

Proksidativni učinak kvercetina na vrstu Polycelis felina (Daly.)

Matković, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:195487>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Helena Matković

**Prooksidativni učinak kvercetina na vrstu
Polycelis felina (Daly.)**

Diplomski rad

Zagreb, svibanj 2010.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Biološkom odsjeku, u Zoologiskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirjane Kalafatić, i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva diplomirani inženjer biologije, smjer ekologija.

Iskreno se zahvaljujem voditeljici prof. dr. sc. Mirjani Kalafatić na predloženoj temi, znanstvenoj i stručnoj pomoći, mnogobrojnim savjetima, te predanosti prema ovom radu i prema meni samoj, tijekom naše suradnje.

Zahvaljujem se dr. sc. Gordani Gregorović na strpljenju, susretljivosti i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Goranu Kovačeviću na ljubaznosti, susretljivosti, te znanstvenim savjetima.

Veliko hvala dipl. ing. Nives Rajević na stručnoj i tehničkoj pomoći u postavljanju pokusa, praćenju pokusa, te na brojnim savjetima i nesebičnom strpljenju.

Posebno veliko hvala Nadi Vincek, tehničarki, na predanosti ovom radu, na stručnoj i tehničkoj pomoći tijekom izrade ovog rada, a pogotovo tijekom izrade histoloških preparata. Hvala na strpljenju, ljubaznosti, te prenesenom znanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Proksidativni učinak kvercetina na vrstu *Polycelis felina* (Daly.)

Helena Matković

Zoologiski zavod,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Flavonoidi su fenolni spojevi široko rasprostranjeni u biljkama kao sekundarni metaboliti. Posjeduju širok spektar bioloških učinaka, a ti učinci posljedica su moduliranja djelovanja enzima i nuklearnih receptora, utjecaja na ekspresiju gena, te helatiranja metalnih iona. Kvercetin je najčešći flavonoid u biljkama i najviše je proučavan. Do sada nije proučavan učinak kvercetina na vrstu *Polycelis felina* (Daly.) u laboratorijskim uvjetima, koja je pogodan test organizam u ovakvim istraživanjima.

U ovim pokusima utvrđeno je da kvercetin u primjenjenim koncentracijama izaziva promjene u ponašanju tretiranih životinja, morfološke promjene u obliku depigmentacije pojedinih dijelova tijela, te promjene u histološko-citološkoj građi tretiranih planarija.

Najizrazitije promjene uočavaju se na totipotentnim stanicama neoblastima, te na retikularnim stanicama. Utvrđene promjene bile su najintenzivnije trećeg dana nakon tretiranja, a spomenute promjenjene stanice bile se zastupljene u većem broju u odnosu na kontrolnu skupinu jedinki.

Rad je pohranjen u Središnjoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.
(stranica 50 / slika 11 / literurni navodi 183 / jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: kvercetin, flavonoid, depigmentacija, kontrakcije

Neposredni voditelj:

Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Rad prihvaćen:

2.lipnja, 2010.

Ocjenvivači:

Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Doc. dr. sc. Ana Galov

Doc. dr. sc. Renata Šoštarić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Prooxidative effect of quercetin on the species *Polycelis felina* (Daly.)

Helena Matković

Department of Zoology,
University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Flavonoids are phenolic compounds widely present in plants as secondary metabolites. They exhibit a wide range of biological effects arising mainly from their ability to modulate several enzymes or nuclear receptors, alter gene expression, chelate bivalent metals. Quercetin is the most abundant of the flavonoid molecules in plants and it is the most studied one. Quercetin effect on *Polycelis felina* (Daly.), which is convenient test organism in such studies, has not been analyzed in laboratory yet.

In these tests it is determined that implemented concentration of quercetin cause behavioral changes of treated animals, morphological changes in depigmentation of certain body parts and histopathological-cytological structure of treated planarian.

The most exceptional changes are noticed on totipotent cells of neoblasts and reticular cells. Determined changes were most intensive on the third day after treatment, and above mentioned cells were represented in higher number compared to control group of animals.

Thesis stored in Central library of Department of Biology, Rooseveltov trg 6.
(pages 50 / figures 11 / references 183 / original in: Croatian)

Key words: quercetin, flavonoid, depigmentation, contractions

Supervisor:

Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Thesis accepted:

2nd June, 2010.

Reviewers:

Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Doc. dr. sc. Ana Galov

Doc. dr. sc. Renata Šoštarić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KVERCETIN	2
1.1.1. <i>Klasifikacija, strukturne i fizičke značajke</i>	2
1.1.2. <i>Rasprostranjenost u prirodi i uloga</i>	4
1.1.3. <i>Biološki učinci i mehanizmi djelovanja</i>	6
1.1.4. <i>Apsorpcija i metabolizam</i>	10
1.2. BIOLOGIJA SLATKOVODNIH PLANARIJA	12
1.2.1. <i>Sistematika i ekologija planarija</i>	12
1.2.2. <i>Morfologija i fiziologija planarija</i>	14
1.2.3. <i>Regeneracija planarija</i>	17
1.2.4. <i>Značajke procesa rasta i diobe stanica u planarija</i>	19
1.3. SVRHA ISTRAŽIVANJA	21
2. MATERIJALI I METODE	22
2.1. MATERIJAL	23
2.1.1. <i>Sakupljanje i održavanje životinja</i>	23
2.1.2. <i>Izbor planarija pogodnih za pokus</i>	23
2.2. METODE	23
2.2.1. <i>Priprema test-otopine</i>	23
2.2.2. <i>Izvedba pokusa</i>	24
2.2.3. <i>Izrada histoloških preparata</i>	24
3. REZULTATI	26
3.1. MORFOLOŠKE I LOKOMOTORNE PROMJENE VRSTE	
<i>Polycelis felina</i> (Daly.) TRETIRANE KVERCETINOM	27
3.1.1. <i>Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,2 g/L</i>	27
3.1.2. <i>Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,3 g/L</i>	28
3.1.3. <i>Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.)</i>	

<i>tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,6 g/L</i>	28
3.2. HISTOPATOLOŠKE I CITOLOŠKE PROMJENE VRSTE	
<i>Polycelis felina</i> (Daly.) TRETIRANE KVERCETINOM	29
<i>3.2.1. Histopatološke i citološke promjene vrste Polycelis felina (Daly.)</i>	
<i>tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,2 g/L</i>	29
<i>3.2.2. Histopatološke i citološke promjene vrste Polycelis felina (Daly.)</i>	
<i>tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,3 g/L</i>	32
<i>3.2.3. Histopatološke i citološke promjene vrste Polycelis felina (Daly.)</i>	
<i>tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,6 g/L</i>	34
4. RASPRAVA	37
5. ZAKLJUČAK	41
6. LITERATURA	43

1. UVOD

1.1. KVERCETIN

1.1.1. Klasifikacija, strukturne i fizičke značajke

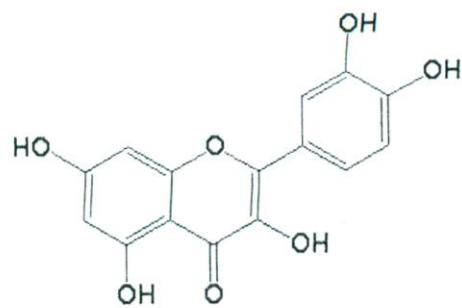
Kvercetin (3,3',4',5,7 – pentahidroksiflavon) pripada skupini fenolnih spojeva zvanih flavonoidi. Jedan je od široko rasprostranjenih flavonoida, a javlja se često u glikozidnom obliku kao rutin (5,7,3',4'-OH₂,3-rutinoza). Kvercetin, apigenin, luteolin i kaempferol, najzastupljeniji su flavonoidi u biljnoj hrani.

Osnovna struktura flavonoida proizlazi iz flavanskog kostura (slika 2.). Njega čine dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana piranskim prstenom (C), koji sadrži kisik. Flavonoidi se dijele na više podskupina ovisno o stupnju oksidacije prstena C (slika 2.): antocijani, flavoni, flavonoli i izoflavoni. Članovi unutar svake podskupine flavonoida međusobno se razlikuju po supstituentima prstenova A i B. Najčešći supstituenti su hidroksilne i metilne skupine (*National Public Health Institute (KTL), web stranica*).

U prirodi flavonoidi se najčešće pojavljuju kao glikozidi. Najmanje osam različitih monosaharida, te njihove kombinacije u obliku di- ili tri- saharida mogu se vezati za različite hidroksilne grupe flavonoida (*National Public Health Institute (KTL), web stranica*). Do sada je identificirano više od 8 000 flavonoida (*Hodek i sur., 2002.*)

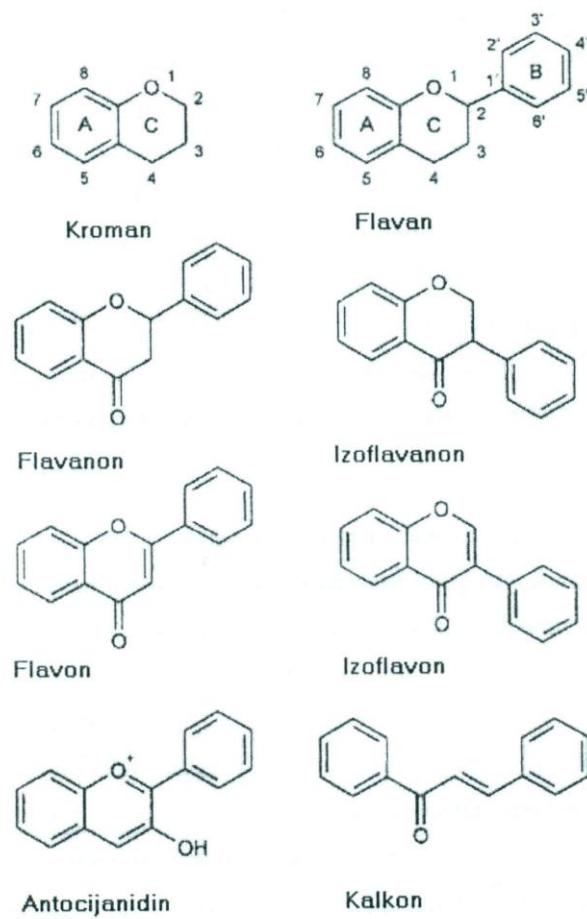
Kvercetin spada u podskupinu flavonola. Njihova je bitna značajka hidroksilna skupina na trećem ugljikovom atomu prstena C. Strukturna formula kvercetina prikazana je na slici 1.

Na sobnoj temperaturi kvercetin (kao dihidrat) nalazi se u obliku žutog kristalnog praha. Tali se pri 314 °C . Teško je topiv u vodi. Otapa se u apsolutnom etanolu (1 g u 290 ml) i u ledenoj octenoj kiselini (1 g u 23 ml) (*Superman Plant & Chemical Development Co., Ltd., web stranica*). Topiv je i u dimetilsulfoksidu (DMSO).



Slika 1. Strukturna formula kvercetina

Prema: *National Public Health Institute (KTL)*



Slika 2. Osnovne podskupine flavonoida

Prema: *National Public Health Institute (KTL)*

1.1.2. Rasprostranjenost u prirodi i uloga

Flavonoidi su tipični biljni spojevi, koji daju boju mnogim biljkama. Otkrio ih je mađarski biokemičar, nobelovac Albert Szent-Gyorgyi tridesetih godina prošlog stoljeća, i dao im ime "vitamin P". Utvrđio je da su zaslužni za bolju apsorpciju vitamina C i štite ga od oksidacije, čime pojačavaju njegovo djelovanje. Široki spektar različitih bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijske, protuupalne i antikancerogene učinke posredovane različitim mehanizmima, povezani su sa flavonoidnim komponentama.

Iskoristivost, apsorpcija i metabolizam flavonoida u organizmu ovise o njihovoj bioraspoloživosti – otpuštanju u probavnom sustavu, otpornosti na crijevnu floru, apsorpciji u tankom crijevu, metaboliziranju u probavi i dr. Flavonoide nalazimo u urinu i plazmi. Zanimljivo je da se njihovi tragovi, nakon uzimanja hrane bogate flavonoidima, mogu naći u koštanoj srži (*Aherne i O'Brien, 2002.; Yamashita i sur., 2002.; Manach i sur., 2004.; Walle, 2004.*).

Iako nisu pronađeni kod alga, u ostalom dijelu biljnog carstva čine jednu od najvećih i najraširenijih grupa sekundarnih biljnih metabolita (*National Public Institute (KTL), web stranica*). Sadrže ih i cijanobakterije. Izolirani su iz većine biljnih organa (*Hodek i sur., 2002.*). Putem hrane unosi se dnevno 1g flavonoida i to najvećim dijelom putem kave, čaja, vina, piva te voćem i povrćem (*Formica i Regelson, 1995.*).

Kvercetin je najčešći flavonoid u biljkama. Sadrže ga jabuka, grožđe, rajčica, luk, kupusnjače, mahunarke, te brojno ljekovito bilje, među kojima su i *Gingko biloba* i *Hypericum perforatum*. Utvrđeno je da se dnevno konzumira 25–50 mg kvercetina po osobi. Najveće koncentracije pronađene su u luku (284-486 mg/kg). Međutim, kvercetin nije u biljkama raširen kao aglikon, već se pojavljuje u raznim glikozidiranim oblicima (*Formica i Regelson, 1995.*). Pronađeno je više od 70 različitih glikozida kvercetina (*Graf i sur., 1994.*). Najčešći među njima je kvercetin-3-ramnoglukozid, poznatiji kao rutin (*National Public Institute (KTL), web stranica*). To je glavni glikozid kvercetina u rajčici i čaju. U lišću rajčice koncentracija rutina iznosi 2-20 µmol/g svježe mase (*Stamp i Yang, 1996.*). U luku kvercetin se nalazi u obliku kvercetin-4'-glukozida i kvercetin-3,4'-glukozida (*National Public Institute (KTL), web stranica*).

