

ŠOLSKI CENTER VELENJE

GIMNAZIJA

Trg mladosti 3, 3320 Velenje

MLADI RAZISKOVALCI ZA RAZVOJ SAŠA REGIJE

RAZISKOVALNA NALOGA

**ZATIRANJE PLANARIJ V AKVARIJU Z VODNIMI EKSTRAKTI  
IZBRANIH RASTLINSKIH VRST**

Tematsko področje: EKOLOGIJA Z VARSTVOM OKOLJA

Avtor:

Jaka Aleksander Sever, 2. letnik

Mentorica:

Irena Štimac, univ. dipl. biol.

Velenje, 2025

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

Raziskovalna naloga je bila opravljena na Gimnaziji Šolskega centra Velenje.

Mentorica: Irena Štimac, univ. dipl. biol.

Datum predstavitve: marec 2025

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Gimnazija ŠC Velenje, šolsko leto 2024/2025

KG planarije / vodni ekstrakti / vpliv na regeneracijo / zatiranje / ROS / signalne poti  
antioksidanti

AV SEVER, Jaka Aleksander

SA ŠTIMAC, Irena

KZ 3320 Velenje, SLO, Trg mladosti 3

ZA Gimnazija ŠC Velenje

LI 2025

IN **ZATIRANJE PLANARIJ V AKVARIJU Z VODNIMI EKSTRATKI  
IZBRANIH RASTLINSKIH VRST**

TD Raziskovalna naloga

OP XI, 43 str., 2 tab., 1 graf., 29 sl., 1 pril., 86 vir.

IJ SL

JI sl

AI Med vsiljivce v akvarijih s kozicami med drugim sodijo planarije, saj jih plenijo, hkrati pa se zelo hitro razmnožujejo. Gre za ploske črve z izjemnimi regenerativnimi sposobnostmi. Ta lastnost služi tudi kot učinkovit način nespolnega razmnoževanja. Za njihovo zatiranje je na tržišču nekaj izdelkov, vendar so dragi ali pa negativno vplivajo na kozice. V ta namen sem se lotil raziskovanja zatiranja planarij z vodnimi ekstrakti, pripravljenimi iz lokalno dostopnih rastlinskih vrst kot cenejša in okolju prijaznejša alternativa. Pripravil sem tri vodne ekstrakte dveh koncentracij iz šišek hrasta, storžkov črne jelše ter listja bukve. Za oceno učinkovitosti posameznih ekstraktov na zatiranje planarij sem upošteval hitrost njihove regeneracije. Planarijam vrste *Polycelis nigra* sem odstranil rep in jih vstavil v posamezne medije. Osebkam sem slikal vsake tri dni. S pomočjo programa ImageJ sem izmeril površino prozornega nediferenciranega tkiva vsakega osebk, s čimer sem določil konec regeneracije. Najučinkovitejši je bil ekstrakt šišek hrasta višje koncentracije, najmanj pa ekstrakt listja bukve nižje koncentracije. Ugotovil sem, da učinkovitost ekstraktov narašča z naraščajočo vsebnostjo antioksidantov v rastlinskem materialu zaradi reduciranja prostih radikalov (ROS) v okolici rane, ki so ključnega pomena za uspešno regeneracijo. Izjemno velika količina antioksidantov poruši ravnovesje med antioksidanti in ROS, kar povzroči pogin osebkov zaradi redukcijskega stresa.

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Gimnazija ŠC Velenje, school year 2024/2025

CX planaria / water extracts / effect on regeneration / suppression / ROS / signaling  
pathways / antioxidants

AU SEVER, Jaka Aleksander

AA ŠTIMAC, Irena

PP 3320 Velenje, SLO, Trg mladosti 3

BB Gimnazija ŠC Velenje

PY 2025

TI **SUPPRESSION OF PLANARIA IN AQUARIUM WITH WATER EXTRACTS  
OF SELECTED PLANT SPECIES**

DT Research work

NO XI, 43 p., 2 tab., 1 graf., 29 fig., 1 ann., 86 ref.

