$58,97 \pm 5,97$	$14,67 \pm 6,48$	$13,03 \pm 5,37$	$7,70 \pm 2,89$	$5,77 \pm 2,71$	$41,03 \pm 5,97^{****}$	$0,86 \pm 0,09^{****}$
200	$67,50 \pm 5,10$	$13,07 \pm 5,74$	$10,77 \pm 5,72$	$5,67 \pm 2,32$	$3,07 \pm 2,55$	$32,83 \pm 5,64^{****}$	$0,64 \pm 0,08^{****}$
Водени екстракт							
50	$44,07 \pm 6,92$	$13,70 \pm 6,70$	$17,17 \pm 6,19$	$12,27 \pm 4,17$	$12,80 \pm 3,34$	$56,27 \pm 7,45$	$1,36 \pm 0,12$
100	$49,43 \pm 6,33$	$12,17 \pm 6,34$	$17,80 \pm 6,76$	$10,60 \pm 4,81$	$10,00 \pm 3,19$	$50,57 \pm 6,33^{***}$	$1,20 \pm 0,12^{***}$
150	$54,50 \pm 5,92$	$13,73 \pm 6,68$	$15,50 \pm 6,15$	$8,37 \pm 3,27$	$7,90 \pm 3,78$	$45,83 \pm 6,11^{***}$	$1,01 \pm 0,15^{***}$
200	$61,40 \pm 5,41$	$13,63 \pm 7,55$	$12,47 \pm 4,94$	$7,07 \pm 2,35$	$5,53 \pm 2,54$	$38,60 \pm 5,41^{***}$	$0,82 \pm 0,09^{***}$
Етанолни екстракт							
50	$44,53 \pm 7,46$	$12,43 \pm 6,07$	$17,60 \pm 7,68$	$12,37 \pm 4,51$	$13,40 \pm 5,16$	$55,47 \pm 7,46$	$1,38 \pm 0,16$
100	$47,53 \pm 5,04$	$13,57 \pm 6,06$	$16,60 \pm 7,34$	$11,73 \pm 4,19$	$10,57 \pm 4,53$	$52,80 \pm 4,92$	$1,24 \pm 0,13^{****}$
150	$53,53 \pm 5,95$	$11,73 \pm 5,97$	$17,10 \pm 6,34$	$9,07 \pm 3,80$	$8,57 \pm 3,29$	$46,13 \pm 5,67^{****}$	$1,07 \pm 0,13^{****}$
200	$59,27 \pm 5,84$	$11,90 \pm 6,26$	$14,97 \pm 5,33$	$7,97 \pm 3,05$	$6,03 \pm 3,05$	$40,73 \pm 5,84^{****}$	$0,90 \pm 0,11^{****}$

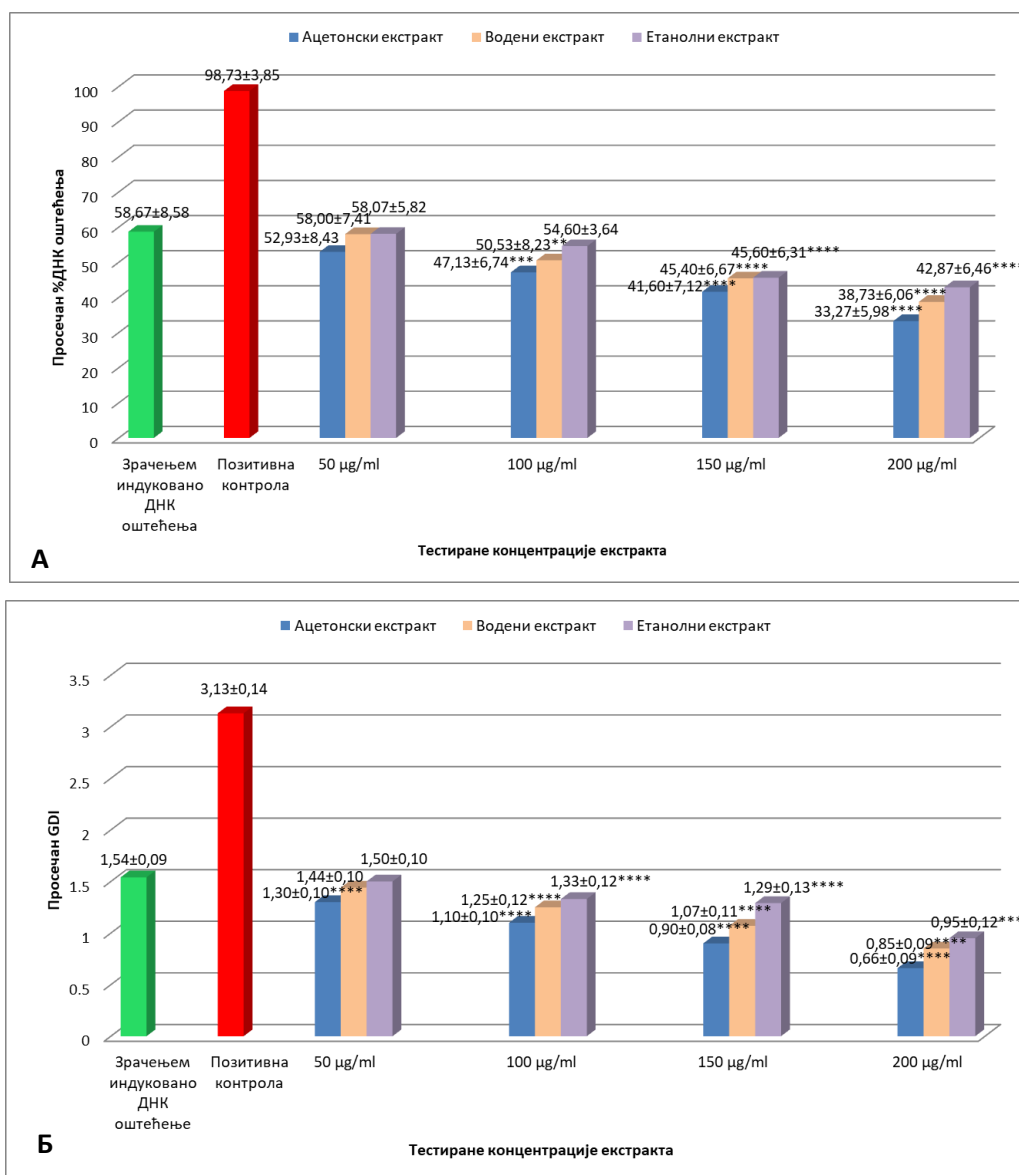
,* статистички значајно смањење %ДНК оштећења и GDI-а у односу на зрачењем-индукован ниво геномског оштећења пацијената након КА (ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0005$)

Ацетонски екстракт гљиве *L. betulinus* је показао најјаче дејство код пацијената са нестабилном ангином пекторис након коронарне ангиографије, јер је значајно редуковао %ДНК оштећења и GDI у свим тестираним концентрацијама у односу на зрачењем-индукована ДНК оштећења (Графикон 30). Проценат ДНК оштећења је редукован са $48,60 \pm 6,61$ на $32,40 \pm 5,45$, а GDI са $1,15 \pm 0,10$ при најнижој концентрацији на $0,62 \pm 0,08$ при највишој концентрацији ацетонског екстракта. Након третмана воденим и етанолним екстрактом, значајно редуковање %ДНК оштећења је примећено тек при највишим концентрацијама (150 и 200 $\mu\text{g/ml}$), а GDI-а при третману највише три концентрације (100, 150 и 200 $\mu\text{g/ml}$).



Графикон 30. Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења у лимфоцитима пацијената са нестабилном ангином пекторис након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus* (ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0005$)

Такође, и код пацијената са акутним инфарктом миокарда, ацетонски екстракт се показао као најбољи, јер је %ДНК оштећења и GDI значајно редукован у свим тестираним концентрацијама у односу на зрачењем-индуковано ДНК оштећење (Графикон 31). Проценат ДНК оштећења је редукован са $52,93 \pm 8,43$ на $33,27 \pm 5,98$, а GDI са $1,30 \pm 0,10$ на $0,66 \pm 0,09$. Након третмана воденим екстрактом, значајно редуковање %ДНК оштећења и GDI је примећено при дејству највише три концентрације (%ДНК оштећења: $50,53 \pm 8,23$ – $38,73 \pm 6,06$; GDI: $1,25 \pm 0,12$ – $0,85 \pm 0,09$), а након третмана етанолним екстрактом %ДНК оштећења је снижен у највише две, а GDI у највише три испитиване концентрације ($1,33 \pm 0,12$ – $0,95 \pm 0,12$).



Графикон 31. Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења у лимфоцитима пацијената са акутним инфарктом миокарда након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus* (ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0005$)

У Табели 22 је приказан појединачан %ДНК оштећења и GDI, као и опсег варирања у лимфоцитима периферне крви пацијената са дијагностикованом срчаном инсуфицијенцијом и смањеном EF, након третмана различитим концентрацијама ацетонског, воденог и етанолног екстракта гљиве *L. betulinus*. Резултати ове студије су показали да је са повећањем концентрације ацетонског екстракта дошло до редуковања нивоа терапијом-индукованих ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената *in vitro*. Проценат ДНК оштећења се при најнижој концентрацији (50 µg/ml) кретао у опсегу од 37 до 60%, а GDI од 0,99 до 1,43, док је при највишој тестираној концентрацији (200 µg/ml) екстракта, %ДНК оштећења био у опсегу варирања од 19 до 42%, а GDI од 0,44 до 0,80. При најнижој испитиваној концентрацији воденог екстракта, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 44 до 80%, док се GDI кретао од 1,13 до 1,61. При третману највишом концентрацијом истог екстракта (200 µg/ml), опсег варирања %ДНК оштећења је био од 28 до 49%, а GDI-а од 0,65 до 1,12. При третману најнижом концентрацијом етанолног екстракта, %ДНК оштећења се кретао у опсегу од 38 до 70%, а GDI од 1,10 до 1,67. При третману највише концентрације екстракта, %ДНК оштећења је био у опсегу варирања од 22 до 52%, а GDI од 0,65 до 1,08.

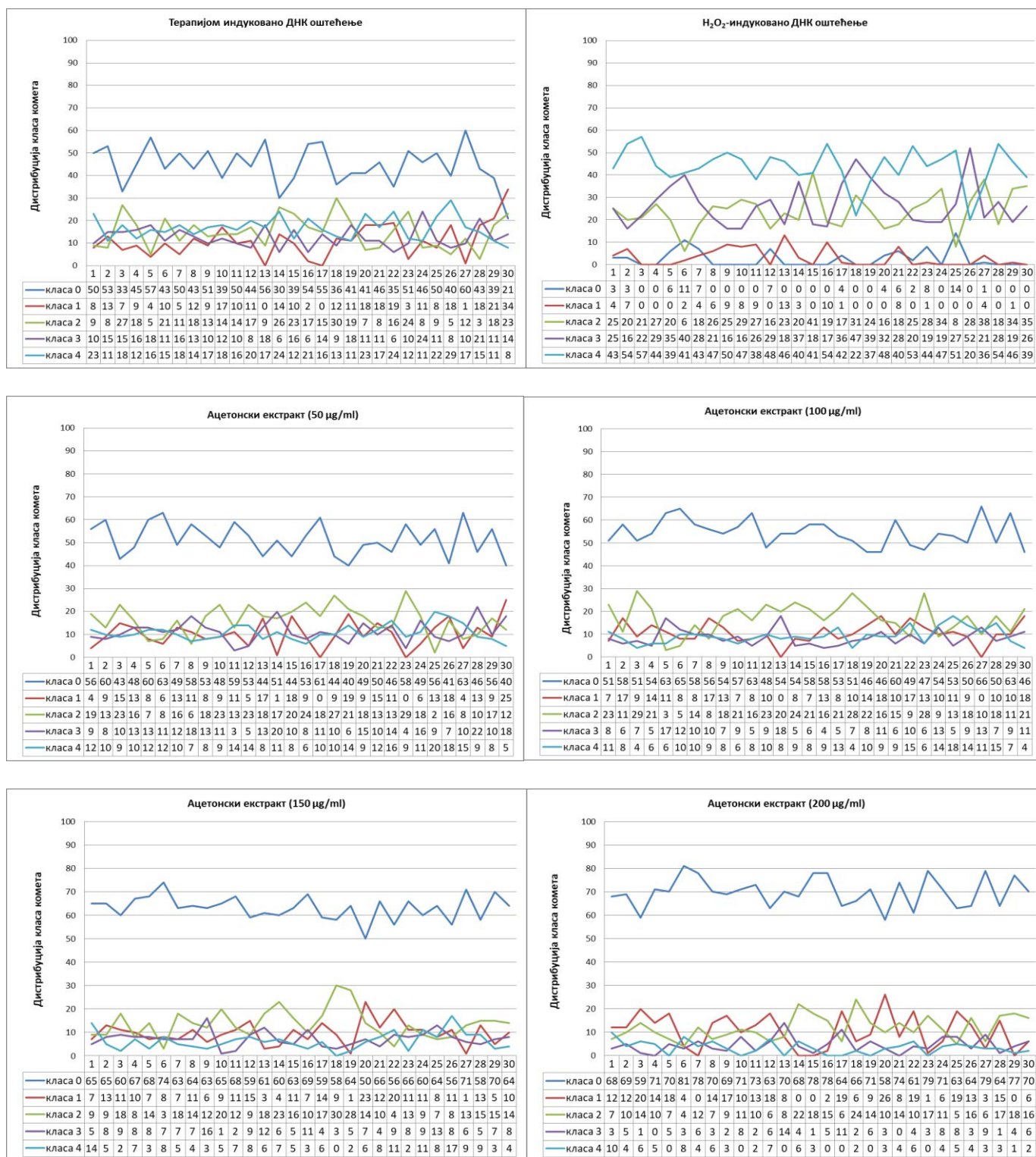
У свим третманима ацетонског екстракта, најбројније су биле ћелије без оштећења, са највећим процентом присутности при третману највишом тестираном концентрацијом, са опсегом варирања од 58 до 81% (Графикон 32). Процентуално најзаступљенија је била класа комета 0 и након третмана највишом тестираном концентрацијом воденог екстракта (200 µg/ml) са опсегом варирања од 51 до 72%. Анализом дистрибуције класа комета запажено је да се проценат ћелија без оштећења након третмана етанолним екстрактом гљиве дозно-зависно повећавао (Графикон 33). Након третмана лимфоцита најнижом тестираном концентрацијом (50 µg/ml) етанолног екстракта, проценат ћелија без оштећења је био у опсегу варирања од 30 до 62%, док је при највишој концентрацији опсег варирања био од 48 до 78% (Графикон 34).

Табела 22. Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)

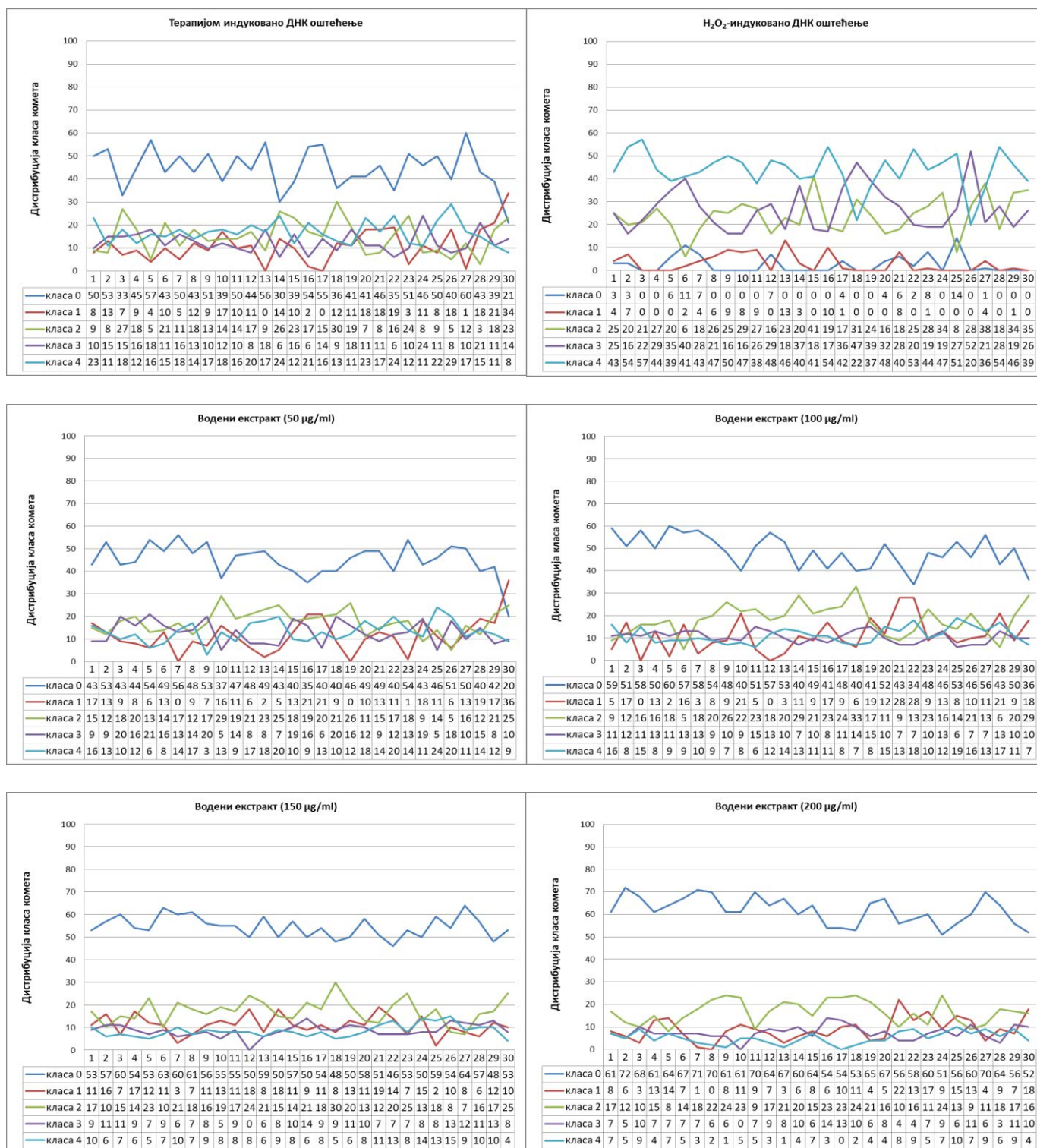
	Ниво ДНК оштећења	Th индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
1.	%ДНК	50	97	44	49	35	32	57	41	47	49	51	56	44	36
	GDI	1,48	3,01	1,17	1,21	0,96	0,75	1,38	1,20	1,12	0,91	1,31	1,30	1,06	0,83
2.	%ДНК	47	97	40	42	35	31	47	49	43	28	46	42	35	37
	GDI	1,18	3,11	0,99	0,89	0,75	0,63	1,16	1,09	0,93	0,65	1,10	0,99	0,77	0,75
3.	%ДНК	67	100	57	49	40	41	57	42	40	32	57	64	52	39
	GDI	1,78	3,36	1,27	1,04	0,82	0,75	1,45	1,25	0,98	0,89	1,55	1,63	1,15	0,86
4.	%ДНК	55	100	52	46	33	29	56	50	46	39	52	56	49	40
	GDI	1,41	3,17	1,24	0,95	0,78	0,54	1,44	1,16	0,96	0,80	1,36	1,33	1,07	0,83
5.	%ДНК	43	94	40	37	32	30	46	40	47	36	40	49	46	41
	GDI	1,32	3,01	1,09	0,92	0,71	0,47	1,19	1,07	0,99	0,79	1,20	1,11	1,02	0,78
6.	%ДНК	57	89	37	35	26	19	51	43	37	33	38	37	29	22
	GDI	1,45	2,98	1,03	0,94	0,67	0,53	1,21	1,01	0,86	0,76	1,19	1,01	0,84	0,65
7.	%ДНК	50	93	51	42	37	22	44	42	40	29	50	45	40	35
	GDI	1,47	2,96	1,21	1,06	0,84	0,58	1,29	1,18	1,03	0,70	1,26	1,13	0,90	0,84
8.	%ДНК	57	100	42	44	36	30	52	46	39	30	46	42	36	38
	GDI	1,43	3,09	1,05	0,99	0,76	0,59	1,43	1,11	0,92	0,70	1,24	1,18	0,88	0,86
9.	%ДНК	49	100	47	46	37	31	47	52	44	39	43	40	39	31
	GDI	1,33	3,07	1,15	1,02	0,90	0,61	1,13	1,19	1,03	0,78	1,18	1,00	0,85	0,71
10.	%ДНК	61	100	52	43	35	29	63	60	45	39	58	48	43	38
	GDI	1,53	3,02	1,24	1,00	0,72	0,56	1,41	1,24	0,98	0,77	1,36	1,25	0,98	0,80
11.	%ДНК	50	100	41	37	32	27	53	49	45	30	46	42	43	39
	GDI	1,32	2,93	1,02	0,87	0,69	0,49	1,27	1,20	1,04	0,68	1,19	1,11	0,95	0,76
12.	%ДНК	56	93	47	52	41	37	52	43	50	36	60	52	49	43
	GDI	1,49	3,11	1,22	1,23	0,92	0,76	1,40	1,23	0,98	0,80	1,45	1,24	1,06	0,86
13.	%ДНК	44	100	56	46	39	30	51	47	41	33	49	50	42	36
	GDI	1,40	2,97	1,24	1,26	0,99	0,66	1,44	1,29	0,92	0,73	1,35	1,30	1,00	0,81
14.	%ДНК	70	100	49	46	40	32	57	60	50	40	62	56	51	47
	GDI	1,80	3,14	1,39	1,07	0,96	0,80	1,56	1,42	1,08	0,92	1,62	1,21	1,17	0,95
15.	%ДНК	61	100	56	42	37	22	60	51	43	36	70	52	46	40
	GDI	1,52	3,00	1,20	0,99	0,78	0,51	1,46	1,25	1,01	0,84	1,36	1,25	0,95	0,87
16.	%ДНК	46	100	47	42	31	22	65	59	50	46	56	49	44	37
	GDI	1,38	3,15	1,05	0,93	0,72	0,47	1,43	1,31	1,17	1,06	1,39	1,22	1,00	0,77