Nekad su se sekundarni metaboliti smatrali samo otpadnim tvarima primarnog metabolizma, koje se nakupljaju u biljnim stanicama zbog nedostatka ekskretornog sustava (*Harborne*, 1999.). Newton i Anderson 1929.g. su postavili "fenolnu hipotezu", po kojoj je rezistencija pšenice na jednu vrstu gljivice povezana s fenolnim spojevima (*Mahadevan*, 1982.). Predložena je ekološka uloga tih spojeva, 1960-ih godina, u obrani biljaka od herbivornih kukaca. Kolika je uloga samih flavonoida u obrani biljaka od kukaca, još treba istražiti. Za većinu herbivornih kukaca flavonoidi su sastavni dio prehrane. Oko 10% vrsta leptira pohranjuje flavonoide u svojim tkivima (*Harborne*, 1999.). Međutim, neke vrste pokazale su se osjetljive na djelovanje flavonoida. Rutin inhibira rast, produžava vrijeme razvoja i povećava smrtnost različitih vrsta kukaca (*Duffey i Isman*, 1981.; *Horwath i Stamp*, 1993.; *Stamp*, 1994.a; *Stamp*, 1994.b; *Stamp i sur.*, 1994.; *Calatayud i Lero*, 1996.; *Gazzoni i sur.*, 1997.). Kvercetin ima također negativne učinke na neke vrste kukaca (*Stamp i sur.*, 1994.; *Gazzoni i sur.*, 1997.). Zanimljiva je mogućnost biljke da, proizvodnjom određenih tvari, može ciljano negativno djelovati na vrstu kukca koja se hrani tom biljkom, a da pri tom ne šteti predotoru tog istog kukca (*Osier i sur.*, 1996.). S druge strane procesom koevolucije neki bi kukci mogli dobiti sposobnost detoksikacije nekih flavonoida čime ih konačno mogu učiniti atraktantima. Takva bi hipoteza mogla objasniti usku specijaliziranost u vidu prehrane nekih kukaca, pogotovo leptira (*Harborne*, 1999.). Međutim, pri utvrđivanju uloge nekog flavonoida u obrani biljke, treba uzeti u obzir međudjelovanja s drugim čimbenicima s kojima se taj spoj može sresti u prirodi, jer se i njegovo djelovanje tada mijenja. Ti čimbenici mogu biti temperatura, drugi spojevi, razvojni stadij kukca (*Stamp*, 1994. a i b; *Yang i Stamp*, 1995.; *Yang i sur.*, 1996.; *Stamp i sur.*, 1997.). Na primjer: da li će djelovanje rutina na vrstu *Spodoptera exigua* biti pozitivno, neutralno ili negativno ovisi o temperaturi i prisustvu ili odsustvu klorogenične kiseline (*Stamp i Yang*, 1996.)

Zanimljiva je uloga nekih flavonoida kao spojeva nužnih za simbiontsko udruživanje biljaka iz porodice mahunarki i bakterija roda *Rhizobium*, pri kojem se formiraju dušik fiksirajuće korijenove krvžice. Pri tome flavonoidi imaju ulogu signalnih molekula pomoću kojih se međusobno prepoznaju domaćin i bakterija, jer je udruživanje strogo specifično. Biljka luči flavonoid u tlo kao kemoatraktant za odgovarajuću *Rhizobium* vrstu. Nakon što flavonoid uđe u bakterijsku stanicu, njegovo djelovanje

dovodi do sinteze molekule koja potiče korjenovu dlačicu na stvaranje korjenovih kvržica (*Baker, 1995.*) Niže koncentracije kvercetina i luteolina induciraju transkripciju gena bakterije vežući se za bakterijski regulacijski protein NodD (*Oberdöster i sur., 2001.*). Flavonoidi također mogu imati poticajni ili inhibirajući učinak na formiranje mikorize (*Baker, 1995.*).

Predložena je i uloga flavonoida u zaštiti biljaka od UV-zračenja. Flavonoidi absorbiraju UV-zrake. Nakon tretiranja biljke *Arabidopsis* UV-zrakama, sadržaj flavonoida u lišću se udvostručio, a uočeno je i povećanje odnosa količine kvercetina i kempferola (*Ryan i sur., 2001.*).

Antocijani (glikozidi antocijanidina) kao cvjetni pigmenti imaju važnu ulogu u razmnožavanju biljaka koje opršuju životinje. Različiti opršivači pokazuju sklonost za različite boje cvjetova. Postoji korelacija između vrste antocijana, boje cvijeta i vrste opršivača (*Harborne, 1999.*).

Antioksidativna aktivnost flavonoida može štititi biljku od oksidativnog stresa (*Hodek i sur., 2002.*)

1.1.3. Biološki učinci i mehanizmi djelovanja

Biološka aktivnost flavonoida prvi put otkrivena je 1936.g., kada su Szent-Györgyi i sur. izliječili pacijenta popucanih kapilara tretmanom s nepročišćenim vitaminom C. Sam vitamin C nije bio djelotvoran. "Nečistoće" su nazivali vitaminom P i kasnije ih identificirali kao dva flavonoida. Do danas je zabilježen širok spektar bioloških učinaka različitih flavonoida. U tom pogledu, kvercetin je najviše proučavan flavonoid (*National Public Institute (KTL), web stranica*). Kvercetin pokazuje antioksidativni, antialergijski, antiviralni, antikancerogeni učinak, interferira sa endokrinim sustavom, ima i germinativni učinak. Iza jednog biološkog učinka najčešće stoji više različitih mehanizama kroz koje se taj učinak manifestira.

Unos flavonoida prehranom smanjuje rizik od obolijevanja od koronarnih bolesti srca. Tzv."francuski paradoks" (nedostatak pozitivne korelacije između visokog unosa zasićenih masti i obolijevanja od koronarnih bolesti srca) barem je djelomično povezan s

konzumiranjem crnog vina koji je bogat kvercetinom i drugim flavonoidima. Oksidativni stres sudjeluje u inicijaciji procesa arterioskleroze koja vodi koronarnim bolestima srca. Flavonoidi djeluju kao antioksidanti "metenjem" slobodnih radikala i/ili keliranjem bivalentnih metalnih iona odgovornih za stvaranje slobodnih radikala. Flavonoidi sprečavaju stvaranje anterioskleroze utječući na oksidaciju LDL (lipoproteini male gustoće) i promovirajući vazodilataciju. Također inhibiraju lipooksigenazu i cikloooksigenazu. U regulaciji sinteze prostaglandina cikloooksigenaza predstavlja kritičnu kontrolnu točku. Narušavanje sinteze prostaglandina može dovesti do srčanih i bubrežnih bolesti koje mogu uzrokovati arteriosklerozu i udar. Selektivna inhibicija sinteze prostaglandina pomoću flavonoida može biti korisna u očuvanju integriteta krvožilnog sustava (*Formica i Regelson, 1995.*).

Slični tome i antialergijski učinak kvercetina povezan je s antioksidativnom aktivnošću, inhibitornom djelovanju na enzime kao što su cikloooksigenaze i lipooksigenaze, te s inhibicijom otpuštanja histamina (*Formica i Regelson, 1995.*).

Antiviralni učinak kvercetina na HIV i druge retroviruse omogućen je inhibicijom HIV 1-proteaze i reverzne transkriptaze (*Hodek i sur., 2002.*). Kvercetin također smanjuje infektivnost i replikaciju brojnih drugih virusa vezanjem za virusne proteine, inhibicijom raznih tipova polimeraza, povećavanjem djelovanja iniferferona (*Formica i Regelson, 1995.*).

Brojni pokusi na životnjama pokazuju antikancerogeni učinak kvercetina (*Formica i Regelson, 1995.; National Public Health Institute (KTL), web stranica*). Međutim, kvercetin može imati i mutageni učinak, što ovisi i o eksperimentalnim uvjetima, npr. o prisustvu kisika i iona (*Formica i Regelson, 1995.*). Prema Ames testu na bakteriji *Salmonella typhimurium*, kvercetin uzrokuje mutaciju pomaknutog okvira čitanja (*Bjeldanes i Chang, 1997.*). Rutin, kvercetin kao i crno vino i neki biljni čajevi koji sadrže ove flavonoide pokazuju slabi genotoksični učinak na vinsku mušicu (*Graf i sur., 1994.*). S druge strane, kvercetin nema utjecaj na segregaciju kromosoma tijekom mejoze vinske mušice (*Schramm i sur., 1998.*). U *in vitro* uvjetima, na raznim tipovima stanica raka, kvercetin pokazuje antiproliferacijsku i citostatičku aktivnost (*Formica i Regelson, 1995.; Hodek i sur., 2002.*).

Brojni su mehanizmi djelovanja kvercetina na stanični ciklus, diferencijaciju i apoptozu (programiranu staničnu smrt). Najčešće su povezani s moduliranjem djelovanja enzima, narušavanjem strukture molekule DNA, te utjecajem na gensku ekspresiju. Kvercetin može izazvati programiranu staničnu smrt, a ovo djelovanje može se povezati s istovremenim nakupljanjem tumor supresor proteina p53. Objasnjenje ovakvog djelovanja može biti izazivanje lomova na molekuli DNA, putem vodikovog peroksida (*Yamashita i Kawanishi, 2000.*) ili putem topoizomeraze (*Hodek i sur., 2002.*), inhibicija određenih tipova protein kinaza (*Formica i Regelson, 1995.*), inhibicija ekspresije HSP (heat shock protein) pri povišenoj temperaturi (*Hosokawa i sur., 1992.*).

Istraživanja utjecaja flavonoida na endokrini sustav uglavnom su usmjereni na (anti)estrogeni potencijal flavonoida (*Oberdörster i sur., 2001.*). Brojni flavonoidi svrstavaju se u skupinu fitoestrogena zahvaljujući strukturnoj sličnosti s estrogenom (*Hodek i sur., 2002.*). I ovdje postoji više načina na koji flavonoidi interferiraju s estrogenim sustavom. Kvercetin pokazuje veliki afinitet za serumski α-fotoprotein (AFP) štakora, protein koji veže estrogen. Interakcija kvercetina s AFP-om može utjecati na dostupnost estrogena stanicama na koje djeluje (*Baker i sur., 1998.*). Drugi mehanizam interferencije flavonoida s hormonskim sustavom interakcija je sa sustavom citokroma P450. Citokromi P450 su monoooksigenaze koje imaju bitnu ulogu u metabolizmu hidrofobnih endogenih supstrata (npr. biosinteza steroida), ali i unesenih ksenobiotika. Na sustav citokroma P450 kvercetin djeluje dvojako: na razini transkripcije ali i posttranskripcijski. Aromataza je član obitelji citokroma P450, a kvercetin može inhibirati djelovanje aktivnosti ovog enzima. Aromataza ima ključnu ulogu u sintezi estrogena. Konačno, fitoestrogeni se mogu vezati za estrogeni receptor i modulirati njegovu aktivnost, bilo kao agonisti ili antagonisti, a to je još jedan od načina (anti)estrogenog djelovanja. Antikancerogeni učinak nekih flavonoida može se povezati s ovakvom antiestrogenom aktivnošću, ako se radi o tkivima izloženim djelovanju hormona (npr. dojka, prostate), (*Hodek i sur., 2002.*). Kvercetin pri nižim koncentracijama može stimulirati proliferaciju nekih stanica raka ovisnu o estrogenim receptorima. Na iste stanice može imati citotoksičan učinak pri višim koncentracijama (*Maggiolini i sur., 2001.*).

Postoji sličnost između sustava steroidnih hormona kralješnjaka i beskralješnjaka. Mehanizam djelovanja hormona sličan je u obje grupe. Receptor ekdisiona (EcR) pripada istoj genskoj porodici kao i tiroidni receptor (TR). Da bi normalno funkcionirao EcR treba partnera s kojim tvori dimer. Taj partner, USP (ultraspiracle), homologan je RXR (Retinoic Acid Receptor) kod kralješnjaka, tako da se sustav EcR/USP može usporediti s TR/RXR sustavom. Iako steroidni estrogeni nisu (ant)agonisti ekdisteroida, neki drugi spojevi s estrogenim djelovanjem ponašaju se kao antagonisti ekdisteroida, npr. lindan, DDT i dr. Osim toga, utvrđena je homologija između ljudskog receptora estrogena (ER α) i bakterijskog regulacijskog proteina NodD, koji ima ulogu u stvaranju korjenovih krvžica. Flavonoidi mogu međudjelovati i s ER i s NodD proteinom. Uz ove činjenice, postavlja se pitanje mogu li flavonoidi međudjelovati i sa sustavom steroidnih hormona kukca. Kukci su se evolucijski razvili prije kralješnjaka i prvi kopneni herbivori bili su člankonošci. Koevolucija kukaca i biljaka traje duže nego koevolucija sisavaca i biljaka. Stoga ne čudi što neki biljni spojevi interferiraju sa steroidnim sustavom kukaca (*Oberdörster i sur., 2001.*). Ekdisteroidi se već razmatraju kao agensi u borbi protiv kukaca. Postoje brojni *in vivo* i *in vitro* testovi za otkrivanje ekdisteroida (*Morgan i Wilson, 1999.*). Isti testovi mogu se koristiti za utvrđivanje djelovanja flavonoida na sustav steroidnih hormona kukca. Tek je nekoliko takvih testova napravljeno. U kulturi stanica hrčka koje imaju modificirani EcR vinske mušice, kvercetin se ponaša kao antagonist ekdisteroida, zbog toga jer inhibira transkripciju gena ovisnih o ekdisonu. Na diferencijaciju stanične linije C1.8+ (izvedene iz maginalnih pločica krila vinske mušice) osjetljive na ekdison, kvercetin djeluje mješano, kao agonist i antagonist (*Oberdörster i sur., 2001.*). Kinetičke studije opisuju kvercetin kao inhibitora aktivnosti citokrom P450 ekdison-20-monoooksigenaze, pri višim, te kao stimulatora, pri nižim koncentracijama (*Mitchell i sur., 1993.*). Kvercetin inhibira i fenolnu oksidazu kukca (PO), enzim važan u razvoju kukca jer sudjeluje u procesima tamnjenja i sklerotizacije kutikule (*Insect phenol oxidase inhibitors from plants, web stranica*).