LA SL

AL sl / en

AB Among the invaders of freshwater shrimp aquariums are planarians, as they are known to prey on them, and additionally reproduce very quickly. Planarians are flatworms with outstanding regenerative abilities. This property also serves them as an effective method of asexual reproduction. There are several products on the market with a function of suppressing them, however they can be quite expensive or have negative impacts on shrimp. This led me to start researching the effects of aquatic extracts prepared from locally available plant species as a cheaper and more environmentally friendly alternative of suppressing planaria. I prepared three aquatic extracts of two concentrations from oak galls, black alder cones and beech leaves. To assess the effectiveness of individual extracts on suppression of planaria, I took into account the speed of their regeneration. I removed the tails of *Polycelis nigra* species of planaria and inserted each specimen into individual media. Then I photographed the specimens every three days. Using ImageJ, I measured the surface area of each specimen's transparent undifferentiated tissue, with the help of which I could determine the end of regeneration. The most effective was the extract of oak galls of higher concentration, and the least effective was the beech leaves aqueous extract of lower concentration. I found that the effectiveness of the extracts increases with the increasing content of antioxidants in the plant material due to the reduction of free radicals (ROS) in the wound area, which are crucial for successful regeneration. Extremely high amount of antioxidants disrupts the redox balance, resulting in the death of the specimens due to the reductive stress.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO TABEL .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO GRAFOV .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>2</b>
2.1 PLANARIJE .....	2
2.1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA PLANARIJ .....	2
2.1.2 REGENERATIVNE SPOSOBNOSTI PLANARIJ .....	3
2.1.2.1 VPLIV REAKTIVNIH KISI KOVIH SPOJIN NA REGENERACIJO .....	4
2.1.2.2 MAPK (ERK) SIGNALNA POT .....	5
2.1.2.3 VPLIV ROS NA MAPK (ERK) KASKADO .....	6
2.1.2.4 PI3K/Akt SIGNALNA POT .....	7
2.1.2.5 VPLIV ROS NA PI3K/Akt KASKADO .....	8
2.1.2.6 JAK/STAT SIGNALNA POT .....	9
2.1.2.7 VPLIV ROS NA JAK/STAT KASKADO .....	10
2.1.2.8 POVEZAVE MED MAPK (ERK), PI3K/Akt IN JAK/STAT SIGNALNIMI POTMI .....	10
2.2 UČINKOVINE VODNIH EKSTRAKTOV POSAMEZNIH RASTLINSKIH VRST .....	12
2.2.1 ŠIŠKE PUHASTEGA HRASTA ( <i>Quercus pubescens</i> ) .....	12
2.2.2 STORŽKI ČRNE JELŠE ( <i>Alnus glutinosa</i> ) .....	13
2.2.3 LISTJE NAVADNE BUKVE ( <i>Fagus sylvatica</i> ) .....	13
2.2.4 VPLIV ANTIOKSIDANTOV NA REGENERACIJO .....	13

<b>3 METODE DELA .....</b>	<b>14</b>
3.1 TESTNI ORGANIZMI .....	14
3.1.1 GOJENJE PLANARIJ .....	14
3.2 VODNI EKSTRAKTI .....	15
3.2.1 DOBAVA RASTLINSKEGA MATERIALA .....	15
3.2.2 PRIPRAVA EKSTRAKTOV .....	15
3.2.3 IZRAČUN KONCENTRACIJE PRIDOBLENIH VODNIH EKSTRAKTOV ..	16
3.2.4 METODA OCENJEVANJA UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV .....	17
3.2.4.1 IZBIRA KONCENTRACIJ VODNIH EKSTRAKTOV .....	17
3.2.4.2 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV .....	18
3.3 VPLIV NAJUČINKOVITEJŠEGA RASTLINSKEGA MATERIALA NA SLADKOVODNE KOZICE .....	20
3.3.1 TESTNA VRSTA .....	20
3.3.2 NASTAVITEV BIVALIŠČ ZA KOZICE .....	21
3.3.3 OSKRBA KOZIC .....	21
3.3.4 DOLOČITEV VPLIVA NAJUČINKOVITEJŠEGA RASTLINSKEGA MATERIALA NA AKVARIJ S KOZICAMI .....	22
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
4.1 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV .....	23
4.2 REZULTATI EKSPERIMENTA ZA DOLOČITEV VPLIVA NA AKVARIJ S KOZICAMI .....	27
4.2.1 VPLIV NA KOZICE IN PLANARIJE .....	27
4.2.2 VPLIV NA RASTLINE IN ESTETSKOST AKVARIJA .....	27
<b>5 DISKUSIJA .....</b>	<b>28</b>
<b>6 ZAKLJUČEK .....</b>	<b>32</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>33</b>
<b>8 SUMMARY .....</b>	<b>34</b>
<b>9 VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>35</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>44</b>

## KAZALO TABEL

TABELA 1: INTENZITETA ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA, GLEDE NA IC(50) VREDNOST <sup>53</sup> .....	12
TABELA 2: ČAS REGENERACIJE AMPUTIRANEGA DELA PO OSEBKIH PLANARIJ V POSAMEZNIH MEDIJAH .....	25