Наставак Табеле 22

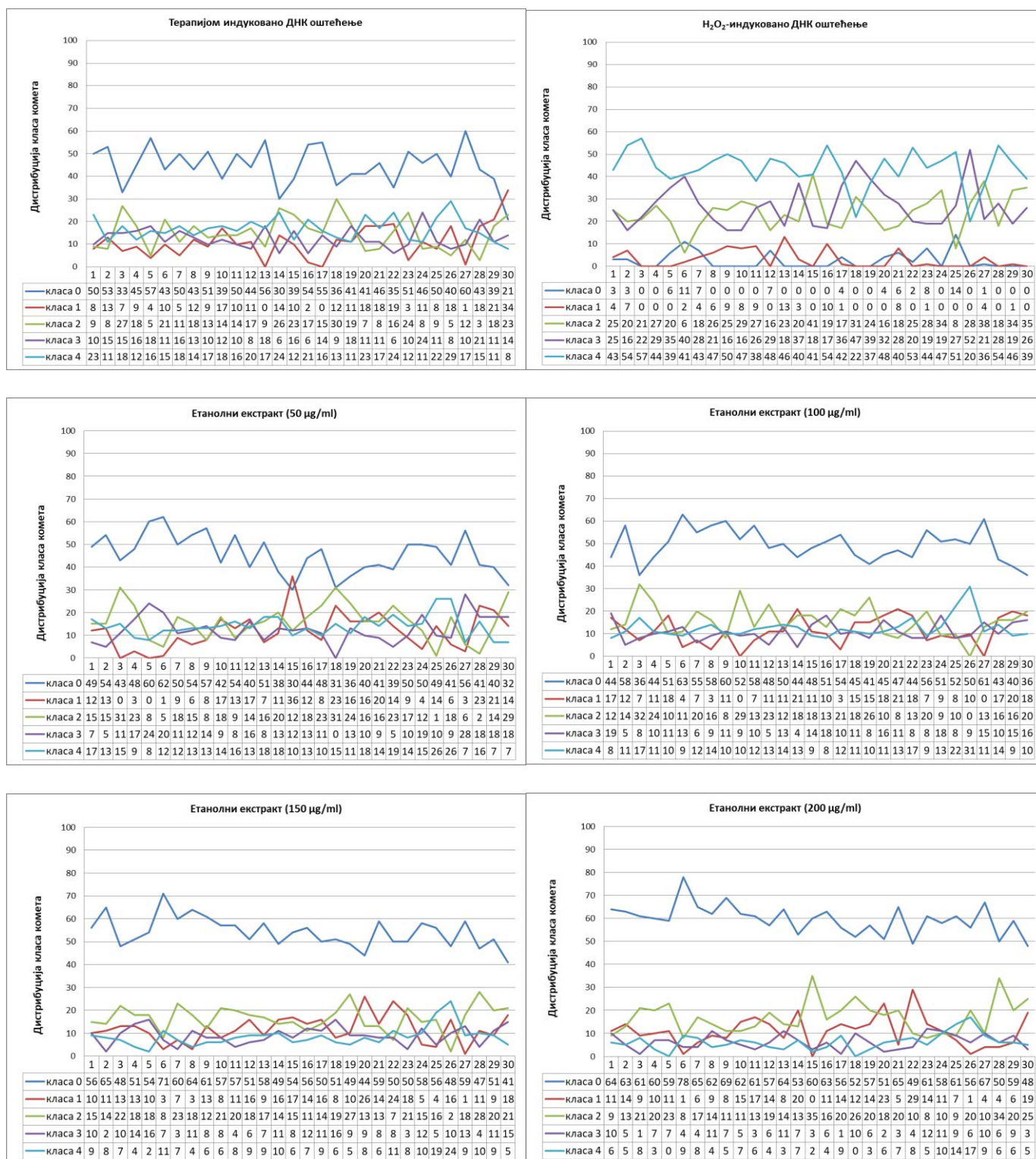
	Ниво ДНК оштећења	Th индуковано ДНК оштећење	Позитивна контрола	Ацетонски екстракт (µg/ml)				Водени екстракт (µg/ml)				Етанолни екстракт (µg/ml)			
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
17.	%ДНК	45	96	39	47	41	36	60	52	46	46	52	46	50	44
	GDI	1,36	3,11	1,09	1,17	0,84	0,64	1,31	1,22	1,06	0,95	1,27	1,23	1,13	0,93
18.	%ДНК	64	100	56	49	42	34	60	60	52	47	69	55	49	48
	GDI	1,51	2,91	1,33	1,03	0,78	0,68	1,51	1,42	1,15	0,97	1,45	1,28	1,18	0,94
19.	%ДНК	59	100	60	54	36	29	54	59	50	35	64	59	51	43
	GDI	1,47	3,13	1,35	1,22	0,80	0,55	1,48	1,30	1,10	0,80	1,47	1,31	1,11	0,84
20.	%ДНК	59	96	51	54	50	42	51	48	42	33	60	55	56	49
	GDI	1,57	3,20	1,26	1,19	0,96	0,67	1,40	1,24	0,99	0,77	1,50	1,30	1,11	0,89
21.	%ДНК	54	94	50	40	34	26	51	57	49	44	59	53	41	35
	GDI	1,35	2,88	1,19	0,94	0,76	0,52	1,26	1,19	1,08	0,86	1,35	1,22	0,88	0,82
22.	%ДНК	65	98	54	51	44	39	60	66	54	42	61	56	50	51
	GDI	1,65	3,22	1,43	1,25	0,99	0,75	1,61	1,47	1,27	0,93	1,51	1,36	1,06	0,93
23.	%ДНК	49	92	42	53	34	21	46	52	47	40	50	44	50	39
	GDI	1,29	2,90	1,06	1,11	0,69	0,44	1,32	1,25	1,10	0,80	1,29	1,07	1,01	0,86
24.	%ДНК	54	100	51	46	40	29	57	54	50	49	50	49	42	42
	GDI	1,43	3,13	1,34	1,23	1,00	0,68	1,37	1,32	1,21	1,12	1,45	1,33	1,11	1,04
25.	%ДНК	50	86	44	47	36	37	54	47	41	44	51	48	44	39
	GDI	1,47	3,01	1,24	1,24	0,93	0,73	1,50	1,30	1,14	0,99	1,50	1,40	1,27	1,08
26.	%ДНК	60	100	59	50	44	36	49	54	46	40	59	50	52	44
	GDI	1,68	2,92	1,43	1,28	1,19	0,70	1,50	1,37	1,25	0,92	1,67	1,61	1,46	1,07
27.	%ДНК	40	99	37	34	29	21	50	44	36	30	44	39	41	33
	GDI	1,23	2,87	1,10	1,03	0,87	0,54	1,19	1,16	0,98	0,80	1,27	1,15	1,12	0,90
28.	%ДНК	57	100	54	50	42	36	60	57	43	36	59	57	53	50
	GDI	1,47	3,36	1,35	1,27	0,94	0,64	1,44	1,40	1,11	0,78	1,45	1,35	1,19	0,94
29.	%ДНК	61	100	44	37	30	23	58	50	52	44	60	60	49	41
	GDI	1,34	3,15	1,05	0,87	0,68	0,52	1,31	1,23	1,25	1,10	1,31	1,33	1,18	0,97
30.	%ДНК	79	100	60	54	36	30	80	64	47	48	68	44	59	52
	GDI	1,54	3,04	1,23	1,09	0,78	0,64	1,52	1,34	1,00	0,96	1,54	1,46	1,25	0,98
Опсег варирања	%ДНК	40-79	86-100	37-60	34-54	26-50	19-42	44-80	40-66	36-54	28-49	38-70	37-64	29-59	22-52
	GDI	1,18-1,80	2,87-3,36	0,99-1,43	0,87-1,28	0,67-1,19	0,44-0,80	1,13-1,61	1,01-1,47	0,86-1,27	0,65-1,12	1,10-1,67	0,99-1,63	0,77-1,46	0,65-1,08



Графикон 32. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*



Графикон 33. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*



Графикон 34. Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*

Просечан %ДНК оштећења и GDI пацијената са срчаном инсуфицијенцијом су редуковани након третмана анализираним екстрактима *in vitro* у односу на њихов терапијом-индукован ниво геномског оштећења (%ДНК оштећења: $55,30 \pm 8,73$ и GDI: $1,46 \pm 0,14$). Након дејства ацетонског екстракта, примећено је статистички значајно ($p < 0,0005$) редуковање просечних GDI вредности у свим тестираним концентрацијама (са $1,20 \pm 0,13$ на $0,61 \pm 0,10$), као и %ДНК оштећења (са $48,30 \pm 7,14$ на $30,10 \pm 6,24$). Етанолни и водени екстракт су редуковали просечан GDI при дејству највише три тестиране концентрације (етанолни: са $1,26 \pm 0,15$ на $0,87 \pm 0,10$ и водени: са $1,24 \pm 0,10$ на $0,85 \pm 0,12$). Проценат ДНК оштећења је значајно редукован након дејства највише две концентрације воденог екстракта ($45,40 \pm 4,62 - 38,10 \pm 6,10$) и након дејства највише три концентрације етанолног екстракта (са $50,83 \pm 7,66$ на $40,30 \pm 6,37$). Процентуално су биле најзаступљеније ћелије без оштећења, које су пропорционално расле са порастом концентрација екстракта (Табела 23). Пирсонов коефицијент корелације је показао статистички значајну негативну корелацију између %ДНК оштећења и концентрација екстракта ($r = -0,797$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,593$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,653$, $p = 0,000$ за етанолни), као и између концентрација екстракта и GDI-а (Пирсон: $r = -0,915$, $p = 0,000$ за ацетонски, $r = -0,865$, $p = 0,000$ за водени и $r = -0,830$, $p = 0,000$ за етанолни).

Табела 23. Просечне вредности ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом након третмана са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*

Третман ($\mu\text{g/ml}$)	Дистрибуција класа комета (%)					%ДНК оштећења	GDI
	0	1	2	3	4		
0	$44,70 \pm 8,73$	$11,10 \pm 7,33$	$14,90 \pm 7,15$	$12,60 \pm 4,44$	$16,70 \pm 4,91$	$55,30 \pm 8,73$	$1,46 \pm 0,14$
H ₂ O ₂	$2,53 \pm 3,76$	$3,00 \pm 3,89$	$23,90 \pm 8,06$	$26,87 \pm 9,45$	$43,70 \pm 8,33$	$97,47 \pm 3,78$	$3,06 \pm 0,13$
<i>Ацетонски екстракт</i>							
50	$51,36 \pm 7,02$	$10,27 \pm 5,85$	$16,20 \pm 6,34$	$11,30 \pm 4,50$	$10,87 \pm 3,42$	$48,30 \pm 7,14^{**}$	$1,20 \pm 0,13^{****}$
100	$54,53 \pm 5,80$	$10,50 \pm 4,46$	$17,07 \pm 6,76$	$8,60 \pm 3,48$	$9,30 \pm 3,47$	$45,47 \pm 5,80^{****}$	$1,08 \pm 0,13^{****}$
150	$63,20 \pm 5,08$	$9,63 \pm 4,80$	$13,67 \pm 6,19$	$7,23 \pm 3,17$	$6,27 \pm 3,72$	$36,80 \pm 5,08^{****}$	$0,84 \pm 0,12^{****}$
200	$69,90 \pm 6,24$	$10,40 \pm 7,29$	$11,80 \pm 5,12$	$4,53 \pm 3,27$	$3,37 \pm 2,66$	$30,10 \pm 6,24^{****}$	$0,61 \pm 0,10^{****}$
<i>Водени екстракт</i>							
50	$45,07 \pm 7,19$	$11,37 \pm 7,48$	$17,40 \pm 5,33$	$12,93 \pm 4,93$	$13,23 \pm 4,63$	$54,93 \pm 7,19$	$1,38 \pm 0,12$
100	$48,73 \pm 7,17$	$11,33 \pm 7,38$	$18,17 \pm 6,76$	$10,50 \pm 2,54$	$11,33 \pm 3,63$	$51,27 \pm 7,17$	$1,24 \pm 0,10^{****}$
150	$54,60 \pm 4,62$	$10,97 \pm 4,19$	$17,23 \pm 5,31$	$8,73 \pm 2,77$	$8,47 \pm 2,71$	$45,40 \pm 4,62^{****}$	$1,05 \pm 0,10^{****}$
200	$61,90 \pm 6,10$	$8,90 \pm 5,11$	$16,57 \pm 5,11$	$7,47 \pm 2,93$	$5,17 \pm 2,69$	$38,10 \pm 6,10^{****}$	$0,85 \pm 0,12^{****}$
<i>Етанолни екстракт</i>							
50	$45,66 \pm 8,43$	$11,87 \pm 7,97$	$15,90 \pm 7,71$	$12,60 \pm 5,87$	$13,97 \pm 4,71$	$54,33 \pm 8,43$	$1,37 \pm 0,14$
100	$49,50 \pm 7,18$	$11,33 \pm 6,09$	$15,77 \pm 6,85$	$10,93 \pm 4,02$	$12,47 \pm 4,60$	$50,83 \pm 7,66^*$	$1,26 \pm 0,15^{****}$
150	$54,17 \pm 6,51$	$11,80 \pm 5,86$	$16,60 \pm 5,54$	$9,03 \pm 3,81$	$8,40 \pm 4,22$	$46,17 \pm 6,51^{****}$	$1,06 \pm 0,15^{****}$
200	$59,70 \pm 6,37$	$10,90 \pm 6,59$	$16,90 \pm 7,06$	$6,30 \pm 3,19$	$6,20 \pm 3,59$	$40,30 \pm 6,37^{****}$	$0,87 \pm 0,10^{****}$

*, **, **** статистички значајно смањење %ДНК оштећења и GDI-а у односу на терапијом-индукован ниво геномског оштећења пацијената са СИ (ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0005$)

4.10. Хемијски састав гљиве *Lenzites betulinus*

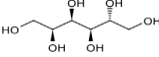
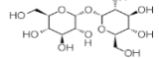
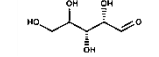
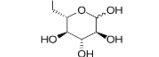
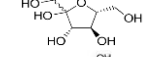
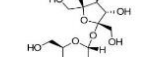
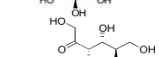
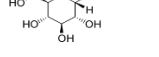
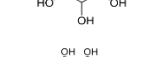
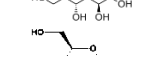
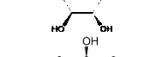
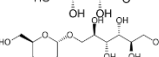
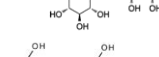
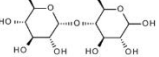
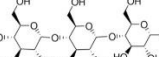
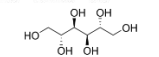
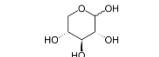
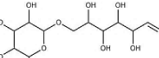
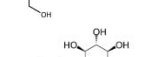
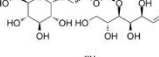
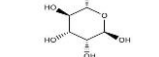
У Табели 24 су приказани резултати анализе минерала у сувој материји гљиве *L. betulinus*. Од макроелемената у јако високој концентрацији био је заступљен фосфор ($59400,00 \pm 133,35$ mg/kg), који је 18 пута био заступљенији у односу на калијум ($3255,00 \pm 9,86$ mg/kg), 30 пута у односу на натријум ($1899,75 \pm 8,04$ mg/kg), 40 пута у односу на сумпор ($1438,75 \pm 5,39$ mg/kg) и 50 пута у односу на калцијум ($1045,25 \pm 2,26$ mg/kg). Од микроелемената су најзаступљенији били гвожђе ($232,50 \pm 0,43$), силицијум ($193,76 \pm 3,30$) и алуминијум ($176,35 \pm 0,96$).

Табела 24. Садржај минерала у сувој гљиви *Lenzites betulinus*

Минерали			<i>Lenzites betulinus</i> (mg/kg)
Макроелементи	Калцијум	Ca	$1045,25 \pm 2,26$
	Калијум	K	$3255,00 \pm 9,86$
	Магнезијум	Mg	$625,00 \pm 2,24$
	Натријум	Na	$1899,75 \pm 8,04$
	Фосфор	P	$59400,00 \pm 133,35$
	Сумпор	S	$1438,75 \pm 5,39$
Микроелементи	Алуминијум	Al	$176,35 \pm 0,96$
	Кадмијум	Cd	$0,08 \pm 0,01$
	Хром	Cr	$5,89 \pm 0,13$
	Бакар	Cu	$9,18 \pm 0,11$
	Гвожђе	Fe	$232,50 \pm 0,43$
	Литијум	Li	$0,14 \pm 0,01$
	Манган	Mn	$47,50 \pm 0,06$
	Никал	Ni	$1,51 \pm 0,02$
	Арсен	As	$0,33 \pm 0,01$
	Селен	Se	$0,53 \pm 0,01$
	Баријум	Ba	$11,15 \pm 0,03$
	Олово	Pb	$6,46 \pm 0,06$
	Силицијум	Si	$193,76 \pm 3,30$
	Стронцијум	Sr	$3,00 \pm 0,01$
	Цинк	Zn	$30,38 \pm 0,02$

Резултати анализе садржаја шећера и шећерних алкохола у сувој материји испитиване гљиве су приказани у Табели 25. Глукоза је била у највећој концентрацији заступљена ($157,80 \pm 1,97$ g/kg), скоро 10 пута више у односу на галактозу ($17,44 \pm 0,80$ g/kg) и фруктозу ($17,11 \pm 0,43$ g/kg) и 15 пута више у односу на туранозу ($10,64 \pm 0,41$ g/kg) који су такође били заступљени у високим концентрацијама у односу на остале шећере, а сорбитол је идентификован као најзаступљенија компонента шећерних алкохола ($10,74 \pm 0,26$ g/kg).

Табела 25. Сарджај шећера у сувој материји гљиве *Lenzites betulinus*

Шећери	<i>Lenzites betulinus</i> (g/kg)
Сорбитол	 10,74 ± 0,26
Трехалоза	 0,69 ± 0,02
Арабиноза	 1,98 ± 0,05
Глукоза	 157,80 ± 1,97
Фруктоза	 17,11 ± 0,43
Сахароза	 4,19 ± 0,12
Тураноза	 10,64 ± 0,41
Глицерол	 1,91 ± 0,07
Галактитол	 1,75 ± 0,06
Галактоза	 17,44 ± 0,80
Рибоза	 1,60 ± 0,07
Изомалтоза	 1,00 ± 0,04
Изомалтотриоза	 0,69 ± 0,02
Малтоза	 1,32 ± 0,10
Малтотриоза	 1,12 ± 0,04
Манитол	 5,34 ± 0,03
Ксилоза	 1,00 ± 0,02
Мелибиоза	 0,70 ± 0,02
Паноза	 0,30 ± 0,01
Рамноза	 0,79 ± 0,02
Рафиноза	 1,83 ± 0,04
Стахиоза	 0,67 ± 0,01

У испитиваним узорцима гљиве идентификовано је укупно 36 масних киселина (Табела 26). Најзаступљенија је била *trans*-линолна киселина ($2,01 \pm 0,05$ mg/g), за којом следе *cis*-олеинска ($1,98 \pm 0,05$ mg/g), палмитинска ($1,78 \pm 0,03$ mg/g), докосахексаеноична ($1,18 \pm 0,04$ mg/g) и еикосадиенска ($1,14 \pm 0,03$ mg/g) киселина као доминантније, док су остале знатно мање присутне.

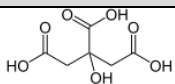
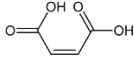
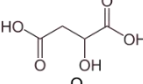
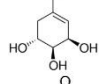
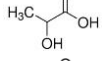
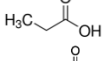
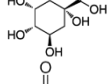
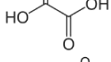
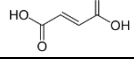
Табела 26. Садржај масних киселина у гљиви *Lenzites betulinus*

Масне киселине		<i>Lenzites betulinus</i> (mg/g)
Бутанска киселина	C4:0	$0,02 \pm 0,00$
Капронска киселина	C6:0	$0,01 \pm 0,00$
Каприлна киселина	C8:0	$0,03 \pm 0,01$
Капринска киселина	C10:0	$0,08 \pm 0,02$
Ундеканска киселина	C11:0	$0,06 \pm 0,01$
Лауринска киселина	C12:0	$0,04 \pm 0,01$
Тридеканска киселина	C13:0	$0,02 \pm 0,00$
Миристинска киселина	C14:0	$0,73 \pm 0,01$
Миристолеинска киселина	C14:1	$0,10 \pm 0,02$
Пентадеканска киселина	C15:0	$0,19 \pm 0,02$
Пентадеценска киселина	C15:1	$0,02 \pm 0,00$
Палмитинска киселина	C16:0	$1,78 \pm 0,03$
Палмитолеинска киселина	C16:1	$0,09 \pm 0,02$
Маргаринска киселина	C17:0	$0,10 \pm 0,01$
Хептадеценска киселина	C17:1	$0,02 \pm 0,01$
Стеаринска киселина	C18:0	$0,99 \pm 0,03$
<i>trans</i> -олеинска киселина	C18:1	$0,32 \pm 0,01$
<i>cis</i> -олеинска киселина	C18:1	$1,98 \pm 0,05$
<i>trans</i> -линолна киселина	C18:2	$2,01 \pm 0,05$
<i>cis</i> -линолна киселина	C18:2	$0,79 \pm 0,15$
Линоленска киселина	C18:3	$0,03 \pm 0,01$
гама линоленска киселина	C18:3	$0,09 \pm 0,02$
Арахинска киселина	C20:0	$0,22 \pm 0,01$
Еикосенска киселина	C20:1	$0,12 \pm 0,04$
Еикосадиенска киселина	C20:2	$1,14 \pm 0,03$
Хенеикосанска киселина	C21:0	$0,10 \pm 0,01$
<i>cis</i> -11,14,17-еикосатриенска киселина	C20:3	$0,08 \pm 0,00$
<i>cis</i> -8,11,14-еикосатриенска киселина	C20:3	$0,08 \pm 0,00$
Арахидонска киселина	C20:4	$0,86 \pm 0,01$
Еликосапентаенска киселина	C20:5	$0,18 \pm 0,01$
Бехенска киселина	C22:0	$0,36 \pm 0,04$
Еручна киселина	C22:1	$0,14 \pm 0,02$
Докосадиенска киселина	C22:2	$0,27 \pm 0,01$
Докосахексаеноична киселина	C22:6	$1,18 \pm 0,04$
Трикосанска киселина	C23:0	$0,35 \pm 0,04$
Лигноцеринска киселина	C24:0	$0,36 \pm 0,02$

Испитивана гљива је богата и органским киселинама (Табела 27). Идентификовано је укупно 10 киселина, међу којима је најзаступљенија била јабучна ($51,43 \pm 1,18$ mg/kg) и то три пута заступљенија у односу на лимунску и малеинску, осам пута у односу на оксалну, око 30 пута у односу на хининску и пропионску

киселину, око 40 пута у односу на млечну и пирогрођану, око 50 пута у односу на фумарну и око 100 пута у односу на шикимску киселину.

Табела 27. Садржај органских киселина у гљиви *Lenzites betulinus*

Огранске киселине	<i>Lenzites betulinus</i> (mg/kg)
Лимунска киселина	 17,79 ± 0,17
Малеинска киселина	 16,30 ± 0,35
Јабучна киселина	 51,43 ± 1,18
Пирогрођана киселина	 1,15 ± 0,02
Шикимска киселина	 0,48 ± 0,01
Млечна киселина	 1,29 ± 0,02
Пропионска киселина	 1,55 ± 0,04
Хининска киселина	 1,59 ± 0,03
Оксална киселина	 8,10 ± 0,08
Фумарна киселина	 1,02 ± 0,02

У Табели 28 су приказани резултати спектрофотометријског одређивања полифенолних једињења у ацетонском, воденом и етанолном екстракту гљиве *L. betulinus*. Резултати укупних фенола у испитиваним екстрактима гљиве су показали да је ацетон био најефикаснији растварач за њихову екстракцију (45,83 ± 5,83 mg GAE/g), док се као најслабији растварач показао етанол, где је укупна количина фенола износила 27,50 ± 2,33 mg GAE/g. Највећа количина укупних флавоноида у екстрактима гљиве је добијена у ацетонском екстракту (21,43 ± 0,14 mg RUE/g), а најмања количина у етанолном екстракту (1,61 ± 0,11 mg RUE/g).