Puno je više *in vivo* pokusa koji pokazuju uglavnom negativan učinak rutina i kvercetina na rast i razvoj kukaca (*Duffey i Isman, 1981.; Horwath i Stamp, 1993.; Stamp, 1994. a i b; Stamp i sur., 1994.; Yang i Stamp, 1995.; Calatayud i Lero, 1996.; Osier i sur., 1996.; Stamp i Yang, 1996.; Yang i sur., 1996.; Gazzoni i sur., 1997.; Stamp*

*i sur., 1997.). Pretpostavlja se da rutin na inicijaciju presvlačenja vrste *Manduca sexta* (Lepidoptera), interferirajući s oslobađanjem ekdisotropina i/ili događajima ovisnim o ekdisteroidima (Howarth i Stamp, 1993.).*

Flavonoidi mogu imati fagostimulirajući učinak na neke kukce, a mogu djelovati i kao repellenti (Harborne, 1999.). Rutin stimulira leptira *Papilio xuthus* na odlaganje jaja. Jednostavan dodatak ksiloze molekuli rutina pretvara ovaj flavonoid u repellent (Harborne, 1999).

Flavonoidi utječu i na reprodukciju biljaka i životinja. Kvercetin ima inhibitorni učinak na stopu reprodukcije pčele. Vinska mušica hranjena kvercetinom ima veći broj potomaka. U pokusima na miševima uočena je smanjena fertilitet mužjaka pod utjecajem kvercetina (Aravindakshan i sur., 1995.). Istraživan je učinak kvercetina na sam proces mejoze. U pokusima *in vivo* na vinskoj mušici kvercetin ne pokazuje statistički značajan učinak na segregaciju kromosoma. Kao inhibitor kinaza kvercetin utječe na mejuzu oocite školjkaša *Spisula solidissima*. Inhibira fosforilaciju proteina o kojima ovisi pucanje jezgrine membrane tokom mejoze. S druge strane kvercetin je inhibitor raznih ATP-aza, između ostalog i Ca^{2+} - crpke (Barzilai i Rahamimoff, 1983.). Inhibicijom pumpanja iona Ca^{2+} iz citoplazme kvercetin može, pri manjim koncentracijama, inicirati mejuzu kod nekih vrsta (Eckberg, 1983.).

1.1.4. Apsorpcija i metabolizam

Nije jasno kolika je i kakva apsorpcija kvercetina iz probavila. Pretpostavlja se da se kod ljudi tek 0.3-0.5% hranom unesenog kvercetina apsorbira netransformirano (*Formica i Regelson, 1995.*). Za glikozide kvercetina držalo se da se slabo apsorbiraju iz probavila, jer šećerna molekula povećava topljivost u vodi i ograničava pasivnu difuziju kroz biološke membrane. Mikroorganizmi u debelom crijevu vrše hidrolizu na aglikone za koje se zbog hidrofobnog karaktera očekivala dobra apsorpcija (Hollman i Katan, 1998.). Međutim, nakon oralne aplikacije 4 g kvercetina u plazmi i urinu dobrovoljaca nisu pronašli kvercetin ni njegove metabolite. Isključili su mogućnost apsorpcije više od 1% kvercetina. Naprotiv, kvercetin glikozidi apsorbirani su bolje nego sam aglikon

(*Hollman i Katan, 1998.*). Maksimalna koncentracija kvercetina u plazmi javlja se već od 0.5 h nakon ingestije glukozida. To sugerira važnost tankog crijeva pri apsorpciji. Neki se glikozidi apsorbiraju bolje i brže od drugih, što upućuje na potencijalnu ulogu šećerne molekule pri apsorpciji. Kvercetin-glukozid bolje se i brže apsorbira od kvercetin-rutinozida. Pretpostavlja se da se kvercetin-glikozid apsorbira aktivnim prijenosom iz tankog crijeva, dok se kvercetin-rutinozid apsorbira iz debelog crijeva, nakon deglikolizacije putem mikroorganizama (*Hollman i sur., 1999.*). Kotransport s natrijem predložen je kao mehanizam prijenosa kvercetin-glukozida, ali daljna istraživanja nisu to potvrdila. *In vitro* studije otkrivaju laktaza-floridzin hidrolazu, prisutnu na četkastoj prevlaci tankog crijeva kao enzim koji hidrolizira brojne kvercetin-glukozide. Moguće je da se, uz pomoć ovog enzima, hidrolizom oslobođeni aglikon dovodi blizu membrane enterocite čime se poboljšava pasivna difuzija. U citosolu stanica tankog crijeva prisutna je glukozidaza koja može hidrolizirati razne kvercetin glukozide. Rutin se ne može hidrolizirati ovim enzimom.

Bez obzira odvija li se unutar enterocite ili u lumenu probavila, hidroliza je najvjerojatnije prvi korak u metabolizmu flavonoid glikozida. U debelom crijevu hidroliza se odvija uz pomoć mikroorganizama. Za sada nisu pouzdano utvrđeni kvercetin glukozidi u plazmi, već su uglavnom identificirani različiti mataboliti kvercetina. U daljnoj razgradnji kvercetina veliku ulogu imaju jetra i mikroorganizmi u debelom crijevu. Mikroorganizmi mogu razgraditi kvercetin do fenolnih kiselina, kidajući prsten C. Degradacija kvercetina u jezgri uključuje metilaciju i konjugaciju (sa sulfatima i/ili glukuronidom). Osim jetre, u metabolizmu mogu sudjelovati i drugi organi kao tanko crijevo i bubreg, jer posjeduju citokromne monooksigenaze, metil transferaze i konjugirajuće enzime. U štakora, metilacija se uglavnom odvija u jetri, a konjugacija se barem dijelom odvija u stijenki crijeva. Manji dio kvercetina izlučuje se putem bubrega (*National Public Health Institute (KTL), web stranica*). Konjugacija je bitna za ekskreciju kroz žuč. Pri tom je reapsorpcija konjugiranih metabolita u tankom crijevu malo vjerojatna zbog negativnog naboja molekule. Ali u debelom crijevu mikroorganizmi mogu osloboditi aglikon i omogućiti reapsorpciju.

Pri otkrivanju biološke aktivnosti kvercetina u *in vivo* uvjetima, potrebno je utvrditi vezu između koncentracije kvercetina koja preživi metabolizam i djelotvornih koncentracija u *in vitro* pokusima (*Formica i Regelson, 1995.*). Isto tako, važno je znati način na koji se spojevi kvercetina apsorbiraju i u kojem obliku cirkuliraju tijelom, jer kvercetin i njegovi metaboliti mogu imati potpuno drugačije djelovanje (*National Public Health Institute (KTL), web stranica*).

Razni spojevi, pa i oni esencijalni mogu izazvati oksidativni stres te tako sudjelovati u oštećenju stanice. Oksidativni stres definiran je kao stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, što rezultira promjenama vezanim uz oštećenje staničnih struktura i same stanice. Slobodni radikali su vrlo nestabilne kemijske čestice koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci, te zbog toga imaju visok stupanj reaktivnosti. Biokemijski su najznačajniji radikali kisika i dušika.

Na razini stanice štetno djelovanje slobodnih radikala nastaje njihovim ulaskom u oksidacijske ili reduksijske reakcije sa staničnim makromolekulama kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi. Pod štetnim djelovanjem slobodnih radikala uglavnom se misli na oštećenje DNA koje mogu uzrokovati mutacije, oštećenje proteina i lipida što u konačnici dovodi do smrti stanica i samoga organizma (*Žarković, 2000.*).

Histokemijskim analizama proteina moguće je u laboratoriju potvrditi prooksidativni učinak ksenobiotika u stanici.

1.2. BIOLOGIJA SLATKOVODNIH PLANARIJA

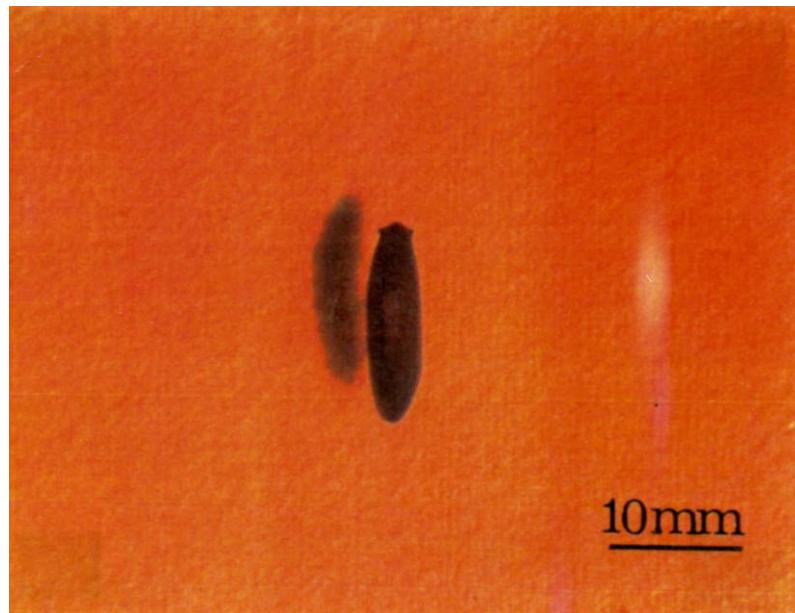
1.2.1. *Sistematika i ekologija planarija*

Slatkovodne planarije ili puzavice spadaju u skupinu Avertebrata (beskralješnjaci). *Polycelis felina* (Daly.) ili mnogooka puzavica spada u razred Turbellaria (virnjaci), rod Tricladida (trocjevci). To je red bilateralno simetričnih i

dorzoventralno spljoštenih životinja bez crijeva i celoma, beskolutićavog tijela, koje žive najčešće slobodno. Neznatan broj vrsta su komenzali ili paraziti.

Vrsta *Polycelis felina* (Daly.) je slobodnoživuća, a najčešće je nalazimo u izvorima, čistim potocima i jezerima Europe (Lock i Reynoldson, 1976.). Naseljava vode bogate kisikom, temperature od 6° C do 15° C, a dobro podnose i brzo strujanje vode (slika 3.) (Roca i sur., 1992.).

Planarije se najčešće zadržavaju ispod kamenja u skupinama od 6 do 20 jedinki. Izbjegavaju dnevno svjetlo, pa danju miruju, a noću aktivno pužu u potrazi za hranom. Hrane se sitnim kolutićavcima, ličinkama kukaca i mekušaca.



Slika 3. Vrsta *Polycelis felina* (Daly.) – mnogooka puzavica

1.2.2. Morfologija i fiziologija planarija

Jedinke vrste *Poly celis felina* (Daly.), (slika 3.) duge su oko 15 mm. Tijelo im je tamnosmeđe ili crne boje, koja potječe od melanina. Melanin proizvode pigmentne stanice ili melanofore, štiteći time životinju od štetnog ultraljubičastog zračenja. Ventralna strana tijela je ravna, a dorzalna lagano zasvođena. Prednji dio tijela, "glava", blagim je suženjem odvojen od stražnjeg, "repnog" dijela (slika 3.). Na "glavi" su brojne oči, koje su građene od pigmentnih i osjetnih stanica. Oči su osjetljive na svjetlost, ali ne stvaraju sliku. Neke vrste roda *Poly celis* imaju više od 180 očiju (Aikawa i Shimozawa 1991.; Kuchiiwa 1991.). Osim očiju s obje strane "glave" su aurikule, posebni osjetni organi s kemoreceptorima i reoreceptorima.

Na ventralnoj strani planarije mogu se golinom okom vidjeti usni i spolni otvor. Planarije nemaju analnog otvora, pa neprobavljenu hranu izbacuju kroz ždrijelo i usni otvor. Pri hranjenju plijen obaviju tijelom istovremeno ispružajući ždrijelo koje guraju u plijen i njime isisaju tkivo, organe i tjelesne sokove. Planarije su mesojedi.

Tijelo planarija prekriveno je jednoslojnim epidermom (slike 3. i 4.). Epiderm grade prave epidermalne stanice s brojnim trepetljikama na ventralnoj i lateralnoj strani, te žljezdane stanice, koje stvaraju rabdite (Morita i Best, 1974.). Rabditi su štapićaste tvorbe, a nakon izbacivanja iz tijela oni se razgrađuju u sluz, čija je glavna funkcija zaštita životinje od predatora (Wrona, 1986.). Epidermalne stanice smještene su na bazalnoj membrani, koju podupiru mišići građeni iz kružnih, longitudinalnih, dijagonalnih i dorzoventralnih vlakana (Morita i Best, 1974.). Prostori između mišića i unutarnjih organa ispunjava parenhim ili mezenhim (slika 4.). On je građen iz velikih retikularnih stanica i manjih vretenastih ili okruglih neoblasti. Retikularne stanice su fagocitne stanice i imaju sposobnost migracije. One fagocitiraju stare i oštećene stanice, a u citoplazmi sadrže brojna zrnca glikogena (Morita i Best, 1974.). Neoblasti su nediferencirane stanice i imaju važnu ulogu u regeneraciji planarije (Betchaku, 1967.; Lange, 1968.; Morita i Best, 1984.).