## KAZALO SLIK

SLIKA 1: PLANARIJA, KI SE LOTEVA SLADKOVODNE KOZICE <sup>60</sup> . ....	1
SLIKA 2: ILUSTRACIJA ANATOMIJE PLANARIJ <sup>1</sup> . ....	2
SLIKA 3: (A) SHEMATSKI PRIKAZ DIFERENCIACIJE NEOBLASTOV V PORGENITORSKE CELICE (NA SHEMI POIMENOVANE "UNDIFFERENTIATED BLASTEMA CELLS", KI SE DIFERENCIRAJO V DOLOČEN TIP CELICE) <sup>64</sup> . ....	3
SLIKA 4: (B) TVORBA BLASTEME PO AMPUTACIJI RAZLIČNIH FRAGMENTOV TELES PLANARIJE <sup>65</sup> . ....	3
SLIKA 5: MAPK (ERK) SIGNALNA POT <sup>40</sup> . ....	5
SLIKA 6: PI3K/AKT SIGNALNA POT <sup>19</sup> . ....	7
SLIKA 7: VPLIV ROS NA PI3K/AKT SIGNALNO POT <sup>3</sup> . ....	8
SLIKA 8: JAK/STAT SIGNALNA POT <sup>47</sup> . ....	9
SLIKA 9: POVEZAVE MED MAPK (ERK), PI3K/AKT IN JAK/STAT SIGNALNIMI POTMI <sup>85</sup> . ....	11
SLIKA 10: SKELETNE FORMULE TANINSKE (LEVO) IN GALNE KISLINE (DESNO) <sup>81</sup> . ....	12
SLIKA 11: VPLIV TANINSKE KISLINE NA NEKATERE SIGNALNE POTI. RDEČA PUŠČICA Z MINUSOM PRIKAŽUJE NEGATIVNO REGULACIJO, ČRNA PA AKTIVACIJO <sup>83</sup> . ....	13
SLIKA 12: PO DODATKU HRANE V AKVARIJ, POSTANEJO PLANARIJE ZELO AKTIVNE (FOTO: J. A. SEVER). ....	14
SLIKA 13: UPORABLJEN RASTLINSKI MATERIAL (LEVO SO ŠIŠKE PUHASTEGA HRASTA, NA SREDINI STORŽKI ČRNE JELŠE, DESNO PA JE LISTJE NAVADNE BUKVE) (FOTO: J. A. SEVER). ....	15
SLIKA 14: VODNA EKSTRAKCIJA (TEHTANJE, PREDHODNO SEGREVANJE DEIONIZIRANE VODE, KUHANJE) (FOTO: J. A. SEVER). ....	16

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

SLIKA 15: REDČENJE IN PRIPRAVA KONCENTRACIJ VODNIH EKSTRAKTOV (FOTO: J. A. SEVER). .....	18
SLIKA 16: DOLOČEVANJE DELEŽA TELESA, KI GA PREDSTAVLJA AMPUTIRAN REP PLANARIJ (FOTO: J. A. SEVER). .....	19
SLIKA 17: MERJENJE BLASTEME S PROGRAMOM IMAGEJ (FOTO: J. A. SEVER). .....	19
SLIKA 18: KONČANA REGENERACIJA <sup>16</sup> . .....	19
SLIKA 19: SLADKOVOodne KOZICE VRSTE <i>NEOCARIDINA DAVIDI</i> (FOTO: J. A. SEVER).....	20
SLIKA 20: PRIPRAVLJENA AKVARIJA ZA KOZICE (FOTO: J. A. SEVER).....	21
SLIKA 21: NASTAVITEV EKSPERIMENTA ZA DOLOČITEV VPLIVA NAJUČINKOVITEJŠEGA EKSTRAKTA NA AKVARIJ S KOZICAMI (FOTO: J. A. SEVER).....	22
SLIKA 22: OSEBEK JE POGINIL PO ENEM DNEVU BIVANJA V VODNEM EKSTRAKTU HRASTOVIH ŠIŠK KONCENTRACIJE 2,1 MG/ML (FOTO: J. A. SEVER). .....	23
SLIKA 23: PRIMERJAVA VELIKOSTI BLASTEME TRI DNI PO AMPUTACIJI MED OSEBKO V EKSTRAKTU ČRNE JELŠE (LEVO) IN KONTROLNIM OSEBKOM (DESNO) (FOTO: J. A. SEVER). .....	26
SLIKA 24: PRIMERJAVA OBARVANOSTI BLASTEME 21 DNI PO AMPUTACIJI MED OSEBKOM V EKSTRAKTU ČRNE JELŠE (LEVO) IN KONTROLNIM OSEBKOM (DESNO) (FOTO: J. A. SEVER). .....	26
SLIKA 25: PRIMERJAVA RASTLINE VRSTE <i>PISTIA STRATIOTES</i> , PO NAMAKANJU HRASTOVIH ŠIŠK Z RASTLINO V KONTROLNEM AKVARIJU (FOTO: J. A. SEVER). .....	27
SLIKA 26: OBARVANJE POROZNIH, KERAMIČNIH VALJEV (FOTO: J. A. SEVER). .....	27
SLIKA 27: PAST ZA PLANARIJE <sup>59</sup> . .....	28
SLIKA 28: VRSTA RIBE, KI JO LAHKO UPORABIMO PRI BIOLOŠKEM ZATIRANJU PLANARIJ <sup>66</sup> . .....	28
SLIKA 29: KOMERCIALNA SREDSTVA ZA ZATIRANJE PLANARIJ (FOTO: J. A. SEVER). .....	29