Табела 28. Укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*

Екстракти	Садржај укупних фенола ^а	Садржај укупних флавоноида ^б
Ацетон	45,83 ± 5,83	21,43 ± 0,14
Вода (dH ₂ O)	29,83 ± 2,00	6,81 ± 0,03
Етанол	27,50 ± 2,33	1,61 ± 0,11

^а mg еквивалента галне киселине (GAE)/g екстракта

^б mg еквивалента рутина (RUE)/g екстракта

Поред укупног садржаја фенола и флавоноида, одрађен је и њихов профил у циљу идентификације секундарних метаболита у ацетонском, етанолном и воденом екстракту. Резултати UHPLC-DADMS/MS анализе су показали да је гљива јако богата полифенолима и идентификовано је укупно 24 једињења (Табела 29). Од фенолних киселина, у свим испитиваним екстрактима у највишој концентрацији (mg/kg) је била присутна хлорогенска киселина ($121,24 \pm 0,25$ за ацетонски, $128,37 \pm 0,21$ за етанолни и $114,82 \pm 3,28$ за водени екстракт), а затим циметна ($4,37 \pm 0,11$ за ацетонски, $4,14 \pm 0,10$ за етанолни и $3,36 \pm 0,14$ за водени екстракт), гална ($1,35 \pm 0,02$ за ацетонски, $1,33 \pm 0,02$ за етанолни, $1,12 \pm 0,02$ за водени екстракт), ванилинска ($1,34 \pm 0,01$ за ацетонски, $1,26 \pm 0,01$ за етанолни, $1,32 \pm 0,03$ за водени) и сиригинска ($1,28 \pm 0,01$ за ацетонски, $1,12 \pm 0,01$ за етанолни, $1,07 \pm 0,03$ за водени екстракт) киселина. Од флавоноида су у највећим концентрацијама (mg/kg) били присутни: кверцетин ($3,26 \pm 0,05$ за ацетонски, $3,14 \pm 0,06$ за етанолни, $3,02 \pm 0,04$ за водени екстракт), кверцетин 3-О-рамнозид ($2,29 \pm 0,02$ за ацетонски, $2,17 \pm 0,02$ за етанолни, $2,00 \pm 0,03$ за водени екстракт), катехин ($1,95 \pm 0,06$ за ацетонски, $1,99 \pm 0,03$ за етанолни и $1,81 \pm 0,09$ за водени) и кверцетин -3-О-глукозид ($1,59 \pm 0,01$ за ацетонски екстракт).

Табела 29. Полифенолни састав ацетонског, етанолног и воденог екстракта гљиве *Lenzites betulinus*

Полифеноли (mg/kg)		Врста екстракта		
		ацетонски	водени	етанолни
Фенолне киселине	Протокатехинска киселина	$0,83 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
	Хлорогенска киселина	$121,24 \pm 0,25$	$114,82 \pm 3,28$	$128,37 \pm 0,21$
	<i>p</i> -хидроксibenзова киселина	$0,40 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,00$
	<i>p</i> -хидроксифенилсирћетна киселина	$0,22 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$
	Кафеинска киселина	$0,16 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
	Ванилинска киселина	$1,34 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,01$
	Сиригинска киселина	$1,28 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,01$
	Салицилна киселина	$0,44 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$
	<i>p</i> -кумаринска киселина	$0,55 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$
	Синапинска киселина	$0,12 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
	Ферулинска киселина	$0,76 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,02$
	Циметна киселина	$4,37 \pm 0,11$	$3,36 \pm 0,14$	$4,14 \pm 0,10$
	Гална киселина	$1,35 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,02$
	Катехин	$1,95 \pm 0,06$	$1,81 \pm 0,09$	$1,99 \pm 0,03$
Флавоноиди	Кверцетин	$3,26 \pm 0,05$	$3,02 \pm 0,04$	$3,14 \pm 0,06$
	Кверцетин -3-О-глукозид	$1,59 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$
	Кверцетин 3-О-рамнозид	$2,29 \pm 0,02$	$2,00 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,02$
	Рутин	$0,53 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,01$
	Изорхамнетин 3-О-рутинозид	$0,14 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,01$
	Нарингенин	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
	Кемферол 7-О-глукозид	$1,59 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,05$
	Флорицин	$0,93 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,02$
	Ериодиктиол	$0,06 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,01$
	Флоретин	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,01$

5. ДИСКУСИЈА

Геномско оштећење/геномска нестабилност лимфоцита периферне крви пацијената са КВБ може бити узрокована различитим егзогеним и ендегеним факторима у свакодневном животу, као што су климатске промене, стрес, брз начин живота, неадекватна исхрана, пушење цигарета, хиперхолестеролемија, артеријска хипертензија, терапија лековима, рендгентско снимање, UV зрачење и присуство пратећих хроничних болести попут дијабетеса типа 2 (Tubbs и Nussenzweig, 2017; Bays и сар., 2021; Münzel и сар., 2022). У овој дисертацији је коришћен комет тест за утврђивање нивоа ДНК оштећења, која се могу манифестовати као прекиди ДНК ланаца и алкално лабилна места и ЦБМН тест за утврђивање фреквенце хромозомских абериација, у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом (нестабилна ангина пекторис и акутни инфаркт миокарда), срчаном инсуфицијенцијом и здравих контролних особа.

Пацијенти са КВБ имали су значајно већи ниво оштећења како на нивоу молекула ДНК тако и на нивоу хромозома у лимфоцитима периферне крви у односу на здраве особе (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023, 2024). До сличних резултата су дошле и друге студије које су показале повећан ниво ДНК оштећења (Demirbag и сар., 2005; Bhat и Gandhi, 2018, 2019) и хромозомских абериација (Murgia и сар., 2007; Bhat и сар., 2013, Fenech и сар., 2021) у лимфоцитима пацијената са КВБ. Такође је показано да кардиоваскуларни пацијенти са повећаним психосоцијалним стресом имају и повећано оксидационо оштећење молекула ДНК, односно долази до повећаног ослобађања катехоламина који изазива оксидациони стрес и узрокује кардиотоксичност (Waller и сар., 2020). Оксидациони стрес може бити главни узрочни механизам оштећења молекула ДНК код КВБ (Yang и сар. 2017). Пролиферација ћелија у културама је процењена израчунавањем NDI-а, што указује на просечан број ћелијских циклуса (Fenech, 2020). Код пацијената са КВБ, NDI је био значајно нижи у односу на здраве особе (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023), што се може објаснити чињеницом да ћелије које се спорије деле имају већу фреквенцу абериација. Посматрајући ниво ДНК оштећења и фреквенцу МН унутар испитиваних група пацијената, пацијенти са акутним коронарним синдромом су имали значајно већи ниво ДНК оштећења као и значајно већу фреквенцу хромозомских абериација од здравих особа (Tubić Vukajlović и сар., 2021a). Ови резултати су у сагласности са Botto и сар. (2002) и Erdoğan и сар. (2024) који су показали значајно већи ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са коронарним болешћу у односу на здраве контролне особе. Такође су и други аутори (Bhat и сар., 2013; Bhat и Gandhi, 2017, 2018; Møller и сар., 2020) показали значајно повећан ниво ДНК оштећења и повећану фреквенцу хромозомских абериација код пацијената са коронарним болешћу, што повезују са озбиљношћу болести и проходношћу срчаних путева. Примећено је да ниво липидних пероксида расте са тежином коронарних болести, па се сматра да појачана липидна пероксидација код пацијената са озбиљним акутним коронарним синдромом доводи до нарушавања равнотеже између оксиданаса/антиоксиданаса, а смањена активност антиоксидационих ензима резултира повећаним нивоом оксидационог оштећења молекула ДНК (Honda и сар., 2000). Такође је показано да су пацијенти са акутним инфарктом миокарда имали значајно веће оштећење на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома од пацијената са нестабилном ангином пекторис, односно повећан проценат оштећених ћелија (класе комета 1, 2, 3 и 4) и повећану фреквенцу МН (Tubić Vukajlović и сар., 2021a), што је у сагласности са Demirbag и сар. (2005) који

су комет тестом показали значајно већи ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са акутним инфарктом миокарда него код пацијената са нестабилном ангином пекторис, што је било у позитивној корелацији са концентрацијом D-димера, тропонином и CRP-ом. Bhat и сар. (2013) су показали да се оштећење ДНК не разликује код инфаркта миокарда са елевацијом СТ сегмента и инфаркта миокарда без елевације СТ сегмента, као ни код пацијената са стабилном или нестабилном ангином пекторис. Ergoğlu и сар. (2024) су показали јаку корелацију између нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са коронарним болешћу и SYNTAX скорa (ангиографски индикатор за одређивање сложености КВБ).

Још један циљ ове дисертације је био да се испита ефекат укупне дозе јонизујућег зрачења приликом коронарне ангиографије на ниво геномске нестабилности у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом. Познато је да је ангиографија коронарне компјутерске томографије високо прецизна неинвазивна дијагностичка метода за коронарне артеријске болести, али постоји забринутост у вези са потенцијалним геномским оштећењем узрокованим јонизујућим зрачењем које се користи током процедуре (Mohammed и сар., 2024). Јонизујуће зрачење има довољно енергије да отпусти електроне из атома и молекула разбијањем ковалентних веза и када ступи у интеракцију са људским телом, структура његових молекула се може променити. ДНК се сматра главном метом јонизујућег зрачења, јер може да ступи у интеракцију са молекулом ДНК директно или индиректно (Dizdaroglu и Jaruga, 2012). Људски организам је веома осетљив и на мале дозе јонизујућег зрачења, пре свега због кумулативног ефекта током живота због чега се јавља појачан генотоксични ефекат на молекул ДНК (Santivasi и Xia, 2014). Кумулативни ефекат јонизујућег зрачења зависи од укупне примљене дозе, па при већим дозама су веће промене у генетичком материјалу. Доза од 50 mGy је доза професионалне изложености и сматра се најмањом доказаном дозом која може изазвати промене у геному ако се примењује током године (Ulsh, 2015). Дозе од 2 до 10 Gy примљене у кратком временском периоду изазивају смрт у 50% случајева, док доза од 1 Gy, такође примљена у кратком периоду, доводи до радијационе болести коју карактеришу мучнина, губитак косе и еритем тела (Garaei и сар., 2011). Дозе веће од 10 Gy приликом озрачивања целог тела, без обзира на време излагања, изазивају смрт за неколико недеља (Harrison и сар., 2021). Доза која се даје пацијентима током дијагностичких и терапијских интервентних поступака је неизбежна и посебно је прописана за сваког пацијента, али зависи и од времена изложености дијагностичкој процедури (Basheerudeen и сар., 2017).

Ниво ДНК оштећења и фреквенце хромозомских аберација у лимфоцитима пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије су били значајно већи него пре коронарне ангиографије (Tubić Vukajlović и сар., 2021a), што се може објаснити кумулативним ефектом доза X-зрачења током те дијагностичке процедуре. Basheerudeen и сар. (2017) су показали да су повећан ниво ДНК оштећења и фреквенце хромозомских аберација повезане са дозом X-зрачења током коронарне ангиографије, односно, закључили су да постоји дозно зависно повећање броја мутација. До сличних резултата су дошли и Mohammed и сар. (2024) који су показали значајно већи ниво ДНК оштећења код пацијената након 24 сата од излагања зрачењу приликом коронарне ангиографије, као и значајно већи ниво 8-OhdG (*енгл.* 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), који је маркер оксидационог стреса. Demirbag и сар. (2007) су показали да повећање ДНК оштећења након коронарне ангиографије може зависити од тежине болести коронарних артерија и њихове проходности, док су нешто раније,

Andreassi и сар. (2002) показали повећање нивоа једноланчаних прекида ДНК, Fpg и ендонуклеазе III осетљивих места у лимфоцитима пацијената након перкутане транслуминарне коронарне ангиопластике. И друге студије су показале да се ниво ДНК оштећења и измењена експресија гена повећала код пацијената након јонизујућег зрачења (Azimi и сар., 2017; Visweswaran и сар., 2019; Hussein и сар., 2022; Zabarnawi 2024). Међутим, сва ДНК оштећења која се детектују комет тестом не морају да пређу у хромозомске аберације (Azimi и сар. 2017). Ниво ДНК оштећења и хромозомских аберација значајно се разликовао код пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда након коронарне ангиографије, док се NDI није значајно разликовао код истих пацијената након коронарне ангиографије (Tubić Vukajlović и сар., 2021a).

Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом и смањеном EF ($\leq 40\%$) имали су значајно већи ниво ДНК и хромозомских оштећења у односу на здраве особе. NDI код ових пацијената је био значајно нижи од NDI-а код здравих особа (Tubić Vukajlović и сар., 2023), што се опет може објаснити чињеницом да је мања вероватноћа да ћелије са већим хромозомским аберацијама улазе у ћелијску деобу. Значајно већу фреквенцу МН код ових пацијената у односу на контроле су утврдили и Murgia и сар. (2007), применом МН теста, док су Kaplan-Meier анализом показали значајно краћи животни век пацијената са КВБ који су имали већу фреквенцу хромозомских аберација у односу на оне са нижом фреквенцом. Botto и сар. (2002) и Demirbag и сар. (2005) су показали да су геномска оштећења повећана код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, док је ниво укупног антиоксидационог капацитета смањен код истих пацијената. Такође је запажено и повећање ДНК оштећења (%ДНК у репу, репни моменат и дужина репа) код пацијената са коронарном артеријском болешћу, што је у корелацији са смањеним антиоксидационим статусом (Bhat и Gandhi, 2019). Dai и сар. (2024) сугеришу да процена оштећења молекула ДНК може одредити какве ће бити последице код пацијената, као и да је квантификација оштећења ДНК корисна за добијање одговора при лечењу и утврђивању дугорочних исхода пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и смањеном EF без обзира на основне болести срца. Доступни литературни подаци указују да је геномска нестабилност изазвана оксидационим стресом релевантан фактор у развоју атеросклеротског плака и његових акутних компликација (Andreassi, 2003; Mercer и сар., 2007). Оштећење молекула ДНК је присутно у атеросклеротичном плаку човека, а оштећења се крећу од „макро“, укључујући делецију или дупликацију целих хромозома или фрагмената, до „микро“ оштећења која укључују губитак хетерозиготности и микросателитне нестабилности (мутације у ДНК регионима које утичу на генску експресију), преломи ланца ДНК и модификације ДНК (укључујући оксидацију), (Shah и Bennett, 2017).

Један од најчешћих узрока срчане инсуфицијенције је инфаркт миокарда који је изазвао патолошко ремоделирање срца (Yamaguchi и сар., 2015). Штавише, Torabi и сар. (2014) су показали да су пацијенти после инфаркта миокарда подложнији развоју акутне срчане инсуфицијенције, јер је њихов исхемијски терет често потцењен. Утврђена је разлика у средњим вредностима биомаркера процењиваних на нивоу ДНК и хромозомских оштећења између пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и акутним коронарним синдромом, односно, пацијенти са дијагностикованом срчаном инсуфицијенцијом имали су значајно већа геномска оштећења од пацијената са дијагностикованим акутним коронарним синдромом. У литератури постоје подаци да инфаркт миокарда или хроничне исхемијске болести срца представљају познати предиспонирајући фактор за развој или погоршање стања срчане инсуфицијенције.

Такође, пацијенти који су имали NSTEMI много чешће оболевају од срчане инсуфицијенције у старијој животној доби (Siddiqui и Holzmann, 2019), што може помоћи у разумевању незначајне разлике у геному пацијената са акутним инфарктом миокарда и срчаном инсуфицијенцијом. Такође, патофизиолошке промене као што су смањена осетљивост на β -адреналински рецептор, повећан ниво реактивних врста кисеоника, продужено трајање акционог потенцијала, повећана крутост кардиомиоцита и смањена усклађеност миокарда имају значајну улогу у настанку и развоју срчане инсуфицијенције (Lv и сар., 2024).

Геномско оштећење/геномска нестабилност је кључни фактор за старење, али се не зна довољно о утицају пола и евентуалним специфичним разликама у хуманом геному. Резултати ове студије показали су незначајну разлику у променама унутар генома (на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома) између женских и мушких пацијената као и у узорку здравих особа (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023), што је у сагласности са резултатима Bhat и сар. (2013) и Pastor-Sierra и сар. (2023), а што указује на сличан одговор на услове изложености код оба пола. Жене су имале незначајно већи ниво ДНК оштећења и незначајно већу фреквенцу хромозомских аберација од мушкараца, што је у складу са студијом Mihaljević и сар. (2022), који су показали незначајно већи ниво ДНК оштећења код жена у односу на мушкарце у узорку пацијената са дијагностикованим COVID-19. Генерално, у литератури постоје различити резултати о полним разликама на нивоу ДНК оштећења. Erdoğu и сар. (2024) су комет тестом анализирали пацијенте са коронарном артеријском болешћу и то 43 пацијента (просечне старости $59,40 \pm 11,30$) и 17 пацијенткиња (просечне старости од $68,60 \pm 8,10$) и показали да мушкарци имају значајно већи ниво ДНК оштећења од жена. Сматра се да се разлике у нивоу ДНК оштећења могу објаснити физиолошким разликама или различитим изложеностима ендогеним и/или екзогеним факторима (Møller, 2019). Pastor-Sierra и сар. (2023) су ЦБМН тестом показали да је старост значајно допринела повећању фреквенце хромозомских аберација, док утицај пола није био значајан, жене су имале незначајно већу фреквенцу МН. Код жена током старења је смањена експресија BLM, ATM и KU70 протеина, док се ниво протеина LIG4, XRCC4, LIG3 и FEN1 није мењао са годинама старости (Rall-Scharpf и сар., 2021). КВБ су релативно ретке код жена пре менопаузе, због заштитног дејства естрогена, осим када жене имају дијабетес или хиперлипидемију (Shirato и Swan, 2010), због чега су изабране пацијенткиње у овој студији биле старије од 50 година и биле су у менопаузи.

Већина пацијената у оквиру ове студије су били пушачи или бивши пушачи током дужег временског периода. Углавном су пушили око 20 цигарета дневно током последњих 20 до 40 година. Упркос добро познатом присуству канцерогена у дуванском диму (Vageli и сар., 2022; Peterson и сар., 2024), резултати у научној литератури који повезују навике пушења са фреквенцом хромозомских аберација су прилично контроверзни. Резултати комет и ЦБМН теста су показали да код пацијената са КВБ није било значајне разлике у оштећењу генома пушача и непушача, пушача и бивших пушача, као ни између бивших пушача и непушача. Код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом који су били непушачи запажена је значајно већа фреквенца МН у односу на пацијенте пушаче (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023), што је у сагласности са студијом коју су спровели Bonassi и сар. (2003) и показали да пушачи немају повећану фреквенцу МН у поређењу са непушачима, али да је код тежих пушача запажена значајно повећана фреквенца МН (преко 30 цигарета дневно), при чему нису били изложени познатим агенсима. Међутим, код здравих особа пушење је значајно

утицало на повећање нивоа ДНК оштећења, али не и на повећање фреквенце МН, док су пацијенти са акутним коронарним синдромом, који су били пушачи, имали значајно повећан ниво ДНК оштећења и повећану фреквенцу МН (Tubić Vukajlović и сар., 2021a). До сличних резултата су дошле и друге студије, које су показале да пушење повећава ниво ДНК оштећења у лимфоцитима, као и оксидациони стрес код здравих особа не само кроз производњу реактивних врста кисеоника у дуванском диму, већ и кроз слабљење антиоксидационих одбрамбених система (Alsatari и сар., 2012; Mihaljević и сар. 2022). Larocca de Geus и сар. (2018) и Balraj и сар. (2020) су показали повећану фреквенцу МН у ћелијама букалне слuzнице пушача у односу на непушаче.

Fandos и сар. (2009) су показали да је хипертензија најзначајнији показатељ оксидационог стреса код пацијената са високим ризиком од КВБ, где кључну улогу игра појачан ренин-ангиотензин-алдостерон систем. Хипертензија је присутна у 60-70% светске популације старије од 60 година и може довести до компликација КВБ (Subash, 2016), одговорна је за око 11 милиона смртних случајева годишње у свету (Kreutzmann и сар., 2023). Fuchs и сар. (2020) су показали да је висок крвни притисак значајан фактор ризика за срчану инсуфицијенцију, атријалну фибрилацију, хроничну болест бубрега, болести срчаних залистака, аортне синдроме и деменцију, поред коронарне болести срца и možданог удара. У овој студији, резултати су показали да су хипертоничари, као и пацијенти са позитивном породичном анамнезом за КВБ, имали већи ниво геномског оштећења од нормотензивних и пацијената са негативном породичном анамнезом, али вишеструком линеарном регресионом анализом није показано да су били главни предиктори за повећан ниво ДНК оштећења и повећану фреквенцу хромозомских абериација (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023). Ови резултати су у складу са резултатима Subash (2016) и Hazukova и сар. (2024) који су показали да се оксидационо ДНК оштећење јавља код хипертензивних пацијената више него код испитаника са нормалним крвним притиском и да се оксидационо оштећење молекула ДНК значајно редукује применом антихипертензивних лекова у периоду од годину дана. Kreutzmann и сар. (2023) су показали повећан системски оксидациони стрес, али не и повећану фреквенцу хромозомских абериација код хипертензивних пацијената у односу на нормотензивне пацијенте, што су објаснили великом диспропорцијом у броју контрола и пацијената ($n = 6$, $n = 64$).

Потврда срчаних биомаркера је једно од најважнијих открића у погледу утврђивања фактора ризика за КВБ. Срчани тропонин-Т се користи као веома осетљив и специфичан маркер за детекцију оштећења миокарда (Feldman и сар., 2011). Нивои тропонина су били значајно виши код пацијената са акутним инфарктом миокарда него код пацијената са нестабилном ангином пекторис, што је у позитивној корелацији са ДНК оштећењем и хромозомским абериацијама. Тропонин се показао и као главни предиктор ДНК оштећења и хромозомских абериација код пацијената са акутним инфарктом миокарда (Tubić Vukajlović и сар., 2021a). Повећан ниво proBNP и тропонина значајно је утицао на повећање нивоа ДНК оштећења и фреквенце хромозомских абериација у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (Tubić Vukajlović и сар., 2023). ProBNP се користи за потврђивање дијагнозе срчане инсуфицијенције, пружање прогностичких информација и одређивање терапије код пацијената, као и за разумевање механичких путева постојећих терапеутика. Ibrahim и сар. (2018) су показали да су високе концентрације тропонина биле присутне код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом чак и у одсуству исхемијске болести срца, као и без конвенционалног инфаркта миокарда.