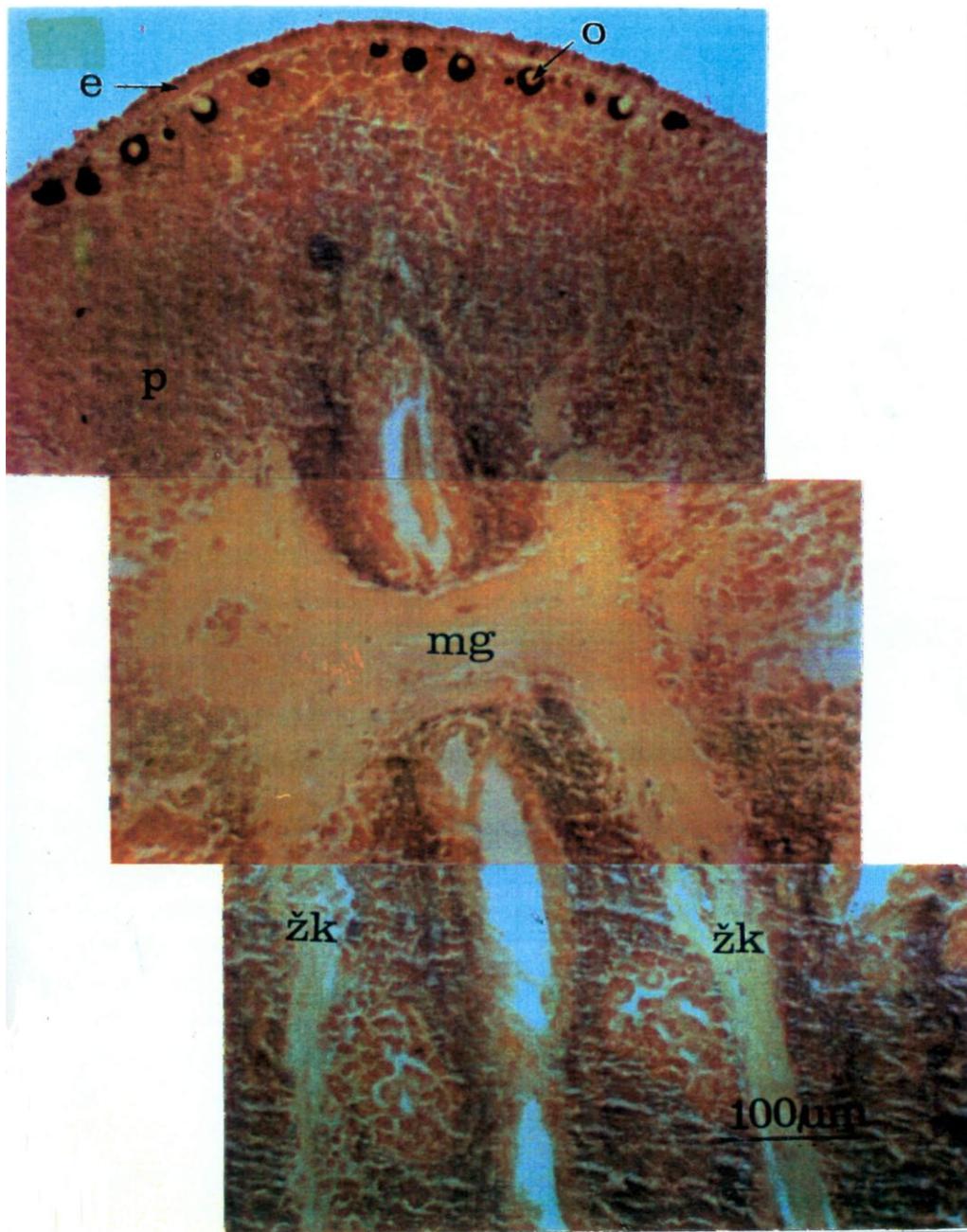
Planarije nemaju tjelesne šupljine. Od unutrašnjih organa najveće je probavilo koje započinje usnim otvorom, na koji se nastavlja mišićno ždrijelo i crijevo s tri glavne grane (jednom anteriornom i dvije posteriorne), te brojnim manjim bočnim ograncima.

Stijenka crijeva sadrži žljezdane i gastrodermalne stanice (*Bowen i sur., 1974.*). Acidofilne žljezdane stanice vrste *Polycelis felina* (Daly.) proizvode katepsin, endopeptidazu koja pomaže razgradnju plijena (*Bowen i Ryder, 1975.*). Planarije imaju i izvan- i unutar- staničnu probavu. Karnivori su, ali mogu dugo gladovati i tada žive na račun vlastitih tkiva, koja probavljaju prema padajućem redu važnosti za život jedinke (*Gardiner, 1972.*).

Dišnog i optjecajnog sustava nemaju, kao niti skeletnih elemenata. Izmjena plinova odvija se preko površine tijela i tekućine koja oplakuje parenhim i druga tkiva. Ekskretorni sustav je protonefridijskog tipa (*Ryder i Bowen, 1974.*). Na pojedinim mjestima u tijelu smještene su vršne stanice, koje sakupljaju suvišnu vodu i otpadne tvari, a na njih se nastavljaju ekskretorni kanalići. Dva glavna longitudinalna ekskretorna kanala povezana su preko mreže kanalića razgranjene po tijelu. Otpadne tvari izlaze iz tijela kroz nekoliko nefridiopora.

Planarije su najprimitivnije životinje s centralizacijom i cefalizacijom živčanog sustava (*Villar i Schaeffer, 1993.*). Središnji živčani sustav predstavlja moždani ganglij (slika 4.), koji je smješten u prednjem dijelu tijela. Spužvaste je građe i sadrži brojne šupljine ispunjene tijelima stanica, mišićnim vlaknima i nastavcima parenhimskih stanica. Od moždanog ganglija odlaze živci prema očima i aurikulama, te dva longitudinalna živčana konopa prema stražnjem dijelu tijela (slika 4.).

Oni su povezani brojnim poprečnim konektivama, a iz njih se odvajaju periferni živci. Planarije imaju i periferni živčani sustav, građen iz subepidermalne, submuskularne i gastrodermalne živčane mreže. Parenhim i ždrijelo su također dobro inervirani (*Baguñà i Ballester, 1978.*). Živčane stanice planarija slične su živčanim stanicama filogenetički mnogo odvedenijih organizama. Mogu biti unipolarne, bipolarne i multipolarne. Planarije posjeduju niz neurotransmitera, primjerice: acetil kolin, noradrenalin, dopamin, serotonin (*Morita i sur., 1987.*), kao i receptore za mnoge neurotransmitere sisavaca (*Villar i Schaeffer, 1993.*). Poznato je i da planarije mogu sintetizirati hormon melatonin (*Morita i Best, 1993.*).



Slika 4. Uzdužni presjek tijela vrste *Polycelis felina* (Daly.)

(e) - epiderma; (o) - oči; (p) - parenhim; (mg) - moždani ganglij; (žk) - živčani konopi
Obojano kernechtrot i pikroindigokarminom.

Vrsta *Polycelis felina* (Daly.) može se razmnožavati spolno i nespolno (*Benazzi, 1973.; Roca i sur., 1987.*). Poznato je da ekološki čimbenici staništa u kojem ova vrsta živi mogu utjecati na tip razmnožavanja. U povoljnim prilikama i kad na raspolaganju ima dovoljno hrane, planarije se razmnožavaju spolno, a u nepovoljnim prilikama i pri nedostatku hrane nespolno (*Roca i sur., 1992.*). Spolno zrela jedinka ima i muški i ženski spolni sustav. Nekoliko stotina malih okruglih testisa smješteno je duž obje strane tijela, a dva jajnika blizu prednjeg dijela tijela. Oplodnja je unakrsna. Nespolno razmnožavanje odvija se putem arhitomije-poprečne diobe životinja na dvije polovice, koje potom regeneracijom nadomjeste dijelove koji im nedostaju (*Brøndsted, 1969.; Benazzi, 1973.; Grasso i Benazzi, 1973.; Benazzi i Benazzi Lentati, 1983.; Pala i sur., 1987.*).

1.2.3. Regeneracija planarija

Općenito razlikujemo dva osnovna tipa regeneracije, fiziološku i reparativnu ili traumatsku regeneraciju. Fiziološka regeneracija je proces obnavljanja istrošenih stanica, tkiva i organa tijekom života organizma, a reparativna regeneracija je obnavljanje nasilno odstranjenih i uništenih stanica, tkiva i organa. Fiziološka regeneracija je svojstvena gotovo svim živim bićima, dok je reparativna karakteristika manjeg broja živih bića.

U životinjskom svijetu postoje velike razlike u regeneracijskom kapacitetu. Dok neke vrste mogu opetovano regenerirati čitave izgubljene organe, druge mogu nadomještati samo male izgubljene dijelove tkiva (*Nentwig i Schuble, 1974.*).

Slatkovodne planarije imaju izvrsnu sposobnost reparativne regeneracije, koju je prvi uočio i opisao Pallas još 1774. godine (*Lange, 1966.*). Iz komadića tkiva izrezanog u bilo kojoj regiji tijela planarije može se regenerirati čitava životinja. Ako planariju poprečnim rezovima prerežemo na nekoliko komadića, svaki od njih će, u skladu s prvotnom anterio-posteriornom polarnosti tijela, na prednjoj reznoj plohi regenerirati "glavu", a na stražnjoj "rep" (*Kurabuchi i Kishida, 1990.*). Još od klasičnih pokusa regeneracije, što ih je izveo Child početkom 20. stoljeća, poznato je da svi dijelovi tijela nemaju jednaki regenerativni uspjeh. Ako se životinja prereže odmah ispod glave ili

daleko u stražnjem dijelu tijela, regeneracijom se obično dobiju dvije normalne jedinke (*Mead i Krump, 1986.*). Međutim, ako se prereže u području oko i ispod ždrijela prerezani dijelovi obično se regeneriraju nepravilno, bez aurikula i glave, ili s nenormalnim očima (*Mead, 1991.*). Uspjeh regeneracije planarija ovisi i o veličini komadića koji se regenerira. Uspješna regeneracija dobivena je čak iz komadića volumena 0.08-0.16 mm³. Pravilnost regeneracije ovisi i o sudjelovanju živčanog sustava (*Villar i Schaeffer, 1993.*). Komadići životinje koji ne sadrže bar dio živčanog konopa regeneriraju se nepravilno.

Dva različita oblika regeneracije planarija su homomorfoza i heteromorfoza. Homomorfoza je takav oblik regeneracije gdje dolazi do potpunog obnavljanja jedinke sa svim karakteristikama svoje vrste i gdje je sačuvana normalna shema međusobnih odnosa tkiva i organa, tj. morfogenetski procesi se odvijaju u okvirima stare organizacije. Heteromorfoza predstavlja različite oblike atipične regeneracije, poznate kao Janus-glave i Janus-repovi, koje su česte u planarija prerezanih uzdužno. Regeneracijom ovako prerezanih jedinki obično nastaju oblici s umnoženim glavama ili stražnjim dijelovima tijela, a prvotna polarnost životinje je narušena (*Brøndsted, 1969.*).

Postoje četiri morfološka stadija tijekom regeneracije planarija: zatvaranje rane (0-6 sati nakon rezanja), stvaranje blastema (7-43 sata nakon rezanja), rast i rana diferencijacija (44-80 sati nakon rezanja) i konačna diferencijacija (81-169 sati nakon rezanja).

Za stvaranje regeneracijskog blastema u planarija odgovorni su neoblasti iz parenhima. U starijoj literaturi ove stanice se spominju pod nazivima: "Stamzellen", "formative cells" i "Regenerationszellen", a danas važeći naziv "neoblasti", prvi je predložio Buchanan, 1933. (*Betchaku, 1970.*).

Na neoblaste otpada 25-30 % ukupnog broja stanica koje grade tijelo planarije. Ove stanice su izrazito bazofilne (*Betchaku 1970.; Baguñà, 1981.*), a po obliku se jasno razlikuju od svih ostalih stanica. Obično su okrugli, ovalni ili vretenastog oblika (*Baguñà i Romero, 1981.*). Promjeri su im 8-15 µm. Pretežiti dio volumena neoblasta otpada na veliku jezgru, koja sadrži dobro razvijenu jezgricu (*Sauzin, 1967.; Sakai-Wada i Mukaidani, 1985.*). Uočeno je da se broj jezgrica u neoblastima tijekom regeneracije planarija može povećati (*Morita i Best, 1984.*). Citoplazma neoblasta je oskudna, sadrži

brojne slobodne ribosome, slabo razvijeni hrapavi endoplazmatski retikulum i mitohondrije. Oko jezgre su smještena brojna kromatoidna tjelešca, organeli bogati s RNA, koji su karakteristični baš za neoblaste. Neoblasti su jedini tip stanica u planarija koji se može mitotski dijeliti (*Lange, 1968.; Baguñà, 1974.; Baguñà, 1981.; Morita i Best, 1984.; Villar i Schaeffer, 1993.*). Ponašaju se poput embrionalnih stanica (*Lange, 1967.; Sauzin, 1967.; Hansen i sur., 1993.*), totipotentni su (*Betchaku, 1967.; 1970.; Coward i sur., 1970.; Lange, 1966.; 1968.*) i mogu se diferencirati u bilo koji od 12-14 specijaliziranih tipova stanica (*Baguñà, 1981.*).

1.2.4. Značajke procesa rasta i diobe stanica u planarija

U planarija se mitotski dijeli samo nediferencirani neoblasti, dok se diferencirane stanice ne dijeli (*Lange, 1966.; 1967.; 1968.; Best i Rosenvold, 1968.; Morita i Best, 1984.; Best i Morita, 1991.; Schaffer, 1993.*). Slična pojava rijetko se susreće u životinjskom svijetu, primjerice u nekih Spongia i primitivnijih Coelentrata (*Baguñà, 1975.*).

Gustoća neoblasta funkcija je duljine tijela životinje (*Lange, 1967.; Baguñà, 1975.*). Rastom planarije u duljinu broj neoblasti se smanjuje, a ukupni mitotski indeks pada. Zbog toga su rast i regeneracija u većih i duljih jedinki sporiji nego u manjih i kraćih. Proliferirajući neoblasti raspoređeni su po cijelom parenhimu, tako da u planarije nema posebne zone rasta.

Mitotski indeks najveći je u perifernim dijelovima životinje, koji su izgrađeni pretežito od parenhima i bogatiji neoblastima. Za razliku od njih, središnji dijelovi sadrže uglavnom ogranku crijeva, te imaju manju gustoću neoblasta i niži mitotski indeks. Mitoza se nikad ne događa u ždrijelu, koje je čitavo građeno iz diferenciranih stanica (*Baguñà, 1975.*).

Intaktna planarija ima osnovnu razinu mitoze, koja je nužna za fiziološku regeneraciju. Ta se osnovna razina mitoze pod utjecajem raznih čimbenika mijenja. Primjerice, hranjenje životinje potiče snažni mitotski odgovor. Već sat vremena nakon

hranjenja dolazi do naglog porasta mitotskog indeksa, a on se na tako visokoj razini održava još narednih 4-5 dana (*Baguñà, 1974.*). Ovo je jedinstvena pojava u životinjskom svijetu i vrlo korisni adaptivni mehanizam, a uzrokovani je stalnim postojanjem određenog broja neoblasta koji su u G2 fazi staničnog ciklusa i nakon poticaja odmah ulaze u mitozu. Za poticaj mitoze nakon hranjenja planarije odgovoran je živčani sustav. Naime, rastezanjem probavila nakon hranjenja podraženi su živčani završeci, a kao odgovor na podražaj, oni luče neurosekrete koji potiču mitozu (*Baguñà, 1974.; 1975.*).

Tijekom gladovanja planarija smanjuje se duljina tijela i ukupni broj stanica, ali ne i mitotski indeks. Naime, da bi preživjela, životinja mora obnavljati svoja tkiva, a to čini povećanjem broja neoblasta koji se diferenciraju u potrebne tipove stanica (*Baguñà, 1975.; Baguñà i Romero, 1981.*).

Mitizu u planarija potiču i razni drugi čimbenici, kao što su neurotransmiteri (serotonin, noradrenalin, dopamin), porast koncentracije kalcija, cGMP, poliamini i dr., a koče je antagonisti neurotransmitera, acetil-kolin i dr. (*Moraczewski, 1981.; Moraczewski i sur., 1986.; Salò i Baguñà, 1986.*).

U planarija koje se regeneriraju mitoza neoblasta intenzivna je u području ozljede, dok se njezina razina u udaljenijim regijama tijela ne mijenja. Učestalost dioba najveća je u dijelu gdje se regeneracijski blastem spaja sa starim tkivom (*Baguñà i Romero, 1981.*). Krivulja mitotske aktivnosti neoblasta u regenerirajućih planarija ima dva maksimuma. Prvi se dostiže tijekom prvih 24 sata regeneracije, potom slijedi relativni minimum i drugi maksimum između drugog i četvrtog dana regeneracije (*Baguñà, 1975.b*). Proliferacjom neoblasta tijekom regeneracije upravlja živčani sustav (*Salò i Baguñà, 1986.*). On luči neurotransmitere što potiču neoblaste na diobu, tako dugo dok se ne regenerira izgubljeni dio tijela i ponovno ne uspostavi prvotna ravnoteža između neoblasta, specijaliziranih stanica i živčanog tkiva, koja postoji u intaktnoj jedinici. Nakon što se ravnoteža uspostavi, vrijednost mitotskog indeksa vraća se na osnovnu razinu (*Baguñà, 1975.b*).

1.3. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Kao test-organizam izabrana je vrsta *Polycelis felina* (Daly.). Naime, spomenuta vrsta je široko rasprostranjena u slatkim vodama Europe, gdje predstavlja prirodni indikator nezagadenosti. Istovremeno, dostupna je u velikom broju, prisutna tijekom cijele godine na spomenutim staništima, te se lako i jeftino održava u laboratorijskim uvjetima, a promjene na jedinkama se lako opažaju i prate.

Dosada su istraživani utjecaji teških metala, pesticida, herbicida na vrstu *Polycelis felina* (Daly.). Moje istraživanje obuhvaća proučavanje utjecaja kvercetina na žive organizme, točnije, na spomenutu vrstu *Polycelis felina* (Daly.). Proučavao se mogući utjecaj kvercetina na prooksidativne procese, zatim učinak na morfološke, lokomotorne promjene, te promjene u ponašanju. Osim tih promjena, istraživanje je uključivalo i mogući utjecaj na patohistološke promjene. Dosada je u ovom laboratoriju, primjerice, utvrđen utjecaj kvercetina na gonade u vrste *Drosophila melanogaster* Meigen.

Kvercetin je vrlo jaka antioksidativna tvar. Njegovo djelovanje pokazuje izuzetno pozitivan učinak na ljudski organizam. Bogato je zastupljen u brojnim biljnim vrstama (luk, kupusnjače, jabuke, bobičasto voće, razne sjemenke, crni čaj, crno vino, propolis pčela). Istraživanja pokazuju njegovo protuupalno, antialergijsko, antivirusno i značajno antikancerogeno djelovanje. Djelotvoran je kod raznih oboljenja – leukemije, karcinoma dojke, jajnika, jetre; a pozitivan utjecaj kvercetina u određenim dozama ostvaruje se blokiranjem rasta malignih stanica i sinteze DNA.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. Sakupljanje i održavanje životinja

U istraživanju je korištena planarija vrste *Polycelis felina* (Daly.), (mnogooka puzavica), koja je sakupljena u Gračanskom ribnjaku. Preko dana, puzavice su sakrivene ispod kamenja i većih komada grana u vodi, pa se jednostavnim ispiranjem sa tih površina u staklenu posudu brzo može sakupiti dostatan broj životinja. Nakon što su životinje prenesene u laboratorij, stavljene su u aeriranu vodu, te nisu hranjene.

2.1.2. Izbor planarija pogodnih za pokus

Za pokuse su izabrane planarije podjednake veličine i razvojnog stadija u skupinama po 10 jedinki za svaku dozu koncentracije kvercetina, te za kontrolu. Planarije normalnog morfološkog izgleda bile su duljine 12-15 mm.

2.2. METODE

2.2.1. Priprema test-otopine

U početku sam postavila 9 različitih koncentracija kvercetina uz kontrolu (0,2 g/10 ml vode; 0,1 g; 0,08 g; 0,06 g; 0,04 g; 0,01 g; 0,006 g; 0,002 g.). Otopila sam kvercetin u alkoholu (1g / 270 ml) . U spomenutim koncentracijama kvercetina, planarije su inkulirane na +4°C tijekom 24h. Na temelju promatranja (praćenja smrtnosti jedinki), odredila sam s kojim koncentracijama će raditi istraživanje; to su bile: 0,2g / L; 0,3 g / L, te 0,6 g / L.

2.2.2. Izvedba pokusa

U svakoj skupini tretiranih planarija, te kontroli je bilo po 10 planarija. Prva skupina je služila kao kontrola, odnosno, planarije su držane samo u čistoj akvarijskoj vodi. Druga skupina je tretirana otopinom kvercetina koncentracije 0,2 g/L, treća skupina sa 0,3 g/L, te četvrta skupina sa 0,6 g/L.

Nakon 24h tretmana životinja test-otopinama, sve su jedinke prebačene u čistu akvarijsku vodu, te promatrane mikroskopom. Tijekom slijedećih 15 dana koliko je pokus trajao (uz jedno ponavljanje pokusa), životnjama se svakodnevno mijenjala voda, a držane su u hladnjaku na temperaturi od 7° C. Kroz spomenuti period, pratili su se sljedeći parametri; smrtnost, ponašanje, morfološke i lokomotorne promjene kod jedinki.

2.2.3. Izrada histoloških preparata

Za izradu histoloških preparata, postavljene su ponovno spomenute koncentracije otopine kvercetina, te izabrane su po 3 životinje s vidljivim oštećenjima, iz pojedine koncentracije otopine kvercetina, te kontrole. Uslijedilo je fiksiranje u Bouinovom fiksativu: zasićena otopina pikrinske kiseline, 40%-tnog formaldehida i ledene octene kiseline u omjeru 15:5:1, s time da se najprije koristi pikrinska kiselina i formaldehid, koji se stave u hladnjak najmanje na jedan sat, da se ohlade. Neposredno prije upotrebe, doda se octena kiselina.

Fiksacije su vršene tri dana za redom, te nakon sedmog dana (nakon 24h, 48h, 72h te 168h). Uzorci su pokriveni parafilmom, te držani u digestoru u spomenutim vremenskim periodima. Nakon fiksacije, slijedi ispiranje 70%-tним alkoholom, te stavljanje uzoraka u boćice s alkoholom koje su stavljenе u digestor na neodređeno vrijeme. U međuvremenu se par puta alkohol mijenjao, radi što boljeg ispiranja.

Sljedeći korak je dehidracija tkiva koja redom uključuje prebacivanje uzoraka u rastuće koncentrirane otopine etanola: 80% i 90% na 30 min, te 100%-tni dva puta po 30

min. Iz 100%-tnog etanola, uzorci se prebacuju u kloroform na 30 min, te se ostave u svježem kloroformu preko noći. Naredni se dan uzorci tretiraju kloroform-paraplastom, u omjeru 1:1, na 30 min. na 60° C. Nadalje, uzorci prolaze 3 puta po 30 min. kroz paraplast, da bi se na kraju uklopili u lađice sa čistim paraplastom.

Ohlađeni blokovi paraplasta režu se na mikrotomu na prereze debljine 7 µm. Nož treba imati nagib od 15°, s time da se pomiče nakon dužeg rezanja ulijevo ili udesno, da se ne zatupi na određenom mjestu.

Rezovi se stavljuju u vodenu kupelj (45°) s malim kistovima, te izaberu dobri rezovi. Stavljaju na predmetno stakalce, te se suše u termostatu, ili na sobnoj temperaturi 24h, kao što je bio moj slučaj. Kada se stakalca (prethodno namazana glicerin-bjelančevinom za bolje prihvaćanje uzorka), osuše, slijedi deparafiniranje.

Deparafiniranje započinje stavljanjem predmetnih stakalaca s tkivom u ksilol u dva navrata po 15-tak minuta da se dobro otopi paraplast. Uzorci se zatim prebacuju u padajuće koncentrirane otopine etanola 100%, 96%, 80%, 75%) u trajanju od po 5 minuta. Na kraju slijedi ispiranje u destiliranoj vodi koje traje 10 minuta.

Bojanje je izvršeno s dvije boje: Meyerovom otopinom, te Toluidinskim modrilom. Kod bojanja Meyerovom otopinom, bojanje je vršeno 10 minuta, zatim isprano u tekućoj vodi, te ostavljeno u njoj barem na 20 minuta. Nakon toga slijedi tretman eozinom na 2 minute (a i kraće ako je svjež), pa ispiranje u destiliranoj vodi. Uslijedilo je dehidriranje preparata pomoću rastućih koncentriranih otopina etanola (70%, 80%, 96%, 100%) po 5 minuta, te ponovno tretiranje ksilolom u dva navrata po 10 minuta. Završna faza uključuje sušenje stakalaca, stavljanje male količine kanadabalgama na njih, te pažljivo stavljanje pokrovnice, pazеći da ne uđe zrak unutar stijenki stakalca.

3. REZULTATI

3.1. MORFOLOŠKE I LOKOMOTORNE PROMJENE

VRSTE *Polycelis felina* (Daly.) TRETIRANE

KVERCETINOM

3.1.1. Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.)

tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,2 g/L

Prvog dana nakon tretmana smrtnost nije bila prisutna. Nakon 15 minuta promatranja u aeriranoj vodi, jedinke se počinju nakupljati. 50% jedinki je bilo sumnjivih lokomotornih sposobnosti, a 50% ih se normalno kretalo. Nakon otprilike pola sata, u sredini posudice, jedinke su se nakupile na dnu uz pojavu kontrakcije. 10% jedinki je imalo zone depigmentacije i male ranice na površini tijela. 30% jedinki je bilo oštećeno s vidljivim "udubljenim" dijelovima na dva mesta u posteriornom kraju tijela, te bočno. 20% ih je bilo sa izbočenim ždrijelom, vidljivo oštećeni.

Drugi dan također nije zabilježena smrtnost. 50% jedinki je imalo normalna lokomotorna svojstva, a isto toliki udio ih se nakupljaо uz samu stijenu posudice na kraće vrijeme. 10% ih je imalo zonu depigmentacije ispod ždrijela. 30% je bilo depigmentirano cijelim tijelom, a 20% samo na posteriornom kraju.

Treći dan ponovno nije bilo smrtnosti. 30% jedinki je imalo depigmentirani posteriorni dio tijela koji je istovremeno bio šiljastog oblika, umjesto zaobljenog. 50% jedinki je imalo normalne lokomotorne sposobnosti. Od preostale polovice, njih 20% je nepravilno uvijalo tijelo. 40% jedinki je bilo depigmentirano nasumce po cijelom tijelu.

Sljedećih dana nisu zabilježene posebne morfološke ni lokomotorne promjene.

15 dana nakon tretmana test-otopinom, preživjelo je svih 10 jedinki. 20% jedinki je imalo još uvijek bijelu mrlju na posteriornom kraju, a 10% udubljenje.

3.1.2. Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,3 g/L

U ovoj skupini životinja **prvog dana** ponovno nije utvrđena smrtnost. 50% jedinki je imalo normalno lokomotorno ponašanje. Na jednoj planariji je primijećeno oštećenje jedne aurikule, a po sredini druge aurikule je bijela pruga. 100% jedinki je bilo aktivno (par njih na stijenci posude, a nekoliko na dnu.).

Drugi dan nakon tretmana, jedna jedinka je izbacila ždrijelo (vidljivo kao bijeli trag s ventralne strane). 20% ih je bilo posteriorno depigmentirano i oštećenih repova, tj. vrlo nepravilnih. 70% ih se grupiralo bočno na staklu posudice.

Treći dan jedinka s izbačenim žrdijelom je također bila prisutna, isto tako kao i jedinka s oštećenom aurikulom, koja se niti malo nije isticala, za razliku od druge koja je bila normalna. 30% jedinki je imalo depigmentirani posteriorni kraj. Kod 20% jedinki je bila vidljiva zona regeneracije, a posteriorni kraj zbog regeneracije je bio nepravilnog oblika. 20% jedinki se dezorientirano kretalo po dnu posudice. Jedna jedinka je smežurana, izgleda kao da je uginula, nije se gibala, ali ipak je bila živa.

15 dana nakon tretmana kod jedne jedinke je primijećen deformiran posteriorni kraj. Životinja se nije mogla niti okrenuti, kamoli postati aktivna. Jedinka s neistaknutom aurikulom je i dalje bila primijećena s istim oštećenjem, dok je 20% jedinki imalo udubljenja bočno na tijelu.

3.1.3. Morfološke i lokomotorne promjene vrste Polycelis felina (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,6 g/L

Prvoga dana 20% jedinki je izgledalo maksimalno kontrahirano. No, smrtnost ipak nije utvrđena. 100% jedinki je mirovalo, od čega 80% potpuno, a ostatak se polagano kretao i izvijao dijelove tijela odnosno kontrahirao. Primijećeni su poremećaji u pigmentaciji tijela u 30% jedinki.

Drugog dana 90% jedinki je bilo aktivno, osim jedne oštećene jedinke. Aktivne jedinke su bile dezorientirane u odnosu na kontrolu. Nakon malo dužeg vremena promatranja, 50% jedinki je mirovalo, a 50% je bilo aktivno. Pred sam kraj dnevnog promatranja, sve jedinke miruju, te se skraćuju, odnosno kontrahiraju. U jedne jedinke je primijećen potpuno svjetao posteriorni dio tijela. Djelomična depigmentacija je prisutna u 30% jedinki.

Treći dan 50% planarija je imalo nepravilan posteriorni kraj nakon regeneracije, od čega 40% je imalo špičasti kraj tijela. Kod jedne jedinke je primijećena potpuna dezorientiranost, jaka kontrakcija, savijanje u obliku puževe kućice. Nakon dva sata promatranja, jedinke postaju pasivne potpuno, te se grupiraju.