Повишен ниво триглицерида је кључна карактеристика у развоју коронарних болести срца, али и метаболичких абнормалности, укључујући породичну хиперхолестеролемију, липодистрофију, дијабетес типа I и II, хипертензију, метаболички синдром и гојазност, као и хроничну болест бубрега (Truong и сар., 2017). Повишен ниво холестерола и триглицерида у крви није показао директни утицај на повећан ниво ДНК оштећења и фреквенцу хромозомских аберација у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023), што је у сагласности са Landi и сар. (2000) који су показали да биохемијски параметри (холестерол, триглицериди и електролити) нису утицали на повећање фреквенце хромозомских аберација. Међутим, Jung и сар. (2023) су показали да су пацијенти са хипертриглицеридемијом имали повећан ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви, што је посредовано активацијом каспазе-2 и -8, а каспаза-8 је деловала као узводни молекул каспазе-2. Познато је да је метаболизам липида јако комплексан и да се липиди у интестиналним ћелијама везују са протеинима формирајући комплекс аполипопротеин и стварају хиломикроне богате триглицеридима. Заједно се секретују у лимфу и транспортују до јетре, где се са ендогено синтетисаним триглицеридима и холестеролом секретују у циркулацију. Висок ниво LDL је повезан са високим ризиком за настанак коронарних болести (Truong и сар., 2017).

Уреа и креатинин су се показали као предиктори ДНК оштећења и хромозомских аберација код пацијената са коронарном болешћу и срчаном инсуфицијенцијом (Tubić Vukajlović и сар., 2021a, 2023). Erdoğan и сар. (2024) су показали значајну позитивну корелацију између нивоа ДНК оштећења и урее, креатинина и гликозилираног хемоглобина A1c (HbA1c). Познато је и да је ниво 8-OHdG повећан у серуму и миокарду пацијената са дијагностикованом срчаном инсуфицијенцијом (Kobayashi и сар., 2011). Код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, глукоза се показала као предиктор ДНК и хромозомских оштећења (Tubić Vukajlović и сар., 2023). КВБ и дијабетес су у већини случајева повезани, па је логично претпоставити да би повишен ниво глукозе у крви у одређеној мери могао бити значајан за развој срчаних и васкуларних болести (Poznyak и сар., 2022). Глукоза је у стању да директно штети ендотелном или атеросклеротском плаку крвних судова, посредована неензимском гликозилацијом LDL холестерола и других аполипопротеина и фактора згрушавања крви (Leon и Maddox, 2015). Многи аутори су показали да пацијенти са дијагностикованом шећерном болешћу (Diabetes mellitus, тип 1 и 2) имају и повећану фреквенцу хромозомских аберација и повећан ниво ДНК оштећења (Palazzo и сар., 2012; Mihaljević и сар., 2018; Pappaswamy и сар., 2020; Eremina и сар., 2021).

Повећаном нивоу ДНК и хромозомских оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом услед смањене EF, могло је допринети и деловање лекова које су ови пацијенти пили. Упркос томе што имају антиоксидациона и протективна својства (Rastogi и сар., 2012; Demirci и сар., 2014), лекови могу бити и генотоксични (Andreassi и сар., 2005) што имплицира да третман лековима код КВБ може да изазове геномско оштећење. Одређене групе лекова (АСЕ-инхибитори, бета блокатори, диуретици и статини) су корелисале са повећаним нивоом ДНК оштећења и повећаном фреквенцом хромозомских аберација у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом (Tubić Vukajlović и сар., 2021a), док код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом лекови појединачно (осим АСЕ-инхибитора) нису значајно повећали ниво геномског оштећења, али се дужина терапијског третмана показала као предиктор за повећан

ниво ДНК оштећења и повећану фреквенцу хромозомских аберација (Tubić Vukajlović и сар., 2023), па из тог разлога не треба занемарити ни генотоксичну природу лекова. Bhat и Gandhi (2017) су одрадили велику студију на 400 пацијената са КВБ и показали да су пацијенти који су пили лекове из групе бета блокатора, АСЕ-инхибитора и антиагрегациону терапију имали значајно већи ниво ДНК оштећења у односу на пацијенте који су пили лекове из групе вазодилататора. Møller и сар. (2020) су показали да на повећање нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са коронарним артеријским болестима, поред саме болести велики утицај имају и лекови који су преписивани тим пацијентима.

Постоје бројни природни производи, на бази гљива, који се користе као традиционална алтернативна медицина за лечење КВБ (Chugh и сар., 2022). Макромиците поседују специфичан метаболизам који продукује велики број разноврсних једињења (попут фенола, пептида, сложених полисахарида и њихових комплекса, хетероцикличних молекула, терпена и токсина) и представљају важан извор биолошки активних једињења са заштитним и антиоксидационим дејством, због синтезе фенола, токоферола, каротеноида, аскорбинске киселине и других једињења. Поред фармаколошких особина, гљиве су све значајније у исхрани људи због својих нутритивних својстава, високог садржаја протеина и ниског садржаја масти (Erbia и сар., 2023). Неке макромиците су показале хипотензивни ефекат код високог крвног притиска (Guillamón и сар., 2010; Tran и сар., 2014). Присуство биоактивних једињења у гљивама, које имају различита фармаколошка својства, може бити релевантно у лечењу атеросклерозе (Sevendik и сар., 2021).

Гљива, *L. betulinus*, која је била предмет изучавања ове докторске дисертације нема никакву вредност као храна, али постоје различите студије о њеној медицинској употреби. Било је неколико студија о различитим активностима екстракта ове гљиве, као што су: антиоксидациона, имunosупресивна (Liu и сар., 2012; Milovanović и сар., 2015; Udeh и сар., 2021), антитуморска (Liu и сар., 2014; Nandi и сар., 2024), антимикробна (Liu и сар., 2014), антифунгална (Milovanović и сар., 2015), антихипергликемијска (Hussin и сар., 2016), антихипертензивна (Hardin и сар., 2017) и антибактеријска (Udeh и сар., 2021). Комбинација ових својстава може значајно смањити ризик од неких здравствених проблема и повећати терапеутске вредности гљиве.

У овој дисертацији је испитивана генопротективна активност и фитохемијски састав гљиве *L. betulinus*. Ове студије су постале једно од истраживачких жаришта научника широм света. Слична истраживања на овој врсти нису рађена, тако да резултати ове студије представљају новину у овој области истраживања. Резултати су показали да ниједан од екстракта (ацетонски, етанолни и водени) није идентификован као генотоксичан код здравих особа. Испитиван је и ефекат различитих екстракта код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом, јер је показано да пацијенти имају веће оштећење генома у односу на здраве особе. У *in vitro* условима, у лимфоцитима пацијената, све испитиване концентрације ацетонског екстракта и веће концентрације етанолног и воденог екстракта (100, 150 и 200 µg/ml) значајно су редуковале ниво ДНК оштећења, у поређењу са терапијом-индукованим или зрачењем-индукованим нивоом геномског оштећења, делујући генопротективно (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Пошто не постоје литературни подаци о генотоксичном потенцијалу различитих екстракта испитиване гљиве, ови резултати су упоређени са сродним врстама из рода *Trametes*. Ранија истраживања су показала да се *T. versicolor*,

T. hirsute и *T. gibbosa* могу сматрати јаким антигенотоксичним агенсима који могу да стимулишу генопротективни одговор ћелија. Кнежевић и сар. (2015) су, применом комет теста, показали да ове три сродне врсте нису проузроковале значајан пораст ДНК оштећења, односно показали су одсуство генотоксичног ефекта, али и значајан антигенотоксични ефекат против H_2O_2 -индукованог ДНК оштећења у хуманим леукоцитима здравих особа. Иначе, механизми који су у основи антигенотоксичног дејства екстракта гљива још увек нису у потпуности познати. Сматра се да се протективни ефекат екстракта заснива на више механизма деловања, што није реткост за гљиве (Santos и сар., 2008). Генопротективно деловање екстракта може се објаснити чињеницом да је екстракт деловао на ћелије са великом количином генетских оштећења код пацијената и превео их у природне процесе апоптозе, што би био основни механизам одржавања нормалне ћелијске хомеостазе (Tanveer и сар., 2023).

Недостатак нутријената је један од главних узрока геномске нестабилности код људи, јер одређени витамини (С, Е, В2, В3, В6 и В12), минерали (цинк, гвожђе, магнезијум, манган, калцијум и селен), полифеноли и фолати имају важну улогу као супстрат или кофактор у репликацији и репарацији молекула ДНК, као и у одбрамбеним механизмима укључених у неутрализацију ендогених и егзогених генотоксина (Fenech и сар. 2023). Уопштено говорећи, гљиве садрже велике количине протеина, са важним садржајем есенцијалних аминокиселина, али мало масти, као и велику количину угљених хидрата, минерала и витамина (Valverde и сар., 2015).

Гљива *L. betulinus* је одличан извор есенцијалних елемената. Људско тело захтева уношење најмање 23 минерална елемента, а дневне потребне количине минералних хранљивих материјала су мале, посебно у поређењу са угљеним хидратима и липидима (Quintaes и Diez-Garcia, 2015). Већина потребних хемијских елемената обезбеђује се исхраном, па је њихов редован унос важан за одржавање општег здравља. Садржај минерала у гљивама је знатно већи него у биљкама (Ouzouni и сар., 2007), али како показују резултати, да би се задовољиле дневне потребе организма за минералима, човек треба да унесе велику количину гљиве, па се зато саветује да се користе као додатак исхрани. Од минерала, међу макроелементима, најзаступљенији у гљиви био је фосфор, а нешто мање калијум, натријум, калцијум и сумпор (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Према досадашњим сазнањима, минерали као што су натријум, калијум, магнезијум, калцијум, гвожђе, сумпор, фосфор, манган, кобалт, бакар, цинк, селен и молибден се сматрају битним елементима, неопходним за нормално функционисање тела (Zoroddu и сар., 2019; Zhou и сар., 2024). У испитиваној гљиви били су присутни и цинк и селен (Tubić Vukajlović и сар., 2024), за које је утврђено да редукују ниво ДНК и хромозомских оштећења у лимфоцитима људи (Fenech и сар. 2023). Цинк је есенцијални елемент у траговима неопходан за одржавање оптималног људског здравља и геномске стабилности. Кључна улога му је у регулацији механизма поправке ДНК, пролиферације ћелија, диференцијације и апоптозе укључујући деловање различитих транскрипционих фактора ДНК или РНК полимераза (Sharif и сар., 2012). Такође, гљива је садржала високу концентрацију калијума и двоструко нижу концентрацију натријума (Tubić Vukajlović и сар., 2024), што сугерише да се *L. betulinus* може користити у антихипертензивној терапији и терапији КВБ која је међу најчешћим узроцима смрти у свету (Gençcelер и сар., 2009). Препоручује се у медицини и због њиховог хипохолестеролемијског дејства и потенцијалне модификације ризика од настанка плака и инфаркта миокарда (Krittanawong и сар., 2021).

Природни полисахариди су веома важна класа биолошких макромолекула у гљивама, који се састоје од алдоза и кетоза преко гликозидних веза и представљају основне супстанце које ефикасно одржавају и обезбеђују нормалан рад биолошких активности (Song и сар., 2019; Lei и сар., 2021). Моносахариди и дисахариди су присутни у малим количинама у макромицетама (Vetter и сар., 2023). Глукоза, фруктоза, галактоза и тураноза били су најзаступљенији шећери у гљиви *L. betulinus*, док су од компоненти шећерног алкохола у највећим концентрацијама били присутни сорбитол и манитол (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Полисахариди врсте *T. versicolor* повећавају вискозност гастроинтестиналног садржаја и редукују кретање нутријената што за последицу има смањење апсорпције глукозе и њеног нивоа у плазми (Lo, 2011). За манитол је познато да је осмотски диуретик, који се користи у лечењу интракранијалне хипертензије (Diringer и сар., 2012). Поред повољних ефеката на церебралну и бубрежну функцију, манитол се у великој мери користи у кардиохирургији, чиме се повећава коронарни проток крви, минутни волумен, регулише се дијастолни притисак и контрактилност леве коморе срца (Feige и сар., 2021). Испитивана гљива се може користити и за лечење дијабетеса, управо због присуства манитола (Tubić Vukajlović и сар., 2024), који се споро и само делимично апсорбује у организму, па смањује пораст глукозе у крви и ниво инсулина (Petrović и сар., 2023b). Hussin и сар. (2016) су показали да водени екстракт *L. betulinus* има хипогликемијско дејство у крви мишева, због присуства сапонина у екстракту.

Оксидација масних киселина је кључни метаболички пут који је повезан са поправком ДНК оштећења (Wang и сар., 2023). У испитиваној гљиви је потврђено присуство 36 масних киселина, међу којима су у највећој концентрацији биле присутне *trans*-линолна, *cis*-олеинска, палмитинска, докосахексаеноична и еикосадиенска киселина (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Sherratt и сар. (2023) су показали да омега-3 масне киселине, еикозапентаенска и докосахексаеноична киселина имају способност да смање резидуални кардиоваскуларни ризик код пацијената који су лечени статинима. Палмитинска киселина испољава антиинфламаторне, антиоксидативне, имунолошке и антитуморске ефекте, са доказаном ефикасношћу против рака желуца, јетре, грлића материце и дојке. Делује на различите интрацелуларне и екстрацелуларне мете, модулирајући сигналне путеве туморских ћелија, укључујући фосфатидилинозитол 3-киназу/протеин киназу Б, ендоплазматични ретикулум, Б ћелијски лимфом-2, p53 и друге сигналне путеве (Wang и сар., 2023). Познато је да линолна киселина, доводи до снижавања холестерола у плазми, смањујући инциденцу болести коронарних артерија, али је потребан унос високих концентрација како би се постигао овај ефекат (Marangoni и сар., 2020).

Од укупно 10 идентификованих органских киселина у сувој материји гљиве *L. betulinus*, у највећој концентрацији су биле присутне јабучна, лимунска и малеинска киселина (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Резултати анализе садржаја органских киселина за испитивану гљиву су по први пут добијени у овој студији, што је од изузетног значаја због вишеструког биолошког ефекта органских киселина. Органске киселине имају антиоксидациона, антиинфламаторна и антиагрегациона својства, па могу допринети потенцијалном заштитом ефекту код исхемијске болести срца (Valentão и сар., 2005). Лимунска киселина има антиоксидациона, антибактеријска (Fernandes и сар., 2016) и антиинфламаторна (Hee-Yeong и сар., 2017) својства, као и лаксативни ефекат који је значајан у терапији КВБ (Ju-Ryun и сар., 2022). Оксална киселина, која је такође била присутна у гљиви, има антибактеријска својства (Kwak и сар., 2016), док је за фумарну киселину потврђена антиинфламаторна, антимикробна и

неуропротективна активност (Baati и сар., 2011). Tang и сар. (2013) у својим експериментима на пацовима као модел организмима су показали да су третмани јабучном и лимунском киселином редуковали величину инфаркта миокарда ($\leq 50\%$), нивоа серума TNF- α и агрегацију тромбоцита. Такође, показали су и да лимунска и јабучна киселина значајно смањују брзину апоптозе као и експресију каспазе-3, а повећавају експресију фосфорилисаног Akt у примарним кардиомиоцитима младунаца пацова који су имали хипоксију. Они су закључили да присуство ових органских киселина као главних састојака може бити одговорно за кардиопротективно дејство и да се не сме занемарити њихов терапијски значај код исхемијске болести срца.

Коришћење гљива смањује ризик од КВБ и због присуства специфичних секундарних метаболита (Krittana Wong и сар., 2021). Највећи број секундарних метаболита поседује особине лека, јер у својој хемијској структури садрже веома значајне функционалне групе, попут хидроксилних, карбоксилних, карбонилних и аминокиселинских група. Молекуларне особине ових једињења, попут њихове молекуларне масе, вредности партиционог коефицијента, броја донора и прималаца водоничних веза, представљају главне лековите карактеристике ових једињења (Al-Khayri и сар., 2023). Познато је више од 8600 врста биоактивних секундарних метаболита гљива, а претпоставља се да производе још око 13000 различитих једињења која поседују неку врсту биолошке активности. У секундарне метаболите гљива спадају хетероциклични молекули, фенолна једињења, поликетиди, стероли, терпени, пептиди, пигменти, токсини и др. (Zhong и Xiao, 2009). Веома важна група секундарних метаболита гљива, која се одликује веома позитивном активношћу за човека, пре свега антиоксидационом, представљају фенолна једињења (Zhou и сар., 2024).

Полифеноли су велика група биоактивних једињења који су развијени као важна група секундарних метаболита, због својих антиоксидационих, антибактеријских, антиалергијских, антиинфламаторних, кардиопротективних и антитуморских својстава (Pérez de la Lastra и сар., 2021). Представљају потенцијалну замену за биоактивне агенсе у фармацеутским и медицинским секторима ради унапређења здравља људи и превенцију и лечење различитих болести (Sun и сар., 2023). Протективни ефекат полифенолних једињења у биосистемама се приписује њиховој могућности хватања слободних радикала, хелатног везивања јона прелазних метала, инхибирања оксидаза и активирања антиоксидационих ензима. Хемијски састав екстракта гљиве одређује његову биолошку активност, која се огледа у јакој или слабијој антиоксидационој, антимицробној, генотоксичној, антитуморској или антипролиферативној активности. Екстракт представља смешу једињења које растварач „извуче“ из ткива гљиве, а биолошка активност екстракта је најчешће резултат удружених дејстава екстрахованих једињења. Коришћени растварач, у зависности од поларности (поларни и неполарни) може да екстрахује различите супстанце (Abubakar и Naqae, 2020). Ацетон, као средње поларни растварач, екстрахује пре свега поларна једињења. Међутим, као слабије поларан од других, често коришћених растварача, попут метанола или етанола, може у одређеној мери да екстрахује и неполарне молекуле. Ацетонским растварачем се најчешће екстрахују алкалоиди, фенолна једињења веће молекулске масе, масне киселине, сапонини, танини, каротеноиди и друга једињења, док се метанолним растварачем најбоље екстрахују фенолна једињења мањих молекулских маса, терпеноиди и лактони (Galanakis и сар., 2011).

Испитивана гљива *L. betulinus* је богата полифенолним једињењима и у сва три екстракта детектовано је 13 фенолних киселина и 11 флавоноида. Од фенолних киселина у највећој концентрацији била је присутна хлорогенска киселина, а затим циметна, гална, ванилинска и сиригинска киселина, док су од флавоноида најзаступљенији били кверцетин, кверцетин 3-О-рамнозид, катехин, кверцетин 3-О-глукозид и кеферол 7-О-глукозид у свим испитиваним екстрактима (Tubić Vukajlović и сар., 2024). Такође је гљива имала богат садржај укупних фенола и флавоноида у ацетонском екстракту, а нешто мањи садржај у воденом и етанолном екстракту. Nowaska и сар. (2015) су у својој студији, која се односи на полифенолни састав етанолног екстракта *L. betulinus*, по први пут идентификовали седам фенолних киселина: ванилинску, сиригинску, протокатехинску, кафеинску, ферулну и салицилну. Међутим, поред ових фенолних киселина, друге фенолне киселине и сви флавоноиди приказани у резултатима су по први пут идентификовани у оквиру ове докторске дисертације. Сличне резултате објавили су и Јанјушевић и сар. (2017) који су анализирали друге сродне врсте. Они су у воденом, етанолном и метанолном екстракту врсте *Trametes versicolor* показали високу концентрацију укупних фенола и ниску концентрацију укупних флавоноида. Такође су идентификовали укупно 38 полифенолних једињења у воденом, етанолном и метанолном екстракту гљиве *T. versicolor*. Сва три екстракта су у највећој концентрацији садржали флавоноид кверцетин, док је *p*-хидроксибензоева киселина била најзаступљенија фенолна киселина.

Хлорогенска киселина, која је била најзаступљенија у испитиваним екстрактима гљиве, у оквиру ове студије, је јако значајна фенолна киселина која има доказано антимикумно, антиоксидационо, антитуморско и неуропротективно дејство, регулише метаболизам глукозе и липида, штити нервни систем и делује на крвне судове (Pérez de la Lastra и сар., 2021; Wang и сар., 2022). Хлорогенска киселина је смањивала фреквенцу хромозомских аберација у хуманим лимфоцитима након излагања рендгенским зрацима (Abraham и сар., 2012) и показала је генопротективну активност у хуманим лимфоцитима након излагања X-зрацима, снижавајући ниво ДНК оштећења (Cinkilic и сар., 2013). Рађена је студија и на мишевима, где је показала радиопротективну активност након излагања смртоносним дозама гама зрачења (HosseiniMehr и сар., 2008). Поред најзаступљеније хлорогенске киселине, у високим концентрацијама је била присутна и циметна киселина за коју је утврђено да смањује ниво ДНК оштећења у хуманим лимфоцитима индукованих H_2O_2 , што се објашњава способношћу везивања гвожђа услед орто-хидрокси групе на ароматичном прстену и самим тим штити молекуле ДНК од утицаја оксидационог стреса (Taner и сар., 2017). Циметна киселина испољава свој заштитни ефекат, смањујући ризик од КВБ, срчане исхемије и хипертрофије и инфаркта миокарда (Mohammadabadi и Jain, 2024), а доказан је и њен антитуморски ефекат на NCI-H460 хуману малигну ћелијску линију (Vaz и сар., 2012). Гална киселина је још једна фенолна киселина која има благотворно дејство на КВБ. Има антилипопероксидациону, антиоксидациону и кардиопротективну активност, повећавајући ниво азот оксида, а смањујући експресију протеина Nox2, ангиотензина II, ензима који конвертује ангиотензин II, CaMKII δ и апоптотичких гена укључујући BAX и ниво p53, као и васкуларне калцификације кроз инхибицију сигналног пута BMP2smad1/5/8 (Akbari, 2020).

Доказано је да су флавоноиди јако значајни у борби против хипертензије, упала, дијабетеса и васкуларних болести (Torres-Fuentes и сар., 2022). Кверцетин је јако користан за КВБ и очување срца, јер омогућава инхибицију LDL оксидације,

вазодилаторске ефекте независно од ендотела, смањује инфламаторне маркере, спречава оксидативно оштећење неурона и упале и постиже антиагрегациони ефекат (Patel и сар., 2018). Побољшава срчану дисфункцију и хипертрофију миокарда, спречава тромбозу, проширује коронарне артерије, ублажава атеросклерозу и смањује ниво липида у крви (Kozłowska и Szostak-Węgierek, 2022). Бројне студије су показале хемопротективну и радиопротективну улогу кверцетина (Devipriya и сар., 2008; Çelik и Arinc, 2010; Mazumdar и сар., 2011). Кверцетин је показао генопротективни ефекат против ДНК оштећења изазваних H_2O_2 у хуманим лимфоцитима применом комет теста, што може бити основа за разумевање антитуморских својстава (Wilms и сар., 2005). Један од заступљенијих флавоноида у гљиви је био и катехин, за који је потврђено да штити од оксидације ДНК и то након 30 дана конзумирања коштица грожђа дошло је до редуковања ДНК оштећења за 67% (Fenech и сар. 2023). Треба напоменути да комбинација фенолних киселина, флавоноида и других природних једињења у екстрактима има већи потенцијал од појединачних компоненти екстракта, што указује на значај њихових интеракција (Granato и сар., 2010).

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

1. Пацијенти са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом имали су повећан терапијом-индукован ниво геномског оштећења/геномске нестабилности у лимфоцитима периферне крви што је детектовано повећаним %ДНК оштећења и индексом генетичког оштећења, повећаном фреквенцом хромозомских аберација и сниженим индексом нуклеусне деобе, а што је у корелацији са здравственим стањем, терапијом и повишеним срчаним биомаркерима (тропонин и proBNP)
2. Укупне дозе јонизујућег зрачења којима су били изложени пацијенти са акутним коронарним синдромом током коронарне ангиографије утицале су на повишен ниво ДНК оштећења, као и на повећану фреквенцу хромозомских аберација у лимфоцитима периферне крви пацијената, али како се након коронарне ангиографије повећава број преживелих са коронарним болестима, њена примена је, упркос ризицима, оправдана
3. Пацијенти са акутним инфарктом миокарда имали су значајно већи терапијом-индукован ниво ДНК оштећења и хромозомских аберација у поређењу са пацијентима са нестабилном ангином пекторис и пре и након коронарне ангиографије
4. Фактори ризика за КВБ као што су године старости, позитивна породична анамнеза, хипертензија, хиперхолестеролемија, терапија лековима, повишени биохемијски маркери, повишен тропонин и proBNP, као и доза зрачења при коронарној ангиографији значајно су повећали фреквенцу промена у геному лимфоцита периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима
5. Ацетонски, водени и етанолни екстракти гљиве *L. betulinus* су показали хемопротективно дејство против терапијом-индукованог ДНК оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом, као и радиопротективно дејство против зрачењем-индукованог оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом. Најјачи ефекат код пацијената је испољио ацетонски екстракт при концентрацијама од 50 до 200 µg/ml.
6. Анализа хемијског састава је показала да је гљива *L. betulinus* богата минералима, шећерима и шећерним алкохолима, масним и органским киселинама и полифенолима.

Генерални закључак би био да су пацијенти са кардиоваскуларним болестима имали повећан ниво ДНК оштећења и повећану фреквенцу хромозомских аберација у односу на здраве особе, али дејство различитих екстраката гљиве је довело до хемопротективног и радиопротективног дејства у лимфоцитима пацијената, па се са сигурношћу може препоручити употреба ове гљиве у циљу очувања геномске стабилности и смањења нивоа геномског оштећења код пацијената узрокованог неопходном ординираним терапијом или неопходном дијагностичком процедуром.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*. 2020, 12:1-10.
2. Akbari G. Molecular mechanisms underlying gallic acid effects against cardiovascular diseases: An update review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2020, 10(1):11-23.
3. Alkarithi G, Duval C, Shi Y, Macrae FL, Ariëns RAS. Thrombus structural composition in cardiovascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2021, 41(9):2370-2383.
4. Al-Khayri JM, Rashmi R, Toppo V, Chole B, Banadka A, Sudheer WN, Nagella P, Shehata WF, Al-Mssallem MQ, Alessa FM, Almaghasla MI, Rezk AAS. Plant secondary metabolites: The weapons for biotic stress management. *Metabolites*. 2023, 13(6):716.
5. Alsatari ES, Azab M, Khabour OF, Alzoubi KH, Sadiq MF. Assessment of DNA damage using chromosomal aberrations assay in lymphocytes of waterpipe smokers. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2012, 25:218-224.
6. Andreassi MG, Botto N, Rizza A, Colombo MG, Palmieri C, Berti S, Manfredi S, Masetti S, Clerico A, Biagini A. Deoxyribonucleic acid damage in human lymphocytes after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002, 40:862-868.
7. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research*. 2003, 543:67-86.
8. Andreassi MG, Botto N, Simi S, Casella M, Manfredi S, Lucarelli M, Venneri L, Biagini A, Picano E. Diabetes and chronic nitrate therapy as co-determinants of somatic DNA damage in patients with coronary artery disease. *Journal of Molecular Medicine*. 2005, 83:279-286.
9. Anusiya G, Prabu UG, Yamina NV, Sivarajasekar N, Rambabu K, Bharath G, Banat F. A review of the therapeutic and biological effects of edible and wild mushrooms. *Bioengineered*. 2021, 12(2):11239-11268.
10. Azimi S, Mozdarani H, Mahmoudzadeh A. Induction of DNA damage, apoptosis and micronuclei in peripheral blood lymphocytes following injection of contrast media in patients with abdominal CT scan. *International Journal of Radiation Research*. 2017, 15: 149-55.
11. Baati T, Horcajada P, Gref R, Couvreur P, Serre C. Quantification of fumaric acid in liver, spleen and urine by high-performance liquid chromatography coupled to photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, 56(4):758-762.

12. Balraj L, Nagaraj T, UnniKrishnan K. The correlation between micronuclei count and smoking behavior: a hospital-based study. *Journal of Oral Research*. 2020, 9(2):104-110.
13. Basheerudeen SAS, Kanagaraj K, Jose MT, Ozhimuthu A, Paneerselvam S, Pattan S, Joseph S, Raavi V, Perumal V. Entrance surface dose and induced DNA damage in blood lymphocytes of patients exposed to low dose and low-dose-rate X-irradiation during diagnostic and therapeutic interventional radiology procedures. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017, 818:1-6.
14. Baumgartner A, Weier JF, Weier HG. Chromosome-specific DNA repeat probes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006, 54(12):1363-1370.
15. Bays HE, Taub PR, Epstein E, Michos ED, Ferraro RA, Bailey AL, Kelli HM, Ferdinand KC, Echols MR, Weintraub H, Bostrom J, Johnson HM, Hoppe KK, Shapiro MD, German CA, Virani SS. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. *American Journal of Preventive Cardiology*. 2021, 5:100149.
16. Benhar H, Idri A, Fernández-Alemán JL. Data preprocessing for heart disease classification: A systematic literature review. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2020, 195: 105635.
17. Bertero E, Maack C. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. *Circulation Research*. 2018, 122:1460-1478.
18. Bhat MA, Mahajan N, Gandhi G. DNA and chromosomal damage in coronary artery disease patients. *Excli Journal*. 2013, 12:872-884.
19. Bhat MA, Gandhi G. Assessment of DNA damage in leukocytes of patients with coronary artery disease by comet assay. *Internatinal Heart Journal*. 2017, 58:271-274.
20. Bhat MA, Gandhi G. Elevated oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease and its association with oxidative stress biomarkers. *Acta Cardiologica*. 2018, 74:153-160.
21. Bivehed E, Hellman B, Wenson L, Stenerlöv B, Söderberg O, Heldin J. Visualizing DNA single- and double-strand breaks in the Flash comet assay by DNA polymerase-assisted end-labelling. *Nucleic Acids Research*. 2024, 52:e22.
22. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ, Simes RJ, Durrington P, Hitman GA, Welch KMA, DA D, Zwinderman AH, Clearfield MB, Downs JR, Tonkin AM, Colhoun HM, Gotto AM, Ridker PM, Kastelein JJ. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *JAMA*. 2012, 307:1302-1309.
23. Bohula May EA, Bonaca MP, Jarolim P, Antman EM, Braunwald E, Giugliano PR, Newby K, Sabatine MS, Morrow DA. Prognostic performance of a high sensitivity

- cardiac troponin I assay in patients with non-STelevation acute coronary syndrome. *Clinical Chemistry*. 2014, 60:158-164.
24. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001, 37:31-45.
25. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M; HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003, 543:155-166.
26. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007, 28:625-631.
27. Bonassi S, Ceppi M, Møller P, Azqueta A, Milić M. DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Scientific Reports*. 2021, 11:16793.
28. Botto N, Masetti S, Petrozzi L, Vassalle C, Manfredi S, Biagini A, Andreassi M. Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*. 2002, 13:269-274.
29. Bukvić N, Susca F, Bukvić D, Fanelli M, Guanti G. 17-alpha-ethinylestradiol and norgestrel in combination induce micronucleus increases and aneuploidy in human lymphocytes and fibroblast cultures. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis*. 2000, 20(3):147-159.
30. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, Claeys MJ, Dan GA, Dweck MR, Galbraith M, Gilard M, Hinterbuchner L, Jankowska EA, Jüni P, Kimura T, Kunadian V, Leosdottir M, Lorusso R, Pedretti RFE, Rigopoulos AG, Rubini Gimenez M, Thiele H, Vranckx P, Wassmann S, Wenger NK, Ibanez B. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2023, 44(38):3720-3826.
31. Cavallo D, Ursini CL, Omodeo-Salè E, Iavicoli S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007, 628:11-18.

32. Çelik H, Arinc E. Evaluation of the protective effects of quercetin, rutin, naringenin, resveratrol and trolox against idarubicin-induced DNA damage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 13:231-241.
33. Chang D, Wang F, Zhao YS, Pan HZ. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2008, 21:286-289.
34. Chauin A. The main causes and mechanisms of increase in cardiac troponin concentrations other than acute myocardial infarction (Part 1): Physical exertion, inflammatory heart disease, pulmonary embolism, renal failure, sepsis. *Vascular Health and Risk Management*. 2021, 17:601-617.
35. Chugh RM, Mittal P, Namratha MP, Arora T, Bhattacharya T, Chopra H, Cavalu S, Gautam RK. Fungal Mushrooms: A Natural Compound With Therapeutic Applications. *Front Pharmacology*. 2022, 13:925387.
36. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, Tunc S Ozkan L, Bilaloglu R. Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 53:359-363.
37. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, Gale CP, Gilard M, Jobs A, Jüni P, Lambrinou E, Lewis B, Mehilli J, Meliga E, Merkely B, Mueller C, Roffi M, Rutten F, Sibbing D, Siontis G, Chettibi M, Hayrapetyan H, Metzler B, Najafov R, Stelmashok V, Claeys M, Kušljugić Z, Gatzov P, Skoric B, Panayi G, Mates M, Sorensen R, Shokry K, Marandi T, Kajander O, Commeau P, Aladashvili A, Massberg S, Nikas D, Becker D, Guðmundsdóttir I, Peace A, Beigel R, Indolfi C, Aidargaliyeva N, Elezi S, Beishenkulov M, Maca A, Gustiene O, Degrell P, Maempel AC, Ivanov V, Damman P, Kedev S, Steigen T, Legutko J, Morais J, Vinereanu D, Duplyakov D, Zavatta M, Pavlović M, Orban M, Bunc M, Ibañez B, Hofmann R, Gaemperli O, Marjeh YB, Addad F, Tutar E, Parkhomenko A, Karia N. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2021, 42(14):1289-1367.
38. Collins A, Møller P, Gajski G, Vodenková S, Abdulwahed A, Anderson D, Eyluel Bankoglu E, Bonassi S, Boutet-Robinet E, Brunborg G, Chao C, Cooke M.S., Costa C, Costa S, Dhawan A, Lapuente J, Del Bo' C, Dubus J, Dusinska M, Duthie S.J., Yamani N.E., Engelward B, Gaivão I, Giovannelli L, Azqueta A. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*. 2023, 18:929-989.
39. Cornelissen A, Guo L, Neally SJ, Kleinberg L, Forster A, Nairv R, Gadhoke N, Ghosh SKB, Sakamoto A, Sato Y, Kawakami R, Mori M, Kawai K, Fernandez R, Dikongue A, Abebe B, Kutys R, Romero ME, Kolodgie FD, Baumer Y, Finn AV. Relationships between neighborhood disadvantage and cardiovascular findings at autopsy in subjects with sudden death. *American Heart Journal*. 2023, 256:37-50.

40. Coskun M, Cayir A, Coşkun M, Tok H. Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013, 757:23-27.
41. Dai Z, Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Onoue K, Hamano M, Katoh M, Yamada S, Katagiri M, Zhang B, Hatsuse S, Yamada T, Inoue S, Kubota M, Sawami K, Heryed T, Ito M, Amiya E, Hatano M, Takeda N, Morita H, Yamanishi Y, Saito Y, Komuro I. Myocardial DNA damage predicts heart failure outcome in various underlying diseases. *Journal of the American College of Cardiology: Heart Failure*. 2024, 12:648–661.
42. Darlina D, Kisnanto T, Tetriana D, Purnami S, Nugroho Eko Surniyantoro H, Syaifudin, M. Evaluation of spontaneous DNA damage using the alkaline comet assay in lymphocyte cells of humans living in the high level natural radiation area of Mamuju, Indonesia. *Environment and Natural Resources Journal*. 2022, 20(3):330-339.
43. Dastan S.D. Chemical and functional composition and biological activities of Anatolian *Hypericum scabrum* L. plant. *Journal of Molecular Structure*. 2023, 1275:134561.
44. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*. 2012, 2012:645460.
45. Dell’Osbel RS, Santos R, Piccoli C, Gregoletto ML, Freire C, Cremonese C. Prevalence of overweight and obesity and increased risk for cardiovascular disease and associated factors in farming families in southern Brazil. *Brazilian Journal of Development*. 2023, 9(1):1252-1270.
46. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Kocyigit A, Celik H, Guzel S, Selek S. Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its relationship with severity of acute coronary syndrome. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005, 578:298-307.
47. Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigit A, Guzel S. Effect of coronary angiography on oxidative DNA damage observed in circulating lymphocytes. *Angiology*. 2007, 58:141-47.
48. Demirci B, Demir O, Dost T, Birincioglu M. Antioxidative effect of aspirin on vascular function of aged ovariectomized rats. *Age (Dordr)*. 2014, 36:223-229.
49. Devipriya N, Sudheer AR, Srinivasan M, Menon VP. Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008, 654:1-7.
50. Diringer MN, Scalfani MT, Zazulia AR, Videen TO, Dhar R, Powers WJ. Effect of mannitol on cerebral blood volume in patients with head injury. *Neurosurgery*. 2012, 70(5):1215-1219.

51. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 2012, 46(4):382–419.
52. Dokainish H, Nguyen JS, Bobek J, Goswami R, Lakkis NM. Assessment of the American Society of Echocardiography-European Association of Echocardiography guidelines for diastolic function in patients with depressed ejection fraction: an echocardiographic and invasive haemodynamic study. *European Journal of Echocardiography*. 2011, 12:857-864.
53. Dosi T, Gupta D, Hazari A, Rajan R, Prabhav C, Anushri SR. Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2016, 6:143-147.
54. Erbiai EH, Maouni A, Pinto da Silva L, Saidi R, Legssyer M, Lamrani ZE, Esteves da Silva J. Antioxidant properties, bioactive compounds contents, and chemical characterization of two wild edible mushroom species from Morocco: *Paralepista flaccida* (Sowerby) Vizzini and *Lepista nuda* (Bull.) Cooke. *Molecules*. 2023, 28:1123.
55. Eremina NV, Zhanataev AK, Lisitsyn AA, Durnev AD. Genotoxic markers in patients with diabetes mellitus. *Genetic toxicology*. 2021, 19(2):143-168.
56. Erdoğan İ, Dural E, Altundağ H, Oymak T, Süzen HS. The relationship between lymphocyte DNA damage, coronary artery disease, and blood trace elements. *Mutagenesis*, 2024, 39(1):43-55.
57. Fakoya S, Oloketuyi S. Antimicrobial efficacy and phytochemical screening of mushrooms, *Lenzites betulinus*, and *Coriolopsis gallica* extracts. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2012, 11(6):695-698.
58. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European Heart Journal*. 2013, 34:719–728.
59. Fandos M, Corella D, Guillén M, Portolés O, Carrasco P, Iradi A, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Lamuela-Raventós RM, Michavilla MT, Cerdá C, Torregrosa R, Redón J, Chaves FF, Tormos C, Ocete D, Sáez GT. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. *Free Radical Research*. 2009, 43:1179-86.
60. Feige K, Rubbert J, Raupach A, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Torregrosa C. Cardioprotective properties of mannitol-involvement of mitochondrial potassium channels. *International Journal of Molecular sciences*. 2021, 22(5):2395.
61. Feldman D, Kim L, Rene G, Minutello RM, Bergman G, Wong SC. Prognostic value of cardiac troponin-I or troponin-T elevation following nonemergent percutaneous coronary intervention: A meta-analysis. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2011, 77:1020-1030.

62. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2007, 2:1084-1104.
63. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011, 26:125-132.
64. Fenech M. Cytokinesis-Block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes*. 2020, 11:1203.
65. Fenech M, Knasmueller S, Knudsen L, Kirsch-Voldersf M, Deo P, Franzke B, Stopper H, Andreassi M, Bolognesi C, Dhillon VS, Laffon B, Wagner K, Bonassi S. "Micronuclei and Disease" special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2021, 788:108384.
66. Fenech M, Bull CF, B. Van Klinken JW. Protective effects of micronutrient supplements, phytochemicals and phytochemical-rich beverages and foods against DNA damage in humans: A systematic review of randomized controlled trials and prospective studies. *American Society for Nutrition: Advances in Nutrition*. 2023, 14:1337-1358.
67. Fernandes Â, Petrović J, Stojković D, Barros L, Glamočlija J, Soković M, Martins A, Ferreira ICFR. *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr from different origins: chemical characterization, screening of the bioactive properties and specific antimicrobial effects against *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT-Food Science and Technology*. 2016, 69:91-97.
68. Ferraz GA, Neto AOC, Cerqueira EM, Meireles JR. Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. 2016, 19(4):627-634.
69. Fotirić Akšić M, Tosti T, Nedić N, Marković M, Ličina V, Milojković-Opsenica D, Tešić Z. Influence of frost damage on the sugars and sugar alcohol composition in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) floral nectar. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015, 37:1701.
70. Fox EM, Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*. 2008, 11:481-487.
71. Franzke B, Halper B, Hofmann M, Oesen S, Peherstorfer H, Krejci K, Koller B, Geider K, Baierl A, Tosevska A, Strasser EV, Wessner B, Wagner KH. Active ageing study group the influence of age and aerobic fitness on chromosomal damage in Austrian institutionalised elderly. *Mutagenesis*. 2014, 29:441-445.
72. Fuchs F, Whelton P. High blood pressure and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2020, 75:285-292.
73. Gajski G, Gerića M, Oreščanin V, Garaj-Vrhovaca V. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general

- population: Contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, 148:561-570.
74. Galanakis CM, Goulas V, Gekas V. Predicting the solubilization preference of natural phenols to different solvents. *Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food*, May 22-26, 2011, Athens, Greece: 1501-1502.
 75. Garau MM, Lucas Calduch A, López EC. Radiobiology of the acute radiation syndrome. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 2011, 16:123–130.
 76. Garm C, Moreno-Villanueva M, Burkle A, Petersen I, Bohr VA, Christensen K, Stevnsner T. Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. *Aging Cell*. 2013, 12:58-66.
 77. Gençcelep H, Uzun Y, Tunçtürk Y, Demirel K. Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2009, 113(4):1033-1036.
 78. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, Naidu SS, Nishimura RA, Ommen SR, Rakowski H. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2011, 124:e783–e831.
 79. Gleit M, Habermann N, Osswald K, Seidel C, Persin C, Jahreis G, Pool-Zobel BL. Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: A biomarker model. *Biomarkers*. 2005, 10:203-217.
 80. Gorjanović S, Micić D, Pastor F, Tosti T, Kalušević A, Ristić S, Zlatanović S. Evaluation of apple pomace flour obtained industrially by dehydration as a source of biomolecules with antioxidant, antidiabetic and antiobesity effects. *Antioxidants*. 2020, 9:413.
 81. Granato D, Katayama FCU, Castro IA. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT— Food Science and Technology*. 2010, 43(10):1542-1549.
 82. Grujić D, Marković A, Tubić Vukajlović J, Stanković M, Radović Jakovljević M, Ćirić A, Djordjević K, Nevena Planojević N, Milutinović M, Milošević-Djordjević O. Genotoxic and cytotoxic properties of two medical plants (*Teucrium arduini* L. and *Teucrium flavum* L.) in relation to their polyphenolic contents. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2020, 852:503168.
 83. Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno M, Villares A, Alfredo Martínez J. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 2010, 81(7):715-723.
 84. Hardin JS, Sutton DA, Nathan P, Wiederhold NP, Mele J, Sunali Goyal S. Fungal Keratitis Secondary to *Trametes betulina*: A case report and review of literature. *Mycopathologia*. 2017, 182(7-8):755-759.

85. Harrison JD, Balonov M, Bochud F, Martin C, Menzel HG, Ortiz-Lopez P, Smith-Bindman R, Simmonds JR, Wakeford R. ICRP Publication 147: Use of dose quantities in radiological protection. *Annals of the ICRP*. 2021, 50:9–82.
86. Haverić A, Haverić S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010, 20:260-266.
87. Hazukova R, Rezacova M, Pleskot M, Zadak Z, Cermakova E, Taborsky M. DNA damage and arterial hypertension. A systematic review and meta-analysis. *Biomedical Papers - Olomouc Biomedical Papers-Olomouc*. 2024, 168(1):15-24.
88. He B, Gnawali N, Hinman AW, Mattingly AJ, Osimani A, Cimini D. Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division. *Oncotarget*. 2019, 10(28):2660-2674.
89. Hee-Yeong J, Yong-Seok C, Jae-Kang L, Beom-Joon L, Woo L, Hee K. Anti-Inflammatory activity of citric acid-treated wheat germ extract in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Nutrients*. 2017, 9(7):730.
90. Ho E, Galougahi KK, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*. 2013, 1:483-491.
91. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2-de-oxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leukemia Research*. 2000, 24:461-468.
92. Hosseinimehr SJ, Zakaryae V, Ahmadi A, Akhlaghpour S. Radioprotective effect of chlorogenic acid against mortality induced by gamma-irradiation in mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2008, 30(1):13-26.
93. Hovhannisyan G. Fluorescence *in situ* hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*. 2010, 3:17.
94. Hussein MT, Ali AK, Mutta AJ. HPRT gene mutation, sister chromatid exchange and comet assay in peripheral lymphocytes of radiation laborers at Al-Amal Cancer Hospital in Baghdad. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive*. 2022, 3(1):1–7.
95. Hussin FRM, Vitor RJS, Joaquin JAO, Clerigo MM, Paano AMC. Anti-hyperglycemic effects of aqueous *Lenzites betulina* extracts from the Philippines on the blood glucose levels of the ICR mice (*Mus musculus*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016, 6(2):155-158.
96. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P. 2017 ESC

- Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2018, 39(2):119-177.
97. Ibrahim, NE, Januzzi Jr JL. Established and emerging roles of biomarkers in heart failure. *Circulation Research*. 2018, 123(5):614-629.
 98. Janjušević Lj, Karaman M, Šibul F, Tommonaro G, Iodice C, Jakovljević D, Pejin B. The lignicolous fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2017, 32(1):355-362.
 99. Jiang N, Naz S, Ma Y, Ullah Q, Khan MZ, Wang J, Lu X, Luosang D-Z, Tabassum S, Chatha AMM, Wang-Dui Basang W-D. An Overview of comet assay application for detecting DNA damage in aquatic animals. *Agriculture*. 2023, 13(3):623.
 100. Ju-Ryun N, Kim E, Chang-Su N, Sunoh K. Citric acid-enriched extract of ripe *Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc. induces laxative effects by regulating the expression of aquaporin 3 and prostaglandin E₂ in rats with Loperamide-induced constipation. *Journal of Medicinal Food*. 2022, 25(1):12-23.
 101. Jung BC, Kim HK, Kim SH, Kim YS. Triglyceride induces DNA damage leading to monocyte death by activating caspase-2 and caspase-8. *BMB Reports*. 2023, 56(3):166-171.
 102. Kannel WB. The Framingham study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *Journal of Gender Specific Medicine*. 2002, 5(2):27-37.
 103. Knežević A, Živković L, Stajić M, Vukojević J, Milovanović I, Spremo-Potporević B. Antigenotoxic effect of *Trametes* spp. extracts against DNA damage on human peripheral white blood cells. *The Scietific World Journal*. 2015, 2015:146378.
 104. Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, Nao T, Yoshiga Y, Yamada J, Okamura T, Ueyama T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2011, 13:29-36.
 105. Kozłowska A, Szostak-Węgierek D. Targeting cardiovascular diseases by flavonols: An update. *Nutrients*. 2022, 14(7):1439.
 106. Kreutzmann M, Kraus BJ, Christa M, Störk S, Jansen EHJM, Stopper H, Schupp N. Differential modulation of markers of oxidative stress and DNA damage in arterial hypertension. *Antioxidants*. 2023, 12(11):1965.
 107. Krittanawong C, Isath A, Hahn J, Wang Z, Fogg S, Bandyopadhyay D, Jneid H, Virani S, Tang W. Mushroom consumption and cardiovascular health: A systematic review. *The American Journal of Medicine*. 2021, 134(5):637-642.