15 dana nakon tetiranja nisu više primijećene jedinke s izbačenim ždrijelom. 30% jedinki je imalo preko polovice tijela poremećaj u pigmentaciji. 20% jedinki miruje u potpunosti, naboranih tijela. 30% ih ima rupice na rubovima tijela.

3.2. HISTOPATOLOŠKE I CITOLOŠKE PROMJENE

VRSTE *Polycelis felina* (Daly.) TRETIRANE KVERCETINOM

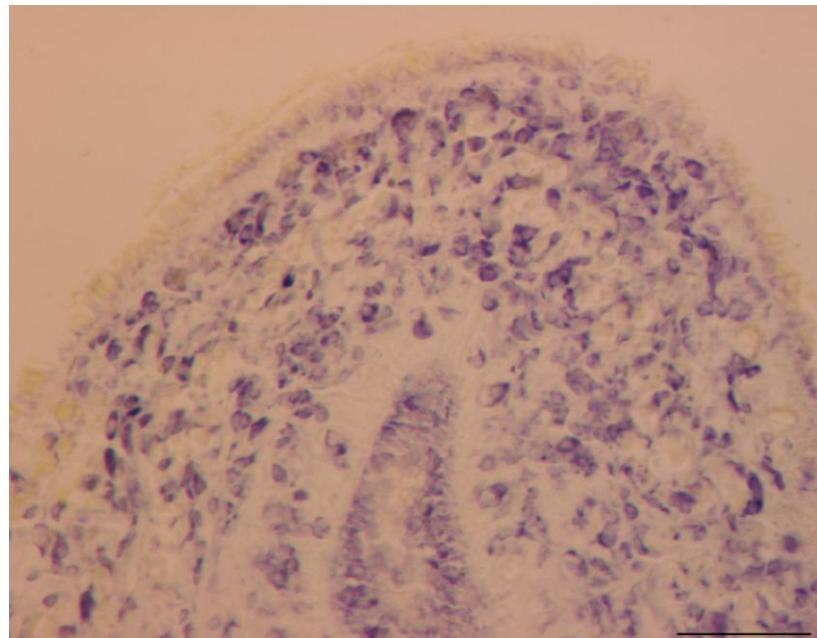
3.2.1. Histopatološke i citološke promjene vrste *Polycelis felina* (Daly.)

tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,2 g/L

Sve tretirane planarije upotrijebljenim test-otopinama pokazivale su slične histopatološke promjene. Životinje tretirane jačom koncentracijom kvercetina pokazivale su intenzivnije promjene u odnosu na kontrolu (slika 5.).

Prvi dan iza tretiranja na trajnim histološkim preparatima planarija tretiranih s navedenom koncentracijom kvercetina uočava se na pojedinim dijelovima tijela oštećenje vanjskog mukoznog sloja i epiderma, te odvajanje od bazalne membrane. Na

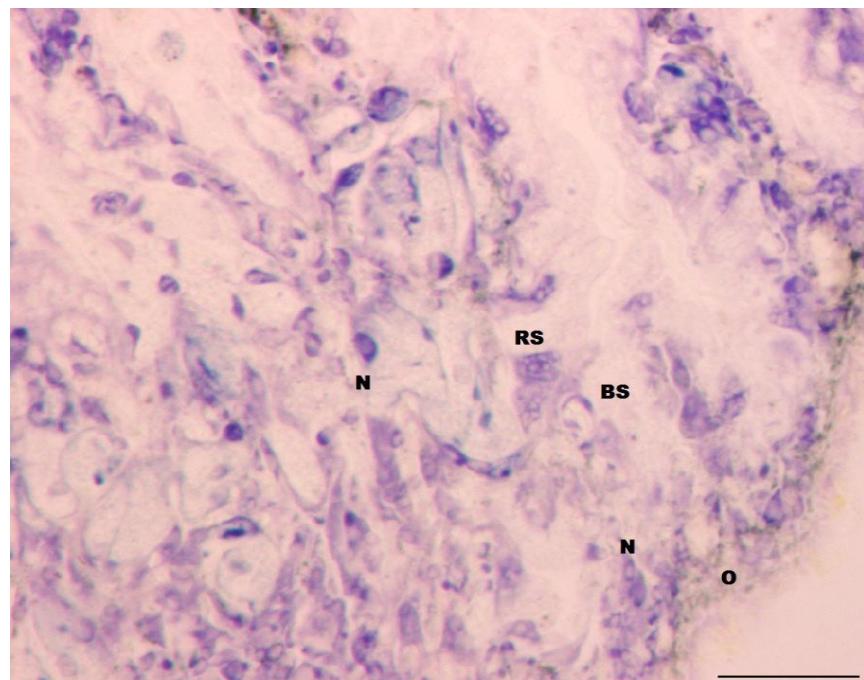
pojedinim mjestima tijela tretiranih planarija uočava se oštećenje rabdita. Njihov broj je smanjen na pojedinim dijelovima tijela.



Slika 5. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.).

Kontrola. Toluidinsko modrilo. Bar-20 µm.

Drugi dan nakon tretiranja vanjski mukozni sloj je potpuno uništen na pojedinim dijelovima planarije, a rabditi su degradirani. Oštećena je i bazalna membrana pa nema granice između površinskog i unutrašnjeg sloja (slika 6.). Unutar parenhima vidljiva su područja bez stanica. Neoblasti su prisutni u području oštećenja. Manji broj neoblasta je u procesu diferencijacije. Manji broj retikularnih stanica je ispunjen brojnim vakuolama.



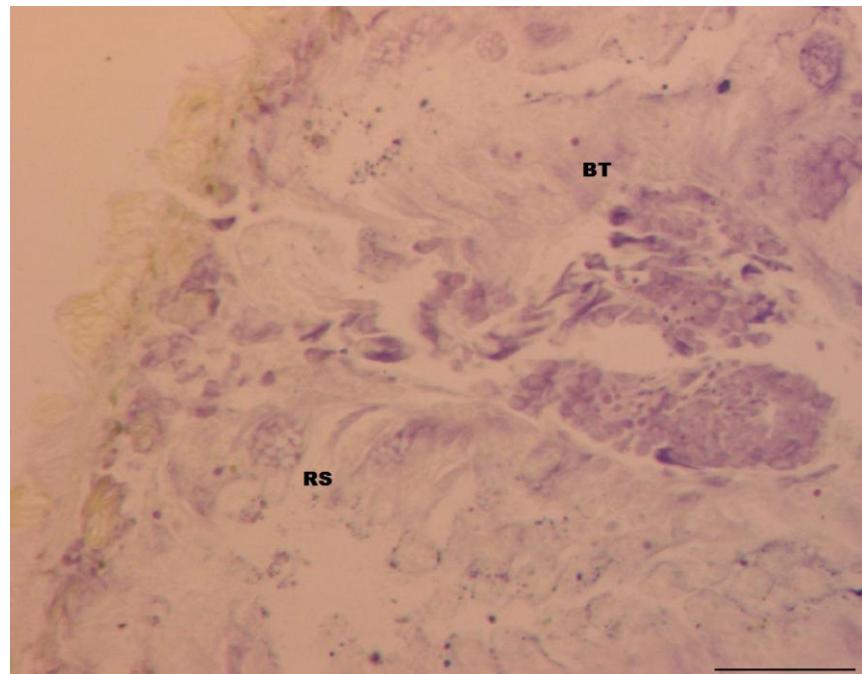
Slika 6. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,2 g/L kvercetina i fiksirane drugi dan.

(O) – bazalne membrane; (BS) – područja bez stanica; (N) – neoblasti; (RS) – retikularne stanice

Toluidinsko modrilo. Bar-20 µm.

Treći dan nakon tretiranja broj neoblasta je smanjen. U području oštećenja uočavaju se brojni neoblasti. Retikularne stanice s velikim vakuolama su također prisutne u parenhimu. Na jajnim stanicama u gonadama se promjene ne primijećuju, dok su u testisima prisutne stanice slabijeg kontrasta.

Sedmog dana nakon tretiranja došlo je do oporavka epidermalnog sloja, ali su u njemu rabditi malobrojni. Broj neoblasta u parenhimu je smanjen, a broj retikularnih stanica nije bitno promijenjen u odnosu na kontrolu. Većina retikularnih stanica sadrži velike, svijetle vakuole. U parenhimu su prisutna bazofilna tjelešca koja su rezultat oštećenja stanica (slika 7.).



Slika 7. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,2 g/L kvercetina i fiksirane sedmi dan.

(RS) - retikularne stanice; (BT) - bazofilna tjelešca

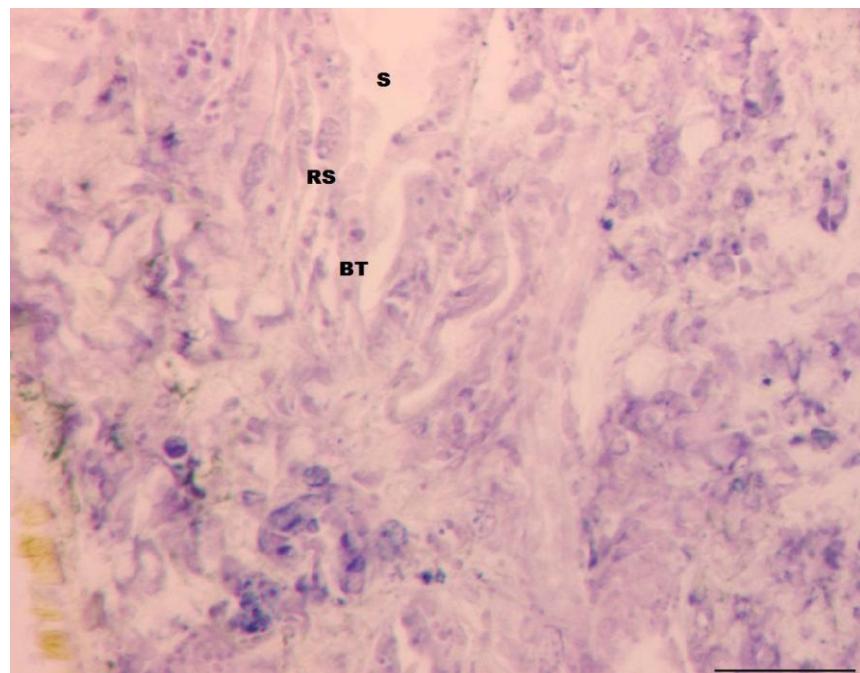
Toluidinsko modrilo. Bar-20 µm.

3.2.2. Histopatološke i citološke promjene vrste *Polycelis felina* (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,3 g/L

Prvi dan nakon tretiranja na trajnim histološkim preparatima vide se oštećenja vanjskog mukoznog sloja i epiderme. Na mjestima oštećenja epiderme prisutni su neoblasti. Manji dijelovi parenhima su oštećeni i ispunjeni sa sluzi. Na gonadama se ne uočavaju bitnije promjene. Retikularne stanice su prisutne u manjem broju.

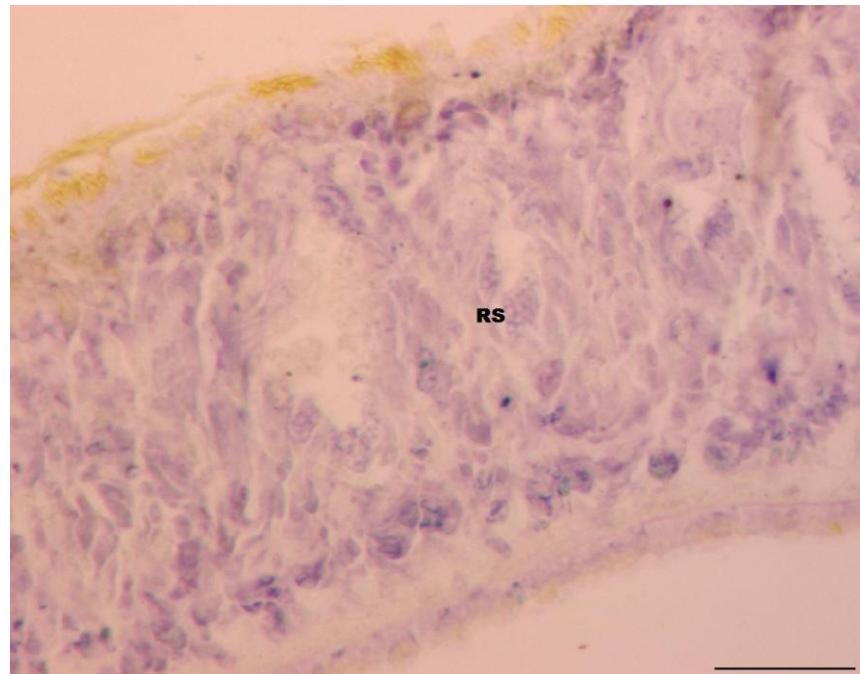
Drugi dan nakon tretiranja još uvijek je uočljivo oštećenje vanjskog mukoznog sloja. Broj neoblasta je nešto smanjen u odnosu na prvi dan, a broj retikularnih stanica je podjednak kao prvi dan. Jajne stanice u gonadama su kao u kontrole. Testisi također ne pokazuju bitne promjene u odnosu na kontrolu.

Treći dan nakon tretiranja oštećenja su izrazito prisutna u parenhimu. Veća područja sadrže sluz i dijelove oštećenih stanica. U parenhimu su dobro vidljiva bazofilna tjelešca, koja su nastala uslijed oštećenja stanica. Retikularne stanice su malobrojne (slika 8.).



Slika 8. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,3 g/L kvercetina i fiksirane treći dan. (S) - sluz i dijelovi oštećenih stanica; (BT) - bazofilna tjelešca; (RS) - retikularne stanice
Toluidinsko modrilo. Bar-20 µm.

Sedmi dan nakon tretiranja vanjski epidermalni sloj je regeneriran, ali u njemu ima manje rabdita nego u kontroli. Neoblasti su prisutni u normalnom broju, a broj retikularnih stanica je povećan (slika 9.).



Slika 9. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,3 g/L kvercetina i fiksirane sedmi dan.

(RS) - retikularne stanice
Toluidinsko modrilo. Bar-20 µm.

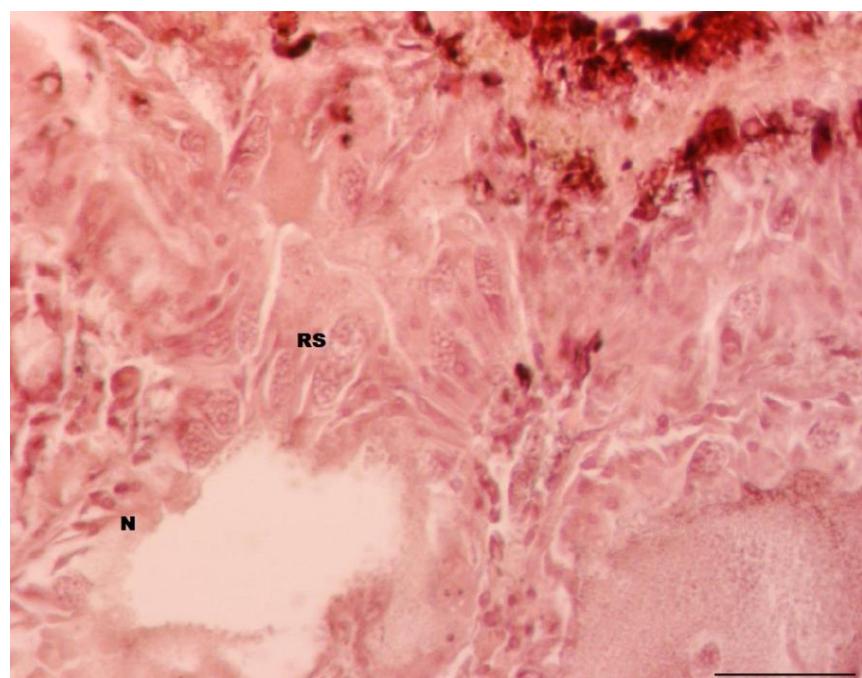
3.2.3. *Histopatološke i citološke promjene vrste Polycelis felina (Daly.) tretirane 24h vodenom otopinom kvercetina koncentracije 0,6 g/L*

Prvi dan nakon tretiranja na histološkim preparatima uočavaju se oštećenja epiderme i parenhima. Oštećen je vanjski mukozni sloj i bazalna membrana, a rabditi su

pomiješani sa stanicama parenhima. U parenhimu prisutni su neoblasti, naročito u području oštećenja, a po brojnosti su slični kao u kontroli. Uočavaju se retikularne stanice koje sadrže velike bijele vakuole.

Drugi dan nakon tretiranja velika količina mukusa nalazi se i u parenhimu. Bazalna membrana je oštećena, a mišićni sloj je slabo vidljiv. Neoblasti u parenhimu su u većem broju nego prošlog dana. Neki od njih su u fazi diferencijacije. Retikularne stanice su prisutne, te im je brojnost kao u kontroli.

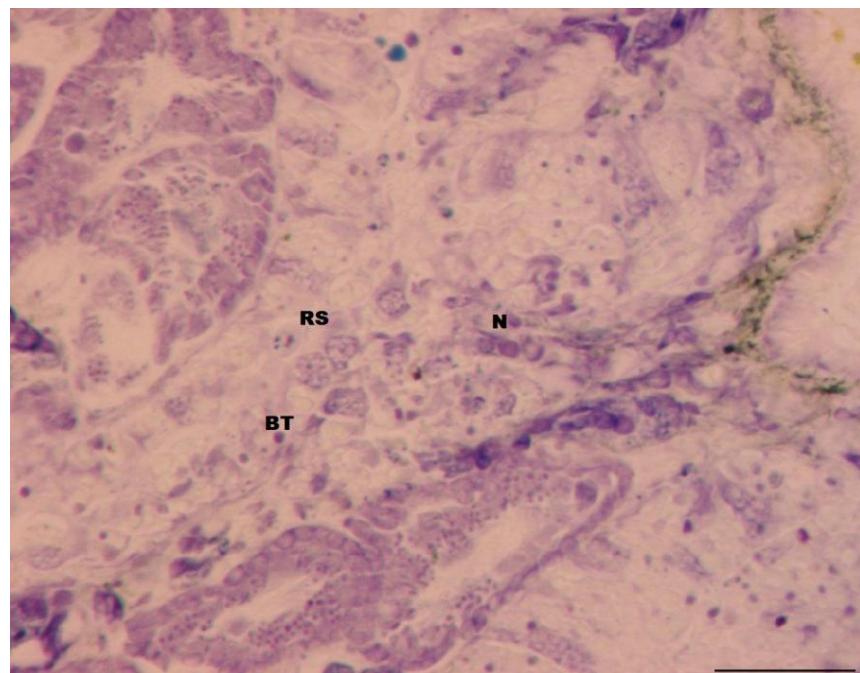
Treći dan nakon tretiranja vanjski mukozni sloj i broj rabiča je regeneriran. Bazalna membrana je dobro vidljiva. Broj retikularnih stanica s velikim bijelim vakuolama je povećan (slika 10.). U parenhimu su prisutni i brojni neoblasti. Neki od njih su u fazi diferencijacije.



Slika 10. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,6 g/L kvercetina i fiksirane treći dan nakon tretiranja.

(RS) - retikularne stanice s velikim bijelim vakuolama; (N) - brojni neoblasti
Meyerova otopina. Bar-20 μm .

Sedmog dana nakon tretiranja vanjski mukozni sloj je regeneriran. Rabditi su prisutni, ali u manjem broju. U parenhimu su prisutna brojna bazofilna tjelešca. Neoblasti su prisutni u podjednakom broju kao i u kontroli. Retikularne stanice s velikim, bijelim vakuolama su također prisutne, ali manje nego prethodnog dana (slika 11.).



Slika 11. Uzdužni presjek planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 0,6 g/L kvercetina

i fiksirane sedmi dan nakon tretiranja.

(BT) – brojna bazofilna tjelešca; (N) – neoblasti; (RS) - retikularne stanice s velikim, bijelim vakuolama

Toluidinsko modrilo. Bar- 20 μm .

4. RASPRAVA

U ovom radu proučavali smo učinak kvercetina na vrstu *Polycelis felina* (Daly.) u laboratorijskim uvjetima. Dokazano je da je mnogooka puzavica vrlo pogodan test-organizam u sličnim istraživanjima. Ona je tijekom cijele godine dostupna u prirodi, a u laboratoriju se lako održava. Posjeduje mitotički aktivne i nediferencirane stanice-neoblaste koji se lako uočavaju svjetlosnim mikroskopom. Do sada je proučavan učinak brojnih ksenobiotika kao i esencijalnih elemenata na vrstu *Polycelis felina* (Daly.) u laboratorijskim uvjetima. Utvrđeno se da, ovisno o dozi, određeni spojevi kao i esencijalni elementi mogu izazivati promjene u ponašanju, morfološkoj građi, promjene staničnih struktura, te mitotske i kromosomske mutacije (*Kalafatić i sur.*, 2004.). U provedenim pokusima utvrđeno je djelovanje kvercetina ovisno o dozi i vremenu tretiranja na lokomociju, morfološke, te histopatološke i citološke promjene.

Flavonoidi utječe i na reprodukciju biljaka i životinja. Kvercetin u većim koncentracijama ima inhibitorni učinak na stopu reprodukcije pčele. Vinska mušica hranjena kvercetinom ima veći broj potomaka. U pokusima na miševima uočena je smanjena fertilnost mužjaka pod utjecajem kvercetina (*Aravindakshan i sur.*, 1995.). Istraživan je učinak kvercetina na sam proces mejoze. U pokusima *in vivo* na vinskoj mušici kvercetin ne pokazuje statistički značajan učinak na segregaciju kromosoma. Kao inhibitor kinaza kvercetin utječe na mejozu oocite školjkaša *Spisula solidissima*. Inhibira fosforilaciju proteina o kojima ovisi pucanje jezgrine membrane tokom mejoze (*Dessev*, 1988.). S druge strane kvercetin je inhibitor raznih ATP-aza, između ostalog i Ca^{2+} -crpke (*Barzilai i Rahamimoff*, 1983.). Inhibicijom pumpanja iona i Ca^{2+} - iz citoplazme kvercetin može, pri manjim koncentracijama, inicirati mejozu kod nekih vrsta (*Eckberg*, 1983.).

U našim pokusima utvrđen je povećan broj neoblasta i retikularnih stanica trećeg dana nakon tretiranja, pa zaključujemo da je kvercetin u primjenjenim dozama imao stimulirajući učinak na diobu neoblasta i retikularnih stanica. Poznato je da mnogi ksenobiotici u subletalnim dozama imaju stimulirajući učinak na diobu stanice i nespolno razmnožavanje. U literaturi je poznato da kvercetin pri nižim koncentracijama može stimulirati diobu stanice raka, a pri višim inhibirati njihov rad. U uvjetima *in vitro*

na raznim tipovima stanica raka, kvercetin pokazuje antiproliferacijsku i citostatičku aktivnost (*Formica i Regelson 1995.; Maggiolini i sur., 2001.; Hodek i sur., 2002.*), što daje nade u liječenju malignih oboljenja.

Osim navedenog primijenjene doze kvercetina oštećivale su površinski mukozni sloj i bazalnu membranu, a broj neoblasta u prvim danima tretmana bio je smanjen.

Sve korištene koncentracije kvercetina izazivale su promjene u ponašanju. Veći broj tretiranih planarija naročito tretiranih s 0,6 g/L kvercetina, pokazivale su lokomotorne promjene. Bile su kontrahirane, a na mehaničke podražaje slabije su reagirale nego kontrolne jedinke. Kontrakcijom tijela planarije nastoje sprječiti prodiranje toksikanata u tijelo. Prva barijera ulasku toksikanta je mukozni sloj, koji je u ovim tretmanima bio oštećen. Životinje su izvijale pojedine dijelove tijela, dezorientirano se kretale, te grupirale.

Na pojedinim mjestima tretirane planarije imale su depigmentirana područja, što u kontroli nije utvrđeno. Na histološkim preparatima uočeno je propadanje većeg broja staničnog materijala. Na spomenutom području prostori su ispunjeni sa sluzi i uginulim stanicama (Slika 8.). Prepostavljamo da upravo ta područja u tretiranih jedinki, predstavljaju depigmentirana mjesta.

Istovremeno s najvećim morfološkim i lokomotornim promjenama javljaju se i histopatološke i citološke promjene. Spomenute promjene najizrazitije su trećeg dana nakon tretiranja. Nediferencirane totipotentne stanice, neoblasti, pokazuju najveći stupanj diferencijacije u retikularne i druge tipove stanica. Trećeg dana nakon tretiranja u svim primijenjenim dozama uočavaju se brojne retikularne stanice koje su promijenjene u odnosu na kontrolu. Naime, citoplazma retikularnih stanica u tretiranih životinja ispunjena je brojnim svijetlim vakuolama. Vakuolarizacija stanica jedan je od načina obrane od štetnog djelovanja ksenobiotika. Prepostavljamo da su retikularne stanice fagocitirale molekule kvercetina i dijelove oštećenih stanica što se očituje u povećanju broja vakuola. Povećan broj retikularnih stanica i vakuola u njima, utvrđen je i u tretmanu planarija s drugim ksenobioticima, primjerice s aluminijevim spojevima. Na histološkim preparatima tretiranih planarija trećeg dana nakon tretiranja utvrđen je velik broj bazofilnih tjelešaca, koji se u određenom broju zadržavaju i sedmog dana nakon tretiranja

(slika 8. i 11.). Bazofilna tjelešca vjerojatno predstavljaju stanične strukture oštećenih stanica (*Kovačević i sur., 2009.*).

Razni spojevi, pa i oni esencijalni u određenim koncentracijama mogu izazvati oksidativni stres, te oštetići biološke važne makromolekule u stanicama kao što su DNA, proteini i lipidi. Brojni učinci kvercetina na stanični ciklus, diferencijaciju i staničnu smrt povezani su s oštećenjem DNA, te utjecajem na gensku ekspresiju. Objašnjenje ovog djelovanja može biti izazivanje lomova DNA putem vodikovog perokksida. (*Yamashita i Kawanishi, 2000.*), te inhibicije brojnih proteina kinaza (*Formica i Regelson, 1995.*) i inhibiciju HSP (heat shock protein) pri povišenoj temperaturi. Oštećenje makromolekula u stanicama dovodi do oštećenja staničnih struktura, smrti stanice, što može rezultirati i smrću organizma (*Žarković, 2000.*). Stoga je važno utvrditi aktivnost određenih enzima kao što je glukoza-6-fosfat, što bi potvrdilo pretpostavku da kvercetin kao i drugi ksenobiotici u većim dozama imaju prooksidativni učinak.

5. ZAKLJUČAK

1. Kvercetin u koncentracijama 0,2 g/L, 0,3 g/L i 0,6 g/L izaziva promjene u lokomociji, vidljive morfološke promjene, te histopatološke i citološke promjene.
2. Primjenjene doze kvercetina izazivaju nekoordinirano kretanje, uvijanje pojedinih dijelova tijela, grupiranje u skupine i depigmentaciju pojedinih dijelova tijela.
3. Histopatološke promjene očituju se u propadanju pojedinih tipova stanica (rabditi i parenhimske stanice). Broj neoblasta i retikularnih stanica je promijenjen u odnosu na kontrolu. Neoblasti pokazuju jači stupanj diferencijacije u druge tipove stanica. Broj retikularnih stanica je povećan, naročito trećeg dana nakon tretiranja. U njima su prisutne brojne svijetle vakuole.
4. Depigmentirana područja na tijelu tretiranih životinja na histološkim preparatima predstavljaju gubitak stanica.
5. Trećeg i sedmog dana iza tretiranja utvrđena su brojna bazofilna tjelešca, koja predstavljaju stanične dijelove oštećenih stanica.
6. Utvrđeno je prooksidativno djelovanje kvercetina na vrstu *Polycelis felina* (Daly.). Oštećenja se povećavaju ovisno o koncentraciji kvercetina i duljini tretiranja.