108. Kosanić M, Ranković B. Lekovite makromicete. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Srbija. 2018, ISBN: 978-86-6009-058-6
109. Kotecha AT, Rakhit RD. Acute coronary syndromes. *Clinical Medicine*. 2016, 16(6):s43-s48.
110. Krittanawong C, Isath A, Hahn J, Wang Z, Fogg SE, Bandyopadhyay D, Jneid H, Virani SS, Tang WHW. Mushroom Consumption and Cardiovascular Health: A Systematic Review. *The American Journal of Medicine*. 2021, 134(5):637-642.
111. Kwak AM, Lee IK, Lee SY, Yun BS, Kang HW. Oxalic acid from *Lentinula edodes* culture filtrate: antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and qualitative and quantitative analyses. *Mycobiology*. 2016, 44(4):338-342.
112. Laffon B, Bonassi S, Costa S, Valdiglesias V. Genomic instability as a main driving factor of unsuccessful ageing: potential for translating the use of micronuclei into clinical practice. *Mutation Research*. 2021, 787:108359.
113. C, Schmidt K, Stradal TEB, Karger M, Rottner K. Cytochalasins and their impact on actin filament remodeling. *Biomolecules*. 2023, 13:1247.
114. Landi S, Iazzolino E, Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values? *Mutation Research*. 2000, 469:159-166.
115. Lazić V, Klaus A, Kozarski M, Doroški A, Tosti T, Simić S, Vunduk J. The effect of green extraction technologies on the chemical composition of medicinal Chaga mushroom extracts. *Journal of Fungi*. 2024, 10:225.
116. Larocca de Geus J, Maíra Wambier LM, Bortoluzzi MC, Loguercio AD, Kossatz S, Reis A. Does smoking habit increase the micronuclei frequency in the oral mucosa of adults compared to non-smokers? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2018, 22(1):81-91.
117. Lee IK, Yun BS, Cho SM, Kim WG, Kim JP, Ryoo IJ, Koshino H, Yoo ID. Betulinans A and B, two benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*. *Journal of Natural Products*. 1996, 59(11):1090-1092.
118. Lei G, Dai H, Ma J, Wang J, Hua Y, Zhou L. Isolation, structure characteristics and antioxidant activity of two water-soluble polysaccharides from *Lenzites betulina*. *BMC Chemistry*. 2021, 15:19.
119. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World Journal of Diabetes*. 2015, 6:1246-1258.
120. Liu K, Wang JL, Gong WZ, Xiao X, Wang Q. Antioxidant Activities *In Vitro* of ethanol extract and fractions from mushroom, *Lenzites betulina*. *Journal of food biochemistry*. 2012, 37(6):687-693.

121. Liu K, Wang JL, Zhao L, Wang Q. Anticancer and antimicrobial activities and chemical composition of the birch mazegill mushroom *Lenzites betulina* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2014, 16(4):327-337.
122. Lo HC. Medicinal Mushrooms for Glycemic Control in Diabetes Mellitus: History, Current Status, Future Perspectives, and Unsolved Problems (Review). *International Journal of Medicine Mushroom*. 2011, 13(5):401-426.
123. Lopes NB, Almeida IV, Silvestre Lopes PH, Pimenta Vicentini VE. Radioprotective efficacy of plastic polymer against the toxicogenomic effects of radiopharmaceutical 18F-FDG on human lymphocytes. *Radiation Oncology*. 2020, 15:154.
124. Lv Lin, Chen QY, Lu J, Zhao Q, Wang HY, Li JH, Yuan KY, Dong ZX. Potential regulatory role of epigenetic modifications in aging-related heart failure. *International Journal of Cardiology*. 2024, 401:131858.
125. Maffei F, Forti GC, Castelli E, Stefanini GF, Mattioli S, Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutation Research*. 2002, 514:49-58.
126. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 2019, 51:165–176
127. Marangoni F, Agostoni C, Borghi C, Catapano AL, Cena H, Ghiselli A, Vecchia C, Lercker G, Manzato E, Pirillo A, Riccardi G, Risé P, Visioli F, Poli A. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. *Atherosclerosis*. 2020, 292:90-98.
128. Mazumdar M, Giri S, Giri A. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011, 3:147-152.
129. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European society of cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2012, 33:1787-847.
130. Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutation Research*. 2007, 621:75-86.
131. Mihajlović B, Pavlović S. Analiza specifičnosti standardnih faktora rizika za nastanak koronarne bolesti na populaciji od 30008 stanovnika opštine Laktaši (Republika Srpska). *Srce i krvni sudovi*. 2011, 30(4):251-256.
132. Mihaljević O, Zivancevic-Simonovic S, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, Todorovic Z, Grujicic D, Radovic Jakovljevic M, Tubic J, Markovic A, Paunovic M, Stanojevic-Pirkovic M, Markovic S. Apoptosis and genome instability in children with autoimmune diseases. *Mutagenesis*. 2018, 33:351-358.

133. Mihaljević O, Zivancevic-Simonovic S, Cupurdija V, Marinkovic M, Tubic Vukajlovic J, Markovic A, Stanojevic-Pirkovic M, Milosevic-Djordjevic O. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of severely ill COVID-19 patients in relation to inflammatory markers and parameters of hemostasis. *Mutagenesis*. 2022, 37:203-212.
134. Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Novakovic T, Arsenijevic S, Marinkovic D. Micronuclei and ageing in a sample of Yugoslavian population. *Genetika*. 2002, 38:264-267.
135. Милошевић-Ђорђевић О. Принципи клиничке цитогенетике. Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу. Сквер, Крагујевац. 2009, стр. 121-122. ISBN: 978-86-7760-053-2
136. Milosević-Djordjević O, Grujicić D, Vasković Z, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2010, 220:115-120.
137. Milošević-Djordjević O, Stošić I, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2012, 63:367-375.
138. Milošević-Djordjević O, Tubić Vukajlović J, Marković A, Grujičić D, Arsenijević P, Arsenijević S. Assessment of chromosomal damage in umbilical blood lymphocytes of newborns from Kragujevac in Central Serbia born 18 years after environmental contamination. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2021, 255:213-219.
139. Milovanović I, Stanojković T, Stajić M, Brčeski I, Knežević A, Ćilerdžić J, Vukojević J. Effect of selenium enrichment of *Lenzites betulinus* and *Trametes hirsuta* mycelia on antioxidant, antifungal and cytostatic potential. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2015, 16:1-7.
140. Mišić D, Šiler B, Gašić U, Avramov S, Živković S, Nestorović Zivković J, Milutinović M, Tešić Z. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of nepetaspecies: a possible application in chemotaxonomic studies. *Phytochemical Analysis*. 2015, 26:72-85.
141. Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran TB, Nainu F, Khusro A, Idris AM, Khandaker MU, Osman H, Alhumaydhi FA, Simal-Gandara J. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*. 2022, 34(3):101865.
142. Mm CS, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasani RS. Epidemiology and clinical course of heart etanalysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data metaanalysis. *European Heart Journal*. 2011, 33(14):1750-1757.

143. Mohammadabadi T, Jain R. Cinnamon: a nutraceutical supplement for the cardiovascular system. *Archive of Medical Sciences Atherosclerotic Disease*. 2024, 9:e72-e81.
144. Mohammed AM, Hussien DF, Rashad H, Hasheesh A. The micronuclei scoring as a biomarker for early detection of genotoxic effect of cigarette smoking. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020, 21:87-92.
145. Mohammed HA, Najeeb HA, Tahir EM. Direct and accumulative DNA damage level in patients underwent coronary CT angiography. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2024, 17:100791.
146. Møller P. Effect of age and sex on the level of DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in human blood cells. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019, 838:16-21.
147. Møller P, Stopper H, Collins AR. Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis*. 2020, 35:5-18.
148. Mondal NK, Sorensen E, Hiiivala N, Feller E, Griffith B, Wu ZJ. Oxidative stress, DNA damage and repair in heart failure patients after implantation of continuous flow left ventricular assist devices. *International Journal of Medical Sciences*. 2013, 10:883-893.
149. Mongirdiene A, Skrodenis L, Varoneckaite L, Mierkytė G, Gerulis J. Reactive oxygen species induced pathways in heart failure pathogenesis and potential therapeutic strategies. *Biomedicines*. 2022, 10:602.
150. Morocho V, Hidalgo-Tapia M, Delgado-Loyola I, Cartuche L, Cumbicus N, Valarezo E. Chemical composition and biological activity of essential oil from leaves and fruits of Limoncillo (*Siparuna muricata* (Ruiz & Pav.) A. DC.). *Antibiotic*. 2023, 12(1):82.
151. Münzel T, Hahad O, Sørensen M, Lelieveld J, Duerr GD, Nieuwenhuijsen M, Daiber A. Environmental risk factors and cardiovascular diseases: a comprehensive expert review. *Cardiovascular Research*. 2022, 118:2880-2902.
152. Murgia E, Maggini V, Barale R, Rossi A. Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007, 621:113-118.
153. Murphy SP, Ibrahim NE, Januzzi JL. Heart failure with reduced ejection fraction. *JAMA*. 2020, 324(5):488-504.
154. Muruzabal D, Collins A, Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*. 2021, 147:111865.

155. Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2012, 55:433-438.
156. Nadkarni GN, Gignoux CR, Sorokin EP, Daya M, Rahman R, Barnes KC, Wassel CL, Kenny EE. Worldwide frequencies of APOL1 renal risk variants. *New England Journal of Medicine*. 2018, 379:2571–2572.
157. Nandi S, Sikder R, Rapior S, Arnould S, Simal-Gandarad J, Acharya K. A review for cancer treatment with mushroom metabolites through targeting mitochondrial signaling pathway: In vitro and *in vivo* evaluations, clinical studies and future prospects for mycomedicine. *Fitoterapia*. 2024, 172:105681.
158. Nefic H, Handzic I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013; 753: 1-11.
159. Neri M, Ceppi M, Knudsen LE, Merlo DF, Barale R, Puntoni R, Bonassi S. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental health perspectives*. 2005, 113(9):1226-1229.
160. Nohria R, Viera AJ. Acute coronary syndrome: Diagnosis and initial management. *American Family Physician*. 2024, 109(1):34-42.
161. Nielsen KM, Foldspang A, Larsen M, Gerdes LU, Rassmussen S, Faergeman O. Estimating the incidence of the acute coronary syndrome: data from Danish cohort of 138 290 persons. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2007, 14 (5):608-614.
162. Nowacka N, Nowak R, Drozd M, Olech M, Los R, Malm A. Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one Polish mushrooms. *PLOS One*. 2015, 10(10): e0140355.
163. Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Experimental Oncology*. 2012, 34(3):243-254.
164. Osswald K, Mittas A, Glei M, Pool-Zobel BL. New revival of an old biomarker: Characterisation of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research*. 2003, 544:321-329.
165. Ostojić M, Ašanin M, Vasiljević Pokrajčić Z, Peruničić J, Nedeljkovic M, Stanković G, Stojković S, Dobrić M. Akutni koronarni sindrom. *Srce i krvni sudovi*. 2011, 30(3):161-172.
166. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, Valk MJ, van Velzen E, Wielders JP, Zuithoff NP, Rutten FH, Hoes AW. Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *European Journal of Heart Failure*. 2011, 13:518-527.

167. Ouzouni PK, Veltsistas PG, Paleologos EK, Riganakos KA. Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, 20(6):480-486.
168. Palazzo RP, Bagatini PB, Schefer PB, Michelsen de Andrade F, Maluf SW. Genomic instability in patients with type 2 diabetes mellitus on hemodialysis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2012, 34(1):31-5.
169. Palomaki GE, Melillo S, Bradley LA. Association between 9p21 genomic markers and heart disease: A meta-analysis. *JAMA*. 2010, 303:648–656.
170. Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A. Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca^{2+} dependence of Ca^{2+} -calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circulation Research*. 2009, 105:1204-1212.
171. Pappuswamy M, Rajesh N, Philip AM. Analysis of chromosomal aberrations and micronuclei in type 2 Diabetes mellitus patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. 2020, 5(1):15-18.
172. Pastor-Sierraa K, Espitia-Pérez L, Espitia-Pérez P, Peñata-Taborda A, Brango H, Galeano-Pérez C, Bru-Cordero OE, Palma-Parra M, Díaz SM, Trillos C, Briceño L, Idrovo AJ, Miranda-Pacheco J, Téllez E, Jiménez-Vidal L, Coneo-Preteit A, Alicia Alvarez AH, Arteaga-Arroyo G, Ricardo-Caldera D, Salcedo-Arteaga S, Porras-Ramírez A, Varona-Urib M. Micronuclei frequency and exposure to chemical mixtures in three Colombian mining populations. *Science of the Total Environment*. 2023, 901:165789.
173. Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, Syed R, Singh V, Shin HS. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, 155: 889-904.
174. Paterson DI, O'Meara E, Chow BJ, Ukkonen H, Beanlands RS. Recent advances in cardiac imaging for patients with heart failure. *Current Opinion in Cardiology*. 2011, 26:132-143.
175. Pérez de la Lastra JM, Andrés-Juan C, Plou F, Pérez-Lebeña E. Impact of zinc, glutathione, and polyphenols as antioxidants in the immune response against SARS-CoV-2. *Processes*. 2021, 9(3):506.
176. Peterson LA, Stanfill SB, Hecht SS. An update on the formation in tobacco, toxicity and carcinogenicity of N'-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis*. 2024, 45(5):275-287.
177. Petrović N, Kosanic M, Tosti T, Srbljak I, Djuric A. Chemical characterization and bioactive properties of the edible and medicinal honey mushroom *Armillaria mellea* (Agaricomycetes) from Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2023a, 25(4):1-15.
178. Petrović N, Tosti T, Srbljak I, Đurić A, Kosanić M. Biochemical characterization and bioactivity of methanolic and acetonetic extracts of *Laetiporus sulphureus*

- basidiocarps. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 20236, 17:1748-1763.
179. Petrović N, Tosti T, Srbljak I, Đurić A, Kosanić M. Chemical composition and bioactivity of the giant polypore or black-staining mushroom, *Meripilus giganteus* (Agaricomycetes), from Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2022, 24(7):21-40.
 180. Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S, Del Dotto P, Migliore L, Bonuccelli U. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurological Sciences*. 2002, 23(2):S97-S98.
 181. Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999, 441:115-127.
 182. Poznyak A, Litvinova L, Poggio P, Sukhorukov V, Orekhov A. Effect of glucose levels on cardiovascular risk. *Cells*. 2022, 11:3034.
 183. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*. 2000, 72(1-2):35-42.
 184. Quintaes KD, Diez-Garcia RW. The importance of minerals in the human diet. *Handbook of Mineral Elements in Food*, First Edition. Edited by Miguel de la Guardia and Salvador Garrigues. 2015, John Wiley & Sons, Ltd. Published 2015 by John Wiley & Sons, Ltd. Chapter 1, pp. 1-21.
 185. Rahardjo T, Mailana W, Kisnanto T, Darlina, Nurhayati S, Tetriana D, Ramadhani D, Syaifudin M. Assessment of DNA damage in lymphocytes of Mamuju (a high background radiation area) inhabitants using alkaline single cell gel electrophoresis. *International Journal of Low Radiation*. 2017, 10:314-323.
 186. Rall-Scharpf M, Friedl TWP, Biechonski S, Denking M, Milyavsky M, Wiesmüller L. Sex-specific differences in DNA double-strand break repair of cycling human lymphocytes during aging. *Aging*. 2021, 13:21066-21089.
 187. Ramos JSA, Alves AA, Lopes MP, Alves Pedroso TM, Felício LP, Carvalho WF, Franco FC, Araújo Melo CO, Gonçalves MW, Soares TN, Divino da Cruz A, Melo e Silva D. DNA damage in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms in the promoter region of the CYP2E1 gene in alcoholics from Central Brazil. *Alcohol*. 2016, 57:35-39.
 188. Ranković B. Sistematika gljiva. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Srbija. 2011, str.2, ISBN 978-86-6009-014-2.

189. Rastogi V, Pragya P, Upadhyay P. A brief view on antihypertensive drugs delivery through transdermal patches. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012, 3:1955-1970.
190. Reimann H, Stopper H, Polak T, Lauer M, Herrmann MJ, Deckert J, Hintzsche H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of patients with neurodegenerative diseases. *Scientific Reports*. 2020; 10:22196.
191. Ren G, Liu XY, Zhu HK, Yang SZ, Fu CX. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia*. 2006, 77(5):408-410.
192. Ren Y, Shi J, Qiao Y, Gu Y, Li Y, Liu Y, Cheng Y, Liu Y. Epidemiological status quo of hypertension in elderly population in Changchun, China: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2022, 12(3):e053086.
193. Robert V, Stegehuis G, Stalpers J. The MycoBank engine and related databases. 2005. <https://www.MycoBank.org/>
194. Rosemary T, Arulkumar A, Paramasivam S, Mondragon-Portocarrero A, Miranda JM. Biochemical, micronutrient and physicochemical properties of the dried red seaweeds *Gracilaria edulis* and *Gracilaria corticata*. *Molecules*. 2019, 24(12):2225.
195. Roy I.M., Nadar P.S., Khurana S. Neutral comet assay to detect and quantitate DNA double-strand breaks in hematopoietic stem cells. *Bio-protocol*. 2021,11(16):e4130.
196. Sakamoto A, Cornelissen A, Sato Y, Mori M, Kawakami R, Kawai K, Ghosh SKB, Xu W, Abebe BG, Dikongue A, Kolodgie FD, Virmani R, Finn AV. Vulnerable plaque in patients with acute coronary syndrome: Identification, importance, and management. *US Cardiology Review*. 2022, 16:e01.
197. Santivasi WL, Xia F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014, 21:251-259.
198. Santos RAd, Takahashi CS. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage *in vitro* in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(2):671-677.
199. Santovito A, Gendusa C. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects living in turin (North-Italy): contribution of body mass index, age and sex. *Annals of Human Biology*. 2020, 47:48-54.
200. Santovito A, Nigretti AA, Sellitri AAA, Manuel Scarfò M, Nota A. Regular sport activity is able to reduce the level of genomic damage. *Biology*. 2023, 12:1110.
201. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 2021, 11(1):263-276.
202. Sevindik M, Ozdemir B, Bal C, Selamoglu Z. Bioactivity of EtOH and MeOH extracts of basidiomycetes mushroom (*Stereum hirsutum*) on atherosclerosis. *Archives of Razi Institute*. 2021, 76(1):87-94.

203. Seferović Mitrović JP, Seferović PM, Vujisić Tešić B, Petrović M, Ristić AD, Lalić K, Jotić A, Tešić M, Giga V, Milić N, Singh S, Lalić NM. Predictors of diabetic cardiomyopathy in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *International Journal of Cardiology*. 2012, 156(2):219-221.
204. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies heart failure: recent advances in basic science. *Lancet*. 2011, 378:704-712.
205. Shah AV, Bennett MR. DNA damage-dependent mechanisms of ageing and disease in the macro- and microvasculature. *European Journal of Pharmacology*. 2017, 816:116-128.
206. Shaker GH, Melake NA. Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012, 20(3):221-227.
207. Sharif R, Thomas P, Zalewski P, Fenech M. The role of zinc in genomic stability. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012, 733:111-121.
208. Sharifi-Rad J, Rodrigues CF, Sharopov F, Docea AO, Karaca AC, Sharifi-Rad M, Karıncaoglu DK, Gülseren G, Şenol E, Demircan E, Taheri Y, Suleria HAR, Özçelik B, Kasapoğlu KN, Gültekin-Özgüven M, Daşkaya-Dikmen C, Cho WC, Martins N, Calina D. Diet, lifestyle and cardiovascular diseases: Linking pathophysiology to cardioprotective effects of natural bioactive compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17(7): 2326.
209. Sherratt SCR, Libby P, Budoff MJ, Bhatt DL, Mason RP. Role of Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease: the Debate Continues. *Current Atherosclerosis Reports*. 2023, 25(1):1-17.
210. Shirato S, Swan BA. Women and cardiovascular disease: an evidentiary review. *Medsurg Nursing*. 2010, 19(5):282-86.
211. Siddiqui AJ, Holzmann MJ. Association between reduced left ventricular ejection fraction following non-ST-segment elevation myocardial infarction and long-term mortality in patients of advanced age. *International Journal of Cardiology*. 2019, 296:15-20.
212. Silva MAP, Figueiredo DBS, Carvalho LR, Braz LG, Braz MG. Modulation of gene expression and influence of gene polymorphisms related to genotoxicity and redox status on occupational exposure to inhaled anesthetics. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2024, 256:114307.
213. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988, 175:184-191.

214. Slonina D, Spekl K, Panteleeva A, Brankovic K, Hoinkis C, Dörr W. Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2003, 42:55-61.
215. Smith Jr SC, Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, Grundy SM, Hiratzka L, Jones D, Krumholz HM, Mosca L, Pasternak RC, Pearson T, Pfeffer MA, Taubert KA. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update. Endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2006, 47:2130.
216. Song JB, Chen M, Li ZQ, Zhang JF, Hu H, Tong XL, Dai FY. Astragalus polysaccharide extends lifespan via mitigating endoplasmic reticulum stress in the silkworm, *Bombyx mori*. *Aging and Disease*. 2019, 10:1187–1198.
217. Stajić M. Nutritivna svojstva i medicinski potencijal makromiceta. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. 2015, str. 114, ISBN:978-86-7078-122-1
218. Stajić D, Đonović N. Kardiovaskularne bolesti – faktori rizika. *Medical Journal Kragujevac*. 2016, 50(5):43-48.
219. Stefani GP, Nunes RB, Rossato DD, Hentschke VS, Domenico MD, Lago PD, Rhoden CR. Quantification of DNA damage in different tissues in rats with heart failure. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2020;114:234-242.
220. Subash P. Assessment of oxidative DNA damage by alkaline comet assay in human essential hypertension. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2016, 31:185–193.
221. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants—natural health products for human health. *Molecules*. 2023, 28(4):1845.
222. Surniyantoro HNE, Lusiyantri Y, Rahardjo T, Tetriana D, Nurhayati S, Date H. Polymorphism of *XRCC1* gene exon 6 (Arg194Trp) in relation to micronucleus frequencies in hospital radiation workers. *Atom Indonesia* 2018, 44:105-111.
223. Suto Y, Tominaga T, Akiyama M, Hirai M. Cytogenetic examination of human peripheral blood lymphocytes cryopreserved after gamma irradiation: A pilot study. *J-STAGE- Cytologia*. 2020, 85(1):71-77.
224. Syaeful H, Sukadana IG, Sumaryanto A. Radiometric mapping for naturally occurring radioactive materials (NORM) assessment in Mamuju, West Sulawesi. *Atom Indonesia*. 2014, 40(1):33-9.
225. Tadin A, Stazic V, Galic N, Zeljezic D. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects in buccal mucosal cells in non-smokers and users of traditional combustible tobacco products and non-combustible alternatives. *Journal of Xenobiotics*. 2024, 14(1):154-165.
226. Taner G, Vardar DÖ, Aydin S, Aytaç Z, Başaran A, Başaran N. Use of *in vitro* assays to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of vanillic and cinnamic acid. *Drug and chemical toxicology*. 2017, 40:183-190.