6. LITERATURA

Aikawa, M., Shimozawa, A. (1991) The multiple eyes of Polycelis. 1. Relation between the number of eyes and body length. *Hidrobiologia*. **227**: 257-262

Aravindakshan, M., Chauhan, P. S., Sundaram, K. (1985) Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. *Mutat. Res* **144**(2): 99-106

Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Higashio, H., Terao, J. (2002) Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**(6): 1706-1712

Baguna, J. (1974) Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism. *J. Exp. Zool.* **190**: 117-122

Baguna, J. (1975 a) Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. *J. Exp. Zool.* **195**: 53-64

Baguna, J. (1975 b) Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *J. Exp. Zool.* **195**: 65-80

Baguna, J., Ballester, R. (1978) The nervous system in planarians: Peripheral and gastrodermal plexuses, pharinx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acelomate organization. *J. Exp. Zool.* **155**: 237-252

Baguna, J., Romero, R. (1981) Quantitive analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia*, **84**: 181-194.

Baker, M. E. (1995) Endocrine activity of plant-derived compounds: an evolutionary perspective. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**: 131-138

Baker, M. E., Medlock, K. L., Sheehan, D. M. (1998) Flavonoids inhibit estrogen binding to rat alpha-fetoprotein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**(3): 317-321

Barzilai, A., Rahamimoff, H. (1983) Inhibition of Ca^{2+} -transport ATPase from synaptosomal vesicles by flavonoids. *Biochim. Biophys. Acta*. **730**: 245-254

Benazzi, M. (1973) Fissioning in planarians from a genetic stand-point. In biology of the Turbellaria, Libbie H. Hyman Memorial Volume. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 447-492

Benazzi, M., Benazzi Lentati, G. (1983) Further research on the control of fissioning in planarians. *Monit. Zool. Ital. (N.S.)* **17**: 329-346

Best, J. B., Hand, S., Rosenvold, R. (1968) Mitosis in normal and regenerating planarians J. Exp. Zool. **168**: 157-168

Betchaku, T. (1967) Isolation of planarian neoblasts and their behaviour *in vitro* with some aspects of the mechanism of the formation of regeneration blastema. J. Exp. Zool. **164**: 407-434

Betchaku, T. (1970) The cellular mechanism of the formation of a regeneration blastema of freshwater planaria *Dugesia dorotocephala*. I. The behavior of cells in tiny body fragment isolated *in vitro*. J. Exp. Zool. **174**: 253-280

Bjeldanes, L. F., Chang, G. W. (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. Science **197**: 577-578

Bowen, I. D., Ryder, T. A. (1973) The fine structure of the planarian *Polyclenis tenuis* Iijima. I. The pharynx. Protoplasma, **78**: 223-241

Bowen, I. D., Ryder T. A., Thompson, J. A. (1974) The fine structure of the planarian *Polyclenis felina* Iijima. II. The intestine and gastrodermal phagocytosis. Protoplasma, **79**: 1-17

Brøndsted, H. V. (1969) Planarian Regeneration. Pergamon Press Ltd., London, pp. 183-198

Calatayud, P. A., Leru, B. (1996) Study of the nutritional relationships between the cassava mealybug and its host plant. Bulletin de la Societe Zoologique de France. **121**(4): 391-398

Coward, S. J., Hirsh, F. M., Taylor, J. H. (1970) Timidine kinase activity during regeneration in the planarian *Dugesia dorotocephala* J. Exp. Zool. **173**: 269-278

Dessev, G., Goldman, R. (1988) Meotic breakdown of nuclear envelope in oocytes of *Spisula solidissima* involves phosphorylation and release of nuclear lamin. Dev. Biol. **130**(2): 543-550

Duffey, S. S., Isman, M.B. (1981) Inhibition of insect larval growth by phenolics in glandular trichomes of tomato leaves. Experientia **37**: 574-576

Eckberg, W. R. (1983) The effects of quercetin on meiosis initiation in clam and starfish oocytes. Cell. Differ. **12**:245-254

Formica, J. V., Regelson, W. (1999) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem. Toxicol. **33**(12): 1061-1080

Gardiner, M. S. (1972) The biology of invertebrates. Mc Graw-Hill Book Company, New York, pp 860-866

Gazzoni, D. L., Hulsmeyer, A., Hoffmanncampo, C. B. (1997) Effect of different rates of quercetin and rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira **32**(7): 673-681

Graf, A., Alonso Moraga, A., Castro, R., Diaz Carrillo, E. (1994) Genotoxicity testing of different types of beverages in The *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. Food Chem. Toxicol. **32**(5): 423-430

Grasso, M., Benazzi, M. (1973) Genetic and phisiologic control of fissioning and sexuality in planarians. J. Embriol. Exp. Morph. Vol 30., 2:317-328

Gurgler, R., Leschik, M., Dengler, H. J. (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. Eur. J. Clin. Pharmacol. **9**(2-3): 229-234

Harborne, J. B. (1999) Plant chemical ecology. U: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohn O(ur.) Comprehensive natural products chemistry., vol.8: Mori K (ur.vol.) Miscellaneous natural products including marine natural products, pheromones, plant hormones and aspects of ecology. Elsevier Science Ltd., Oxford, 137-196

Hodek, P., Trefil, P., Striborova, M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Mini review. Chem. Biol. Interact. **139**: 1-21

Hollman, P. C., Bijsman, M. N., van Gameren, Y., Cnossen., de Vires, J. H., Katan, M. B. (1999) The sugar moiety is a mayor determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic. Res. **31**(6): 569-573

Hollman, P. C., Katan, M. B. (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. Arch. Toxicol. Suppl. **20**: 237-248

Horwath, K. L., Stamp, N. E. (1993) Use of dietary rutin to study molt initiation in manduca-sexta larvae. Journal of Insect Physiology. **39**(11): 987-1000

Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Aoike, A., Kawai, K., Nagata, K. (1992) Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids. Mol. Cell. Biol. **12**(8): 3490-3498

Kalafatić, M., Kopjar, N., Besendorfer, V. (2001) The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polyclenis felina* (Daly.) caused by *in vitro* treatment with cadmium sulfate. Toxicology in Vitro. **18**: 99-101

Kovačević, G., Gregorović, G., Kalafatić, M., Jaklinović, J. (2009) The effect of Aluminium on the Planarian *Polyclenis felina* (Daly.) Water Air Soil Pollut. **196**:333-344

Kuchiwa, T., Kuchiwa, S., Teshirogi, W. (1991) Comparative morphological studies on the visual systems in a binocular and multi-ocular species of freshwater planarian. *Hydrobiologia*. **227**: 241-250

Kurabuchi, S., Kishida, Y. (1990) Influence of the tail graft on axial polarity in planarian regeneration. *J. Exp. Zool.* **253**: 334- 339

Lange, C. S. (1966) Observations on some tumours found in two species of planaria- *Dugesia etrusca* and *D. ilvana*. *J. Embriol. Exp. Morph.* Vol 15, **2**: 125-130

Lange, C. S. (1967) A possible explanation in cellular terms of the physiological ageing of the planarian. *Exp. Geront.* **3**: 219-230

Lange , C. S. (1968) Studies on the celular basis of radiation lethality I. The pattern of mortality in the whole-body irradiated planarian (Tricladida, Paludicola). *Int. J. Radiat. Biol.* Vol.13, **6**: 511- 530

Lock, M. A., Reynolds, T. B. (1976.) The role of interspecific competition in the distribution of two stream dwelling tricladids, *Crenobia alpina* (Dana) and *Polyclelis felina* (Daly.), North Wales. *J. Anim. Ecol.* **45**: 581-592

Maggiolini, M., Bonofoglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D., Ando, S. (2001) Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Pharmacol.* **60**(3): 595-602

Mahadevan, A. (1982) International bioscience monograph – 11. Biochemical aspects of plant disease resistance. Today & tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, 581

Manach, C., Schalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability *Am J Clin Nutr* **79**(5): 727-747

Matoničkin, I., Habdija, I., Princ-Habdija, B. (1999) Beskralješnjaci. Biologija viših avertebrata. 3.izd. Školska knjiga, Zagreb, 609

Mead, R. W. (1991) Effect of timing of cutting on patterning and proportion regulation during regeneration of the planarian *Dugesia tigrina*, *Hydrobiologia*, **227**: 25-30

Mead, R. W. (1991) Proportioning of body regions in the planarian *Dugesia tigrina* as a function of the lenght: Width ratio of the regenerating fragment. *J. Exp. Zool.* **259**: 69-77

Mead, R. W. Krump, M. A. (1986) Abnormal regeneration in the planarian *Dugesia tigrina* as a function of the lenght: Width ratio of the regenerating fragment. *J. Exp. Zool.* **239**: 355-364

Mitchell, M. J., Keogh, D. P., Crooks, J. R., Smith, S. L. (1993) Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase activity. Insect Biochem. Mol. Biol. **23**(1): 65-71

Moraczewski, J. (1981) Cell activation during regeneration of planarians. Hydrobiologia, **84**: 203-208

Moraczewski, J., Martelly, I., Franquinet, R. (1986) Protein phosphorylation and the role of Ca^{2+} in planarian turbellarian regeneration. Hydrobiologia, **132**: 223-228

Morgan, E. D., Wilson, I. D. (1999) Insect hormones and insect chemical ecology. U:Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O. (ur.) Comprehensive natural products chemistry, vol 8: Mori, K. (ur.vol.) Miscellaneous natural products including marine natural products, pheromones, plant hormones and aspects of ecology. Elsevier Science Ltd., Oxford, 263-375

Morita, M., Best J. B. (1974) Electron microscopic studies of planarian regeneration. II. Changes in epidermis during regeneration J. Exp. Zool. **187**: 345-373

Morita, M., Best J. B. (1974) Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala* J. Exp. Zool. **229**: 425-436

National Public Health Institute (KTL); Erlund, I. (2002) Chemical analysis and pharmacokinetics of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin in humans. Akad. dizertacija.

Nentwig, M. R., Schable, M. K. (1974) Influence of the nutritional state on repeated head regeneration, growth, and fission in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. J. Exp-Zool. **187**: 295-302

Oberdörster, E., Clay, M. A., Cottam, D. M., Wilmot, F. A., McLachlan, J. A., Milner, M. J. (2001) Common phytochemicals are ecdysteroid agonist and antagonists: a possible evolutionary link between vertebrate and invertebrate steroid hormones. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. **77**: 229-238

Osier, T. L. Traugott, M. S., Stamp, N. E. (1996) Allelochemicals in tomato leaves affect a specialist insect herbivore *Manduca sexta* negatively but with no ill effects on a generalist insect predator, *Podisus maculiventris*. Oikos **77**(3): 481-488

Pala, M., Casu, S., Corso, G., Vacca, R. A. (1987) Fissioning in planarians.2.Experimental studies on fissioning mechanics in an asexual strain of *Dugesia gonocephala* S. L. (Turbellaria, Tricladida). Monitore Zool. Ital. (N.S.). **21**: 117-131

Roca, J. R., Ribas M., Baguna J. (1992). Distribution, ecology, mode of reproduction and karyology of freshwater planarians in the springs of the central Pyrenees. Ecography, **15**: 373-384

Ryan, K. G., Swinny, E. E., Winefield, C., Markham, K. R. (2001) Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis mutans*. Z Naturforsch **56**(9-10): 745-754

Sakai-Wada, A., Mukaidani, C. (1985) Ultrastructure and ATP-ase activity of the centriolar body at the mitotic stage in neoblasts of the planarian *Dugesia* sp. Chromosoma (Berl.), **93**: 43-48

Salò, E., Baguñà, J. (1986) Stimulation of Cellular Proliferation and Differentiation in the Intact and Regenerating Planarian Dugesia (G) tigrina by the Neuropeptide Substance P. J. Exp. Zool. **237**: 129-135

Sauzin, M. J. (1967) Etude ultrastructurale de la differenciation du neoblaste au cours de la regeneration de la planaire *Dugesia gonocephala*. I. Differenciation en cellule nerveuse. Bulletin de la Societe Zoologique de France. Tome 92, **2**: 313-318

Schramm, D. D., Collins, H. E., Hawley R. S., German, J. B. (1998) Unaltered meiotic chromosome segregation in *Drosophila melanogaster* raised on a 5% quercetin diet. Food Chem. Toxicol. **36**: 585-589

Stamp, N. E. (1994 a) Interactive effects of rutin and costant versus alternating temperatures on performance of *Manduca sexta* caterpillars. Entomologia Experimentalis et Applicata. **72**(2): 125-133

Stamp, N. E. (1994 b) Simultaneous effects of potassium, rutin and temperature on performance of *Manduca sexta* caterpillars. Entomologia Experimentalis et Applicata. **72**(2): 135-143

Stamp, N. E., Temple, M. P., Traugott, M. S., Wilkens, R. T. (1994) Temperature allelochemical interactive effects on performance of *Manduca sexta* caterpillars. Entomologia Experimentalis et Applicata. **73**(3): 199-210

Stamp, N. E., Yang, Y. L. (1996) Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. Ecology **77**(4): 1088-1102

Stamp, N. E., Yang, Y. L., Osier, T. L. (1997) Response of an insect predator to prey fed multiple allelochemicals under representative thermal regimes. Ecology. **78**(1): 203-214

Villar, D., Schaeffer, D. J. (1993) Morfogenic action of neurotransmitters on regenerating planarians – a review. Biomedical and Environmental Sciences, **6**: 327-347

Walle, T. (2000) Absorption and metabolism of flavonoids. *Fre Radical Biol Med* **36**(7): 829-837

Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J. A., Walle, U. K., Halushka, P. V. (2001) Disposition and metabolism of the flavonoid chrysins in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **51**(2): 143-146

Wrona, F. J. (1986) Distribution, abundance, and size of rhabdoids in *Dugesia polychroa* (Turbellaria: Tricladida). *Hidrobiologia*, **132**: 287-293

Yamashita, Y., Kawanishi, S., Nakano, H. (1990) Introduction of mammalian topoisomerase II dependant DNA cleavage by noninteractive flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol* **39**(4): 737-744

Yang, Y. L., Stamp, N. E. (1995) Simultaneous effects of night-time temperature and an allelochemical on performance of an insect herbivore. *Oecologia*. **104**(2): 225-233

Yang, Y. L., Stamp, N. E., Osier, T. L. (1996) Effects of temperature, multiple allelochemicals and larval age on the performance of a specialist caterpillar. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **79**(3): 335-344

Žarković, N. (2000) Mechanisms der Tumorentstehung. *Pharmazeuntische Zeitung* **145**: 239-245