227. Tang X, Liu J, Dong W, Li P, Li L, Lin C, Zheng Y, Hou J, Li D. The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, 11:820695.
228. Tanveer MA, Rashid H, Tasduq SA. Molecular basis of skin photoaging and therapeutic interventions by plant-derived natural product ingredients: A comprehensive review. *Heliyon*. 2023, 9:e13580.
229. Torabi A, Cleland JG, Rigby AS, Sherwi N. Development and course of heart failure after a myocardial infarction in younger and older people. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2014, 11:1-12.
230. Torres-Fuentes C, Suárez M, Aragonès G, Mulero M, Ávila-Román J, Arola-Arnal A, Salvadó MJ, Arola L, Bravo FI, Muguerza B. Cardioprotective properties of phenolic compounds: A role for biological rhythms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2022, 66(21):e2100990
231. Tran HB, Yamamoto A, Matsumoto S, Ito H, Igami K, Miyazaki T, Kondo R, Shimizu K. Hypotensive effects and angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides of Reishi (*Ganoderma lingzhi*) auto-digested extract. *Molecules*. 2014, 19(9):13473-13485.
232. Truong V, Huang S, Dennis J, Lemire M, Zwingerman N, Aïssi D, Kassam I, Perret C, Wells P, Morange PE, Wilson M, Trégouët DA, Gagnon F. Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene *PHGDH*. *Scientific Reports*. 2017, 7:11207.
233. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell*. 2017, 168:644-656.
234. Tubić Vukajlović J, Simić I, Milošević-Djordjević O. DNA and chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes in patients with acute coronary syndrome and undergoing coronary angiography. *Anatolian Journal of Cardiology*. 2021a, 25:243-249.
235. Tubić Vukajlović J, Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Marković A, Grujičić D, Đelić N, Radaković M, Milošević-Djordjević O. Evaluation of biological activities of acetone extract of the mushroom *Leccinum scabrum*. *Farmacia*. 2021b, 69(5):974-979.
236. Tubić Vukajlović J, Simić I, Smiljanić Z, Grujičić D, Milošević-Djordjević O. Genome instability in peripheral blood lymphocytes of patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Mutagenesis*. 2023, 38(2):84-92.
237. Tubić Vukajlović J, Djordjević K, Tosti T, Simić I, Grbović F, Milošević-Djordjević O. *In vitro* effect of *Lenzites betulinus* mushroom against therapy-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with acute coronary syndrome. *Journal of Ethnopharmacology*. 2024, 335:118640.

238. Udeh AS, Ezebialu CU, Eze EA, Engwa GA. Antibacterial and antioxidant activity of different extracts of some wild medicinal mushrooms from Nigeria. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2021, 23(10):83-95.
239. Ulsh BA. Are risks from medical imaging still too small to be observed or nonexistent? *Dose-Response*. 2015, 13:14-30.
240. Uzelac B. Gljive Srbije i zapadnog Balkana. BGV Logik, Beograd. 2009, str. 114, ISBN: 978-86-912677-0-4.
241. Vageli DP, Doukas PG, Doukas SG, Tsatsakis A, Judson BL. Noxious combination of tobacco smoke nitrosamines with bile, deoxycholic acid, promotes hypopharyngeal squamous cell carcinoma, via NFκB, In Vivo. *Cancer Prevention Research*. 2022, 15(5):297–308.
242. Valente P., Andrade P.B., Rangel J., et al. (2005) Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4925-4931.
243. Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*. 2015, 2015:376387.
244. Vaz JA, Almeida GM, Ferreira ICFR, Martins A, Vasconcelos MH. Clitocybe alexandri extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*. 2012, 132:482-486.
245. Vetter J. The Mushroom glucans: Molecules of high biological and medicinal importance. *Foods*. 2023, 12:1009.
246. Vidal-Perez R, Abou Jokh Casas C, Agra-Bermejo RM, Alvarez-Alvarez B, Grapsa J, Fontes-Carvalho R, Veloso PR, Acuña JMG, Gonzalez-Juanatey JR.. Myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries: A comprehensive review and future research directions. *World Journal of Cardiology*. 2019, 11:305-315.
247. Vijg J. From DNA damage to mutations: all roads lead to aging. *Ageing Research Reviews*. 2021, 68:101316.
248. Visweswaran S, Joseph S, Vinay Hegde S, Annalakshmi O, Jose MT, Perumal V. DNA damage and gene expression changes in patients exposed to low-dose X-radiation during neuro-interventional radiology procedures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental*. 2019, 844:54-61.
249. Vital N, Antunes S, Louro H, Vaz F, Simões S, Penque D, João Silva M. Environmental tobacco smoke in occupational settings: effect and susceptibility biomarkers in workers from Lisbon restaurants and bars. *Frontiers and Public Health*. 2021, 9:674142.

250. Vrablik M, Tichý L, Freiburger T, Blaha V, Satny M, Hubacek JA. Genetics of familial hypercholesterolemia: New insights. *Frontiers in Genetics*. 2020, 11:574474.
251. Waller C, Rhee D, Gröger M, Rappel M, Maier T, Müller M, Rottler E, Nerz K, Nerz C, Brill S, Becker H, Radermacher P. Social stress-induced oxidative DNA damage is related to prospective cardiovascular risk. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, 9(11):3783.
252. Wang L, Pan X, Jiang L, Chu Y, Gao S, Jiang X, Zhang Y, Chen Y, Luo S, Peng C. The biological activity mechanism of chlorogenic acid and its applications in food industry. *Frontiers in Nutrition*. 2022, 9:943911.
253. Wang X, Zhang C, Bao N. Molecular mechanism of palmitic acid and its derivatives in tumor progression. *Frontiers in Oncology*. 2023, 13:1224125.
254. Welsh A, Hammad M, Piña IL, Kulinski J. Obesity and cardiovascular health. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2024, 13(8):1026-1035.
255. Wen-Bo L, Ming-Yi Z, Ying S, Jia-Wen L, Ji-Wei O, Xiao-Chen W, Rui-Feng W, Jin-Hua L, Paul G, Ming L. Human activity and climate change accelerate the extinction risk to non-human primates in China. *Global Change Biology*. 2024, 30(1):e17114.
256. Wilms LC, Hollman PCH, Boots AW, Kleinjans J. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005, 582(1-2):155-162.
257. Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and young subjects. *Mutagenesis*. 2007, 22(3):195-200.
258. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food research international*. 2011, 44(1):217-224.
259. World Health Organization (WHO). Noncommunicable diseases progress monitor 2022. Geneva, 2022, ISBN:978-92-4-004776-1.
260. Wright RS, Anderson JL, Adams CD, Bridges CR, Casey DE Jr, Ettinger SM, Fesmire FM, Ganiats TG, Jneid H, Lincoff AM, Peterson ED, Philippides GJ, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP, Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey Jr DE, Chavey WE, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Zidar JP. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non-STElevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in collaboration with the American Academy of Family Physicians, Society for Cardiovascular

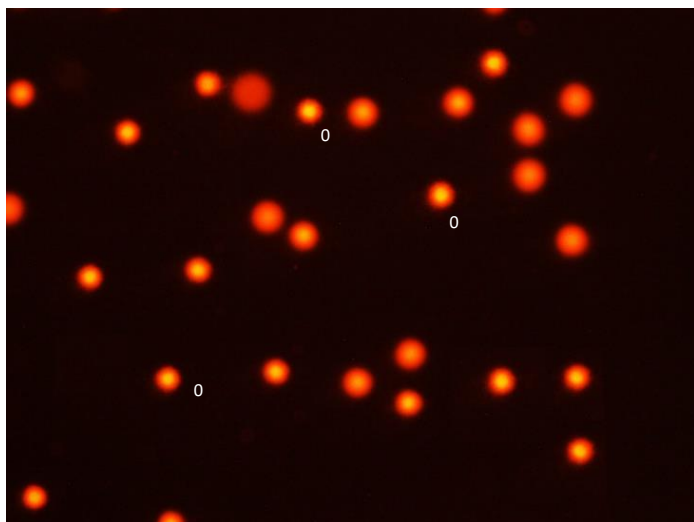
- Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011, 57(19):215-367.
261. Xi B, Chandak GR, Shen Y, Wang Q, Zhou D. Association between common polymorphism near the MC4R gene and obesity risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2012, 7:e45731.
 262. Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamazaki T, Shiota M, Sano S, Tanaka M, Osada-Oka M, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2015, 178:239-246.
 263. Yamamoto T. Genomic aberrations associated with the pathophysiological mechanisms of neurodevelopmental disorders. *Cells*. 2021, 10(9):2317.
 264. Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H. Oxidative stress-mediated atherosclerosis: Mechanisms and therapies. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:1–16.
 265. Yu X, Liu Y, Wang Y, Feng X, Tu M, Chen J. Role of bioengineering and laborers in integration of farmland resources toward to improve dimension of sustainable agriculture in China. *Bioengineered*. 2020, 11(1):559–571
 266. Zabarmawi Y. Assessment of DNA damage in healthcare workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation in the comet assay: Meta-analysis. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2024, 17:100864.
 267. Zeng X, Jia N, Meng L, Shi J, Li Y, Hu J, Hu X, Li H, Xu H, Li J, Qi X, Wang H, Zhang Q, Li J, Liu D. A study on the prevalence and related factors of frailty and pre-frailty in the older population with hypertension in China: A national cross-sectional study. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022, 9:1057361.
 268. Zhang X, Xing L, Jia X, Pang X, Xiang Q, Zhao X, Ma L, Liu Z, Hu K, Wang Z, Cu Y. Comparative lipid-lowering/increasing efficacy of 7 statins in patients with dyslipidemia, cardiovascular diseases, or diabetes mellitus: systematic review and network meta-analyses of 50 randomized controlled trials. *Cardiovascular Therapeutics*. 2020, 2020:3987065.
 269. Zhong JJ, Xiao JH. Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2009, 113:79-150.
 270. Zhou Y, Chu M, Dunshea FR, Ahmadi F, Suleria HAR. A Comprehensive review on phytochemical profiling in mushrooms: Occurrence, biological activities, applications and future prospective. *Food Reviews International*. 2024, 40:924-951.
 271. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019, 195:120-129.

272. Zou YB, Hui RT, Song L. The era of clinical application of gene diagnosis in cardiovascular diseases is coming. *Chronic Diseases and Translationa Medicine*. 2020, 5:214–220.

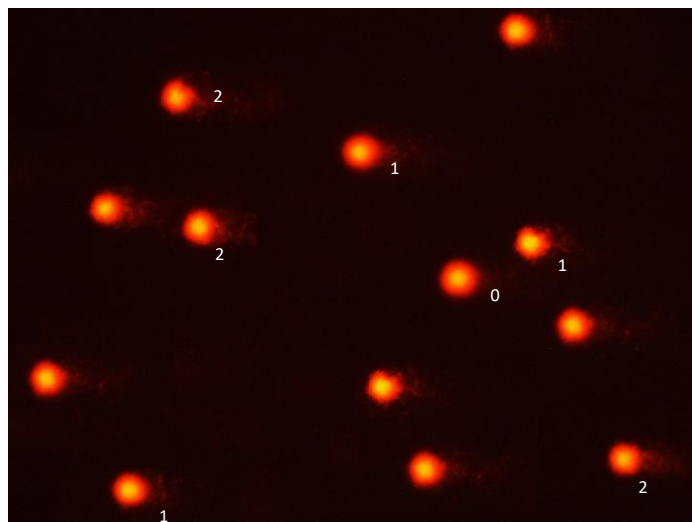
8. ПРИЛОЗИ

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЕ МИКРОГРАФИЈЕ СЛИКАНЕ НА МИКРОСКОПУ NIKON E50i

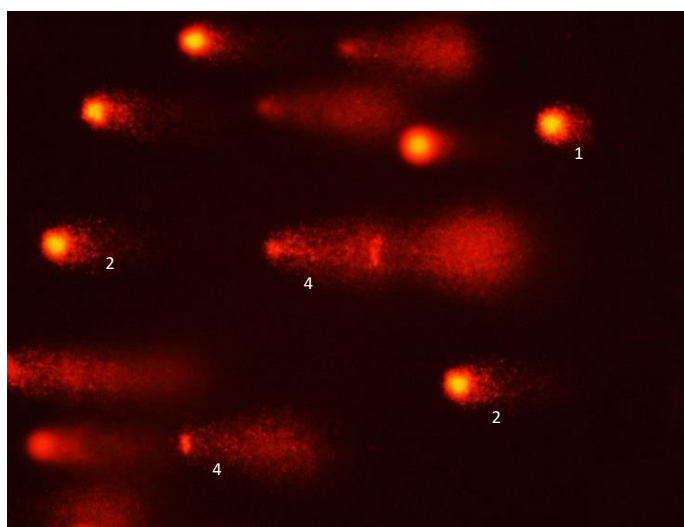
Комет тест:



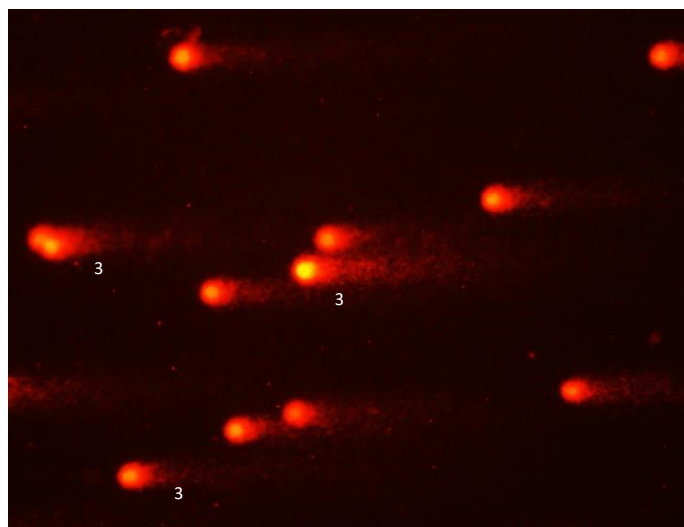
Слика 20. Изглед ћелија без оштећења (класа комета 0) (увећање 400х)



Слика 21. Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 1 и 2) (увећање 400х)

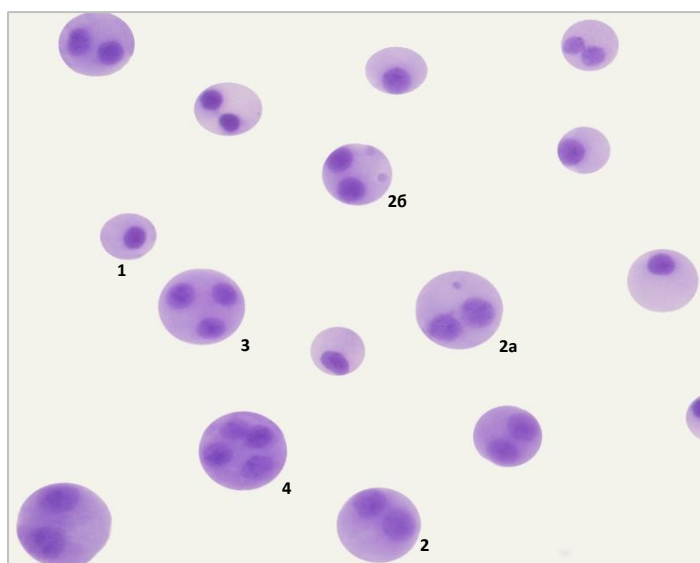


Слика 22. Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 1, 2 и 4) (увећање 400х)

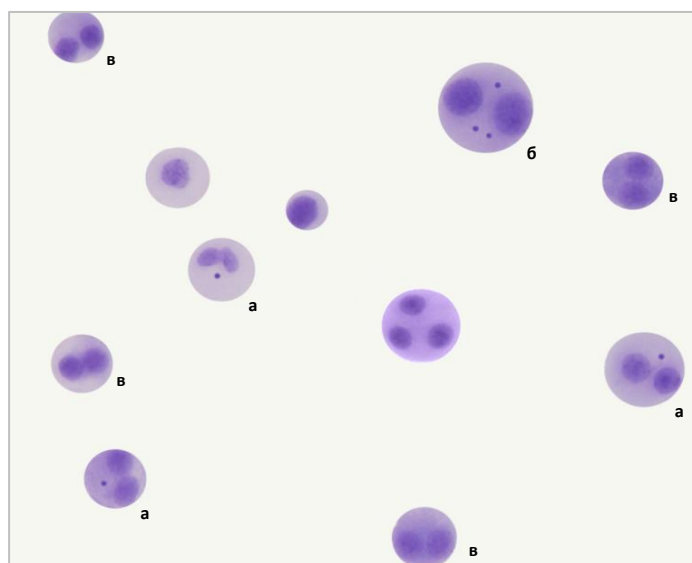


Слика 23. Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 3) (увећање 400х)

Цитокинезис-блок микронуклеус (МН) тест:



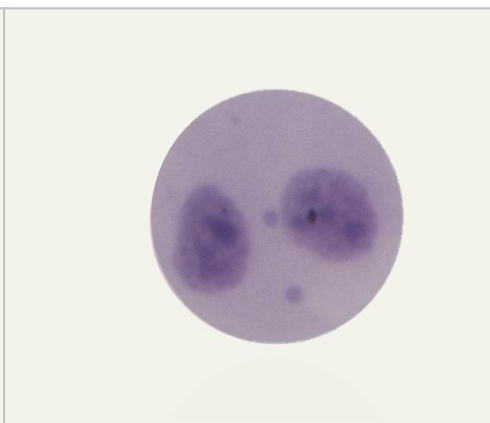
Слика 24. Видно поље лимфоцита при увећању 200x 1. мононуклеусна, 2. бинуклеусна са 1 МН (2a) и 2 МН (2б), 3. тринуклеусна и 4. квадринуклеусна ћелија



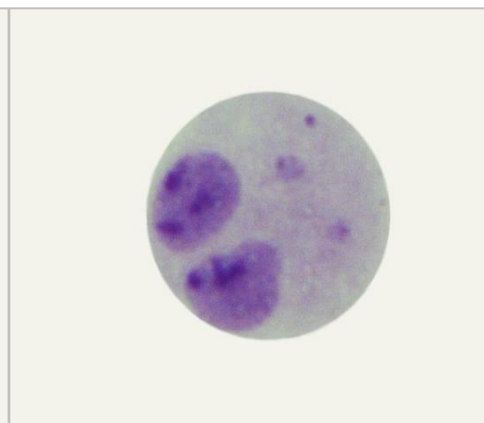
Слика 25. Бинуклеусне ћелије са 1 МН (а) и 3 МН (б) и без МН (в) (увећање 200x)



Слика 26. Бинуклеусна ћелија са 1 МН (увећање 400x)



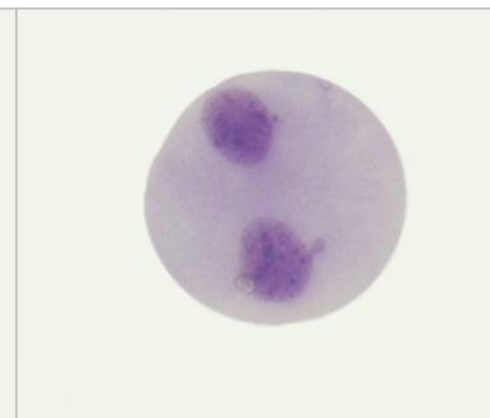
Слика 27. Бинуклеусна ћелија са 2 МН (увећање 400x)



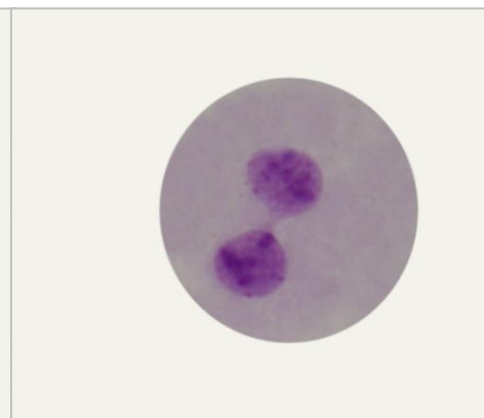
Слика 28. Бинуклеусна ћелија са 3 МН (увећање 400x)



Слика 29. Бинуклеусна ћелија са 4 МН (увећање 400x)



Слика 30. Бинуклеусна ћелија са нуклеусним пупољком (увећање 400x)



Слика 31. Бинуклеусна ћелија са нуклеоплазматским мостом (увећање 400x)

Листа скраћеница

ALT	Аланин аминотрансфераза (енгл. alanine transaminase)
ANOVA	Једнофакторска анализа варијансе (енгл. analysis of variance)
AST	Аспартат аминотрансфераза (енгл. aspartate transaminase)
CRP	Ц-реактивни протеин (енгл. C-reactive protein)
DMSO	Диметил-сулфоксид (енгл. Dimethylsulfoxide)
EF	Ејекциона фракција (енгл. Ejection fraction)
FISH	Флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизација (енгл. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
Fpg	Формаидопиримидин гликозилаза (енгл. formamidopyrimidine DNA glycosylase)
GDI	Индекс генетичког оштећења (енгл. Genetic Damage Index)
HDL	Липопротеини велике густине (енгл. high-density lipoprotein)
HUMN	Human MicroNucleus
ICP-OES	индуктивно спрегнута плазма оптичком емисионом спектрометријом (енгл. inductively coupled plasma optical emission spectrometry)
<i>L. betulinus</i>	<i>Lenzites betulinus</i>
LDL	Липопротеини мале густине (енгл. low-density lipoprotein)
LOD	Граница детекције (енгл. Limit of Detection)
LOQ	Граница квантификације (енгл. Limit of Quantification)
NDI	Индекс нуклеусне деобе (енгл. nuclear division index)
NSTEMI	Акутни инфаркт миокарда без елевације СТ сегмента (енгл. Non ST-Elevation Myocardial Infarction)
PBS	Фосфатни пуфер (енгл. Phosphate-buffered saline)
PCI	Перкутана коронарна интервенција (енгл. Percutaneous Coronary Interventions)
proBNP	pro-B-type natriuretic peptide
STEMI	Акутни инфаркт миокарда са елевацијом СТ сегмента (енгл. ST-Elevation Myocardial Infarction)
UHPLC-DADMS/MS	Течна хроматографија ултра високих перформанси са детектором диодног низа који је повезан са TSQ Quantum Access Maxtriple-quadrupole масеним спектрометром
$X \pm SD$	Средња вредност $\pm$ стандардна девијација
АИМ	Акутни инфаркт миокарда
АКС	Акутни коронарни синдром
БН	Бинуклеусна ћелија
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
ЕКГ	електрокардиограм
КА	Коронарна ангиографија
КВБ	Кардиоваскуларне болести
МКБ	Међународна класификација болести
МН	Микронуклеус
НАП	Нестабилна ангина пекторис
НП	Нуклеусни пупољци
НПМ	Нуклеоплазматски мостови
СИ	Срчана инсуфицијенција
СК	Креатинин киназа
СК-МВ	МБ изоензим креатинин киназе
ЦБМН	Цитокинезис-блок микронуклеус тест
8-OhdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

Листа графикана

- Графикон 1.** Упоредна анализа промена у геному пацијената и здравих особа који су процењивани на нивоу молекула ДНК и на нивоу хромозома
- Графикон 2.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима здравих особа
- Графикон 3.** Дистрибуција бинуклеусних ћелија у лимфоцитима здравих особа
- Графикон 4.** Просечан А) %ДНК оштећења и Б) индекс генетичког оштећења у лимфоцитима здравих особа и пацијената са акутним коронарним синдромом којима је ординирана одговарајућа терапија
- Графикон 5.** Упоредна анализа нивоа геномског оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије: А) %ДНК оштећења и Б) индекс генетичког оштећења
- Графикон 6.** Дистрибуција класа ћелија у односу на ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената А) пре и Б) након коронарне ангиографије
- Графикон 7.** Разлике у нивоу А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења при укупној дози до 500 mGy и преко 500 mGy
- Графикон 8.** Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда А) пре и Б) након коронарне ангиографије
- Графикон 9.** Просечне фреквенце А) микронуклеуса и Б) индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви здравих особа и пацијената са акутним коронарним синдромом
- Графикон 10.** Резултати просечних фреквенци А) микронуклеуса и Б) индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом пре и након коронарне ангиографије
- Графикон 11.** Дистрибуција бинуклеусних ћелија код пацијената са акутним коронарним синдромом А) пре и Б) након коронарне ангиографије
- Графикон 12.** Разлике у фреквенцама микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима пацијената при дозама А) до 500 mGy и Б) преко 500 mGy
- Графикон 13.** Упоредна анализа просечних фреквенци микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе А) пре и Б) након коронарне ангиографије код пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда

- Графикон 14.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом
- Графикон 15.** Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и здравих особа
- Графикон 16.** Дистрибуција бинуклеусних ћелија код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом
- Графикон 17.** Просечне фреквенце микронуклеуса (А) и индекса нуклеусне деобе (Б) у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и здравих особа
- Графикон 18.** Ниво геномске нестабилности код пацијената са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом
- Графикон 19.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 20.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 21.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви здравих особа третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 22.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 23.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 24.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 25.** Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења код пацијената са нестабилном ангином пекторис у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus in vitro*
- Графикон 26.** Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења код пацијената са акутним инфарктом миокарда у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*

- Графикон 27.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 28.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 29.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 30.** Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења у лимфоцитима пацијената са нестабилном ангином пекторис након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Графикон 31.** Просечне вредности А) %ДНК оштећења и Б) индекса генетичког оштећења у лимфоцитима пацијената са акутним инфарктом миокарда након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Графикон 32.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама ацетонског екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 33.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама воденог екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*
- Графикон 34.** Дистрибуција класа комета у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом третираним различитим концентрацијама етанолног екстракта гљиве *L. betulinus in vitro*

Листа табела

Табела 1.	Демографски и анамнестички подаци пацијената оболелих од кардиоваскуларних болести и здравих особа
Табела 2.	Комбинација групе лекова коју су примали пацијенти са акутним коронарним синдромом и срчаном инсуфицијенцијом
Табела 3.	Промене у геному пацијената са кардиоваскуларним болестима и здравих особа процењиваних на нивоу молекула ДНК и хромозома
Табела 4.	Оксидационо оштећење молекула ДНК у лимфоцитима здравих особа
Табела 5.	Фреквенца микронуклеуса, дистрибуција микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе у лимфоцитима здравих особа
Табела 6.	Терапијом-индуковано оштећење молекула ДНК у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом
Табела 7.	Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије
Табела 8.	Терапијом-индукован %ДНК оштећења и индекса генетичког оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда пре и након коронарне ангиографије
Табела 9.	Фреквенце микронуклеуса, нуклеусних пупољака, нуклеоплазматских мостова и индекса нуклеусне деобе код пацијената са акутним коронарним синдромом
Табела 10.	Фреквенца микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе код пацијената са акутним коронарним синдромом након коронарне ангиографије
Табела 11.	Просечне фреквенце микронуклеуса и индекса нуклеусне деобе у лимфоцитима периферне крви пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда пре и након коронарне ангиографије
Табела 12.	Биваријантна корелациона и мултиваријабилна регресиона анализа као предиктори геномских оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом
Табела 13.	Проценат ДНК оштећења, индекс генетичког оштећења и дистрибуција класа комета у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом
Табела 14.	Фреквенца микронуклеуса и индекс нуклеусне деобе у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом

- Табела 15.** Биваријантна корелациона и мултиваријабилна регресиона анализа као предиктори геномских оштећења код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом
- Табела 16.** Ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro*
- Табела 17.** Просечне вредности нивоа ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви здравих особа након третмана различитим концентрацијама ацетонског, воденог и етанолног екстракта гљиве *Lenzites betulinus in vitro*
- Табела 18.** Терапијом-индуковани ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)
- Табела 19.** Просечне вредности ДНК оштећења код пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Табела 20.** Зрачењем-индуковани ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са акутним коронарним синдромом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)
- Табела 21.** Просечне вредности ДНК оштећења код пацијената након коронарне ангиографије у третману са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Табела 22.** Терапијом-индукован ниво ДНК оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијената са срчаном инсуфицијенцијом након третмана екстрактима гљиве *L. betulinus in vitro* (n = 30)
- Табела 23.** Просечне вредности ДНК оштећења у лимфоцитима пацијената са срчаном инсуфицијенцијом након третмана са различитим екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Табела 24.** Садржај минерала у сувој гљиви *Lenzites betulinus*
- Табела 25.** Садржај шећера у сувој материји гљиве *Lenzites betulinus*
- Табела 26.** Садржај масних киселина у гљиви *Lenzites betulinus*
- Табела 27.** Садржај органских киселина у гљиви *Lenzites betulinus*
- Табела 28.** Укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима гљиве *Lenzites betulinus*
- Табела 29.** Полифенолни састав ацетонског, етанолног и воденог екстракта гљиве *Lenzites betulinus*

Листа слика

- Слика 1.** Типови срчаних болести
- Слика 2.** Електрокардиограм код акутног инфаркта миокарда са елевацијом СТ сегмента
- Слика 3.** Електрокардиограм код акутног инфаркта миокарда без елевације СТ сегмента
- Слика 4.** Коронарни ангиограм пацијента са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента А) постојање стенозе десне коронарне артерије Б) иста коронарна артерија након уградње интракоронарног стента
- Слика 5.** Коронарни ангиограм пацијента са акутним коронарним синдромом без елевације СТ сегмента А) критична стеноза у проксималној левој предњој силазној артерији Б) иста коронарна артерија након уградње интракоронарног стента
- Слика 6.** Срчана инсуфицијенција са смањеном ејекционом фракцијом
- Слика 7.** Генетска предиспозиција за кардиоваскуларне болести
- Слика 8.** Изглед ћелија приликом миграције молекула ДНК
- Слика 9.** Различит изглед комета класе 4: А) апоптотична Б) некротична ћелија
- Слика 10.** Бинуклеусне ћелије са једним, два и три микронуклеуса
- Слика 11.** Механизми настанка микронуклеуса. А) Микронуклеус који потиче од заосталог ацентричног фрагмента хромозома Б) Микронуклеус који потиче од заосталог целог хромозома В) једра бинуклеусне ћелије са неправилно раздвојеним хромозомима
- Слика 12.** Ћелијска деоба и формирање микронуклеуса уз додавање цитохалазина Б и без цитохалазина Б у култури ћелија
- Слика 13.** Биомаркери генетичког оштећења А) Бинуклеусна ћелија са два микронуклеуса; Б) Бинуклеусна ћелија са нуклеоплазматским мостом; В) Бинуклеусна ћелија са нуклеусним пуполком
- Слика 14.** Изглед плодносног тела врсте *Lenzites betulinus* (L.) Fr.
- Слика 15.** Изглед хименофора листичавке
- Слика 16.** Изглед меса гљиве на пресеку
- Слика 17.** Распрострањење врсте *Lenzites betulinus*
- Слика 18.** Класе комета: класа 0 – нема оштећења, класа 1 – низак ниво оштећења, класа 2 – средњи ниво оштећења, класа 3 – висок ниво оштећења и класа 4 – потпуно оштећење
- Слика 19.** Приказ ћелије са: А) једним Б) два В) три и Г) четири једра
- Слика 20.** Изглед ћелија без оштећења (класа комета 0)

- Слика 21.** Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 1 и 2)
- Слика 22.** Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 1, 2 и 4)
- Слика 23.** Изглед ћелија са оштећењем (класа комета 3)
- Слика 24.** Видно поље лимфоцита при увећању 200х 1. моноклеусна, 2. бинуклеусна са 1 МН (2а) и 2 МН (2б), 3. тринуклеусна и 4. квадринуклеусна ћелија
- Слика 25.** Бинуклеусна ћелија са 1 МН (а) и 3 МН (б)
- Слика 26.** Бинуклеусна ћелија са 1 МН (увећање 400х)
- Слика 27.** Бинуклеусна ћелија са 2 МН (увећање 400х)
- Слика 28.** Бинуклеусна ћелија са 3 МН (увећање 400х)
- Слика 29.** Бинуклеусна ћелија са 4 МН (увећање 400х)
- Слика 30.** Бинуклеусна ћелија са нуклеусним пупољком
- Слика 31.** Бинуклеусна ћелија са нуклеоплазматским мостом

БИОГРАФИЈА

Јована М. Тубић Вукајловић је рођена 27.11.1992. године у Крагујевцу, где је завршила основно и средње образовање, са одличним успехом. Дипломске академске студије Биологија на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу је завршила 2015. године. Мастер академске студије Биологија, Модул молекуларни биолог завршила је 2016. године на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу. Докторске академске студије Биологија уписала је школске 2016/2017. године, на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

У периоду од 2017. до 2019. године, била је стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у научној области Биотехнологија и пољопривреда. Као стипендиста била је ангажована на пројекту “Преклиничка испитивања биоактивних супстанци” (ИИИ41010), финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У звање истраживач-приправник изабрана је 17.05.2017. године за научну област Биологија у Институту за биологију и екологију на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Од 06.06.2019. године до 30.09.2020. године била је запослена као истраживач-приправник у оквиру пројекта ИИИ41010 на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу.

У звање асистент за ужу научну област Генетика и еволуција у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу је изабрана 30.09.2020. године.

Јована Тубић Вукајловић аутор је и коаутор 36 научне публикације од којих 18 радова М20 категорије (М21- 1 рад, М22 – 9 радова, М23 – 7 радова и М24 – 1 рад). Имала је и саопштења на националним научним скуповима из категорије М34 – 5 саопштења и М64 – 13 саопштења.

DNA and chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes in patients with acute coronary syndrome undergoing a coronary angiography

Jovana Tubić Vukajlović¹, Ivan Simić^{2,3}, Olivera Milošević-Djordjević^{1,4}

¹Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac; Kragujevac-Serbia

²Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Kragujevac-Serbia

³Department of Cardiology, Clinical Center Kragujevac; Kragujevac-Serbia

⁴Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Kragujevac-Serbia

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to evaluate the DNA and chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of patients with acute coronary syndrome (ACS) and to explore the effect of coronary angiographies in these patients.

Methods: The study included ACS patients who underwent a coronary angiography (CAG) and healthy controls. The ACS sample was divided into two groups: patients with unstable angina pectoris (UAP) and acute myocardial infarction (AMI). The frequency of DNA damage [expressed as genetic damage index (GDI)] was analyzed using the comet assay pre- and post-CAG. Chromosomal aberrations were measured as micronuclei (MNs) frequency using the cytokinesis-block MN (CBMN) assay. Additionally, detailed anamnestic data were taken from the each patient.

Results: Increased levels of DNA and chromosomal damage have been revealed in ACS patients compared to the healthy controls. GDI values were also significantly higher in AMI patients than in UAP patients. A highly significant increase of DNA damage was also observed in all patients post-CAG. There was significantly higher MN frequency and significantly lower nuclear division index (NDI) in AMI patients than in UAP patients' pre-CAG. After CAG, there was no significant difference in MN frequencies and NDI values between UAP and AMI patients.

Conclusion: Correlated with disease severity, our results showed that AMI patients have higher levels of both DNA and chromosomal damage in PBLs compared to UAP patients. The increased level of genome instability was especially evident post-CAG compared to the observed damage pre-CAG.

Keywords: acute coronary syndrome, coronary angiography, DNA damage, chromosomal aberrations, peripheral blood lymphocytes

Cite this article as: Tubić Vukajlović J, Simić I, Milošević-Djordjević O. DNA and chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes in patients with acute coronary syndrome undergoing a coronary angiography. *Anatol J Cardiol* 2021; 25: 243-9.

Introduction

Acute coronary syndrome (ACS) represents a set of various clinical conditions that result from abrupt circulatory disorders in coronary arteries, which are induced by a rupture of atherosclerotic plaque with accompanying thrombosis, inflammation, vasoconstriction, and microembolization. ACS includes conditions ranging from unstable angina pectoris (UAP) to acute myocardial infarction (AMI) (1). Despite its invasive qualities, the most frequently used method for diagnosing patients with coronary ar-

tery disease is the coronary angiography (CAG) (2). Radiographic contrast media (RCM) is used in all angiographic procedures, so this means that patients are exposed to X-rays—a form of electromagnetic radiation. RCM have direct mitogenic, cytotoxic, and cytostatic activities (3) and increases the content of free radicals which produce DNA damage in the individual (4). The excessive production of reactive oxygen species can oxidize cellular macromolecules (5) and DNA, causing DNA strand breaks, alkali-labile sites, and incomplete repair sites and cross-links (6).

Several studies evaluated cytogenetic damage in patients with cardiovascular disease (CVD) and have reported that

Address for Correspondence: Olivera Milošević-Djordjević, MD, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac; Kragujevac-Serbia
Phone: +38134335039 E-mail: olivera.djordjevic@pmf.kg.ac.rs

Accepted Date: 23.10.2020 **Available Online Date:** 16.03.2021

©Copyright 2021 by Turkish Society of Cardiology - Available online at www.anatoljcardiol.com
DOI:10.14744/AnatolJCardiol.2020.39479





Original Manuscript

Genome instability in peripheral blood lymphocytes of patients with heart failure and reduced ejection fraction

Jovana Tubić Vukajlović¹, Ivan Simić^{2,3}, Zorica Smiljanić³, Darko Grujičić¹,
Olivera Milošević-Djordjević^{1,4,*}

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, 34000 Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, 34000 Kragujevac, Serbia

³University Clinical Center Kragujevac, Department of Cardiology, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, 34000 Kragujevac, Serbia

*Corresponding author. University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia. E-mail: olivera.djordjevic@pmf.kg.ac.rs

Abstract

Heart failure (HF) is a complex clinical condition characterized by functional and structural defects of the myocardium, but genetic and environmental factors are considered to play an important role in the development of the disease. In the present study, we investigated the genome instability (DNA and chromosomal damage) in patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) $\leq 40\%$ and its association with risk factors. The studied population included 48 individuals, of which 29 HFrEF patients (mean age 57.41 ± 5.74 years) and 19 healthy controls (mean age 57.63 ± 6.09 years). The genetic damage index in peripheral blood lymphocytes was analyzed using the comet assay, while micronuclei frequency and nuclear division index were analyzed using the cytokinesis-block micronucleus assay. Our results showed that HFrEF patients had a significantly higher genetic damage index compared with the healthy controls ($P < .001$). Cytokinesis-block micronucleus assay showed that the average micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of patients was significantly higher, while the nuclear division index values were significantly lower than in controls ($P < .01$). Using multiple linear regression analysis, pathological state, ejection fraction, creatinine, glucose, associated disease, residence, proBNP, troponin, urea, ACE-inhibitors, and length of the drug therapy were identified as predictors of DNA and/or chromosomal damage in HF patients. We can conclude that DNA and chromosomal damage was increased in patients with HF, which may be a consequence of disease and/or drug therapy.

Keywords: heart failure; DNA damage; chromosomal damage; comet assay; cytokinesis-block micronucleus assay; peripheral blood lymphocytes

Introduction

Heart failure (HF) is a complex disease characterized by structural and functional abnormalities in the heart in maintaining demand for blood [1] and affecting the changes in ventilatory mechanics which impair the uptake and supply of oxygen, inducing oxidative stress [2]. Increased oxidative stress plays an important role in the development of HF and correlates with cardiac hypertrophy, vascular endothelial dysfunction, cardiomyocyte loss due to ischemia, and adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction [3, 4]. This disease affects approximately 1%–2% of the population of developed countries and its prevalence increases approximately 1% in individuals aged 55–64 years and up to 17.4% in individuals over 85 years [5]. Reactive oxygen species are responsible for damage to proteins, lipids, DNA, and membranes. It also activates the cardiac sodium-calcium exchanger, which triggers cardiac hypertrophy through the calcium-dependent pathway and enables to calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation, causing increase in cardiomyocyte death and development of HF [6, 7]. Several studies evaluated cytogenetic damage in patients with cardiovascular disease (CVD), and have reported that chromosomal and DNA damage were increased [8–10], as well as total antioxidant capacity levels

were decreased in those individuals as compared with control populations [11, 12]. The concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine has been investigated in patients with chronic HF [13], and its measurement shows oxidative damage in one type of DNA lesion, but do not show the total damage in the DNA helix. Thus, the aim of this study was to assess global genome (DNA and chromosomal) damage in the peripheral blood lymphocytes (PBLs) of patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) using the comet and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assays. These methods are broadly used in toxicological studies and are considered to be consistent, sensitive, and highly reproducible. The most important method for the detection of single-strand breaks in the DNA of individuals cells in the alkaline comet assay [11], while the CBMN assay is the most preferred for detecting double-strand breaks in the chromosome DNA [14].

Materials and methods

Study population

The research included 48 persons, of which 29 HFrEF patients (15 male and 14 female) of mean age 57.41 ± 5.74

Received 7 November 2022; accepted 11 January 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the UK Environmental Mutagen Society. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



In vitro effect of *Lenzites betulinus* mushroom against therapy-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with acute coronary syndrome

Jovana Tubić Vukajlović^a, Katarina Djordjević^b, Tomislav Tosti^c, Ivan Simić^{d,e}, Filip Grbović^a, Olivera Milošević-Djordjević^{a,f,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, 34000, Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, 34000, Kragujevac, Serbia

^c University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute of the Republic of Serbia, 11158, Belgrade, Serbia

^d University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, 34000, Kragujevac, Serbia

^e University Clinical Center Kragujevac, Department of Cardiology, 34000, Kragujevac, Serbia

^f University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, 34000, Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Genoprotective activity

Chemical composition

Extracts

Mushroom

Lenzites betulinus

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Acute coronary syndrome (ACS) represents a group of diseases that are the result of reduced blood flow to the heart. There are natural products, based on mushrooms, used traditionally in the treatment of cardiovascular diseases.

Aim of the study: Assessment of the potential protective effect of *L. betulinus* mushroom against therapy-induced DNA damage in lymphocytes of patients with ACS in relation to the phytochemical properties of the mushroom. **Materials and methods:** The study included 30 ACS patients and 30 healthy controls. The genotoxic potential of acetone and ethanol extract of *L. betulinus* was evaluated using the comet assay. The contents of minerals were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Determination of sugars and organic acids was performed using a DIONEX ICS 3000 DP liquid chromatography system. Analysis of fatty acids was performed at Focus GC coupled with PolarisQ mass spectrometer. The total phenolic and flavonoid contents in the mushroom extracts were measured using spectrophotometric methods. The qualitative and quantitative content of polyphenolic compounds was investigated by the UHPLC-DADMS/MS method.

Results: The comet assay showed that both mushroom extracts did not increase the level of DNA damage in the lymphocytes of healthy individuals, while they significantly decreased the %DNA damage and genetic damage index ($p < 0.0005$) in the therapy-induced lymphocytes of patients. The mushroom was very rich in phytochemical composition. The results showed that the most abundant components in the mushroom were phosphorus, potassium, sodium, sulfur, and calcium among minerals and glucose, fructose, galactose, sorbitol, and turanose among carbohydrates. Among organic acids were present in higher concentrations malic, citric, and maleic acids, while among fatty acids, the most abundant were trans-linoleic, cis-oleic, palmitic, docosahexaenoic and eicosadienoic acids. The results showed that the highest amount of total phenols and flavonoids in the mushroom extracts were obtained in the acetone extract. The most abundant polyphenolic compounds were chlorogenic acid and quercetin in both extracts of mushroom.

Conclusions: This study indicates that *L. betulinus* can be considered a mushroom with a high nutritional and functional value. Extracts of the mushroom were not genotoxic in tested concentrations in cultured human lymphocytes of healthy individuals, while in ACS patients they manifested a protective effect against therapy-induced DNA damage. The acetone extract showed a stronger protective effect against therapy-induced DNA damage, which is consistent with its phytochemical composition.

* Corresponding author. University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34 000, Kragujevac, Serbia.

E-mail address: olivera.djordjevic@pmf.kg.ac.rs (O. Milošević-Djordjević).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118640>

Received 26 March 2024; Received in revised form 4 June 2024; Accepted 27 July 2024

Available online 30 July 2024

0378-8741/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

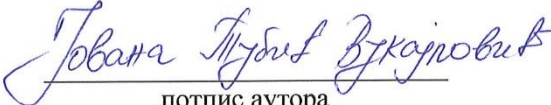
„Промене у геному лимфоцита периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима: фактори ризика и протективни ефекат гљиве *Lenzites betulinus* (L.) Fr.“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 13. 01. 2025. године,


потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Промене у геному лимфоцита периферне крви пацијената са кардиоваскуларним
болестима: фактори ризика и протективни ефекат гљиве *Lenzites betulinus* (L.) Fr.“**

истоветне.

У Крагујевцу, 13. 01. 2025. године,


потпис аутора

Образац 3

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јована Тубић Вукајловић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Промене у геному лимфоцита периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима: фактори ризика и протективни ефекат гљиве *Lenzites betulinus* (L.) Fr.“
и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 13. 01. 2025. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>