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

## KAZALO GRAFOV

GRAF 1: POVPREČNA POVRŠINA BLASTEME OSEBKOV V POSAMEZNIH VODNIH EKSTRAKTIH .....	24
--	----

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: POSTOPKI MERJENJA POVRŠINE BLASTME S PROGRAMOM IMAGEJ.....	45
---	----

## SEZNAM OKRAJŠAV

ang.	angleško
oz.	oziroma
ipd.	in podobno
ROS	reaktivne kisikove spojine
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
mL	mililiter
mg	miligram
g	gram
ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
Nox	NADPH-oksidaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
RTK	tirozin-kinazni receptorji
EGFR	ang. epidermal growth factor receptor
Grb2	ang. growth factor receptor-bound protein
SOS	ang. son of sevenless
Ras	ang. rat sarcoma
Raf-kinaza	ang. rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MEK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza kinaza
MAP3K	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza kinaza kinaza
ERK	z zunajceličnimi signali regulirana kinaza
AP1	aktivacijski protein 1
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PIP2	fosfatidilinozitol-(4,5)-bisfosfat
PIP3	fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

mTOR	ang. mechanistic target of rapamycin
Akt	protein-serin/treonin kinaza
PTEN	fosfataza in tenzin homolog
PTP	protein tirozin fosfataza
hsp70	protein toplotnega šoka 70
JAK	Janusova kinaza
STAT	signalni prevodnik in aktivator transkripcije
TYK2	tirozin kinaza 2
SOCS3	ang. suppressor of cytokine signaling 3
RasGAP	ang. Ras-GTPase activating protein
TPC	celotna vsebina polifenolov
IC(50)	koncentracija substrata, ki povzroči zmanjšanje aktivnosti molekule prostega radikala za 50 %

## 1 UVOD

Planarije (Planariidae) so družina ploskih črvov (Plathelminthes), ki so znane predvsem po svojih neverjetnih sposobnosti regeneracije manjkajočih delov telesa. Naseljujejo vodne in terestrične habitate.

Pojavijo se lahko tudi v naših akvarijih pri vsaditvi akvarijskih rastlin, na katere so se planarije oprijele. Planarije, s katerimi se srečamo v akvaristiki, so običajno nenevarne, toda obstaja nekaj vrst, ki so odlični plenilci raznih kozic, polžev ter manjših rib. To za akvariste ni dobro, saj se lahko hitro namnožijo, s tem pa se poveča tudi ogroženost manjših akvarijskih živali. Razmnožujejo se lahko tudi nespolno s cepitvijo telesa in regeneracije odcepljenih delov, iz katerih zrastejo genetsko enaki osebk. Na trgu obstaja veliko kemičnih sredstev za zatiranje planarij, ki niso vedno varna za ostale prebivalce akvarija, prav tako pa niso najcenejša.

V ta namen sem začel raziskovati, kako z naravnejšimi, okolju, denarnici in živalim prijaznimi sredstvi odstraniti planarije oziroma zavirati napredovanje njihove populacije v naših akvarijih. Pripravil sem dve različni koncentraciji vodnih ekstraktov treh različnih rastlinskih vrst. Namen raziskovanja je bil odkriti, kateri vodni ekstrakt najbolj zatira te prilagodljive ploske črve in kakšni so mehanizmi učinkovanja na zatiranje populacije.



Slika 1: Planarija, ki se loteva sladkovodne kozice<sup>60</sup>.

### HIPOTEZE:

- Najučinkovitejši bo vodni ekstrakt storžev črne jelše, najmanj pa vodni ekstrakt listja navadne bukke.
- Višje koncentracije rastlinskega materiala bodo bolj zatirale planarije kot nižje.
- Najučinkovitejši vodni ekstrakt bo manj učinkovit kakor komercialna sredstva za zatiranje planarij v akvariju.
- Vodni ekstrakti vplivajo na regeneracijo planarij preko reduciranja ROS.
- Vodni ekstrakt, ki učinkovito zatira planarije, ne bo škodoval sladkovodnim kozicam.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PLANARIJE

Planarije (Planariidae) so družina obsežnega debla z več kot 20 000 vrstami ploskih črvov (Plathelminthes), kamor poleg ostalih vrtinčarjev (Turbellaria) prištevamo še reda trakulj (Cestoda) in metljajev (Trematoda). V nasprotju s trakuljami in metljaji so planarije prostoživeči neparazitski organizmi, ki večinoma naseljujejo potoke, reke in ribnike<sup>67</sup>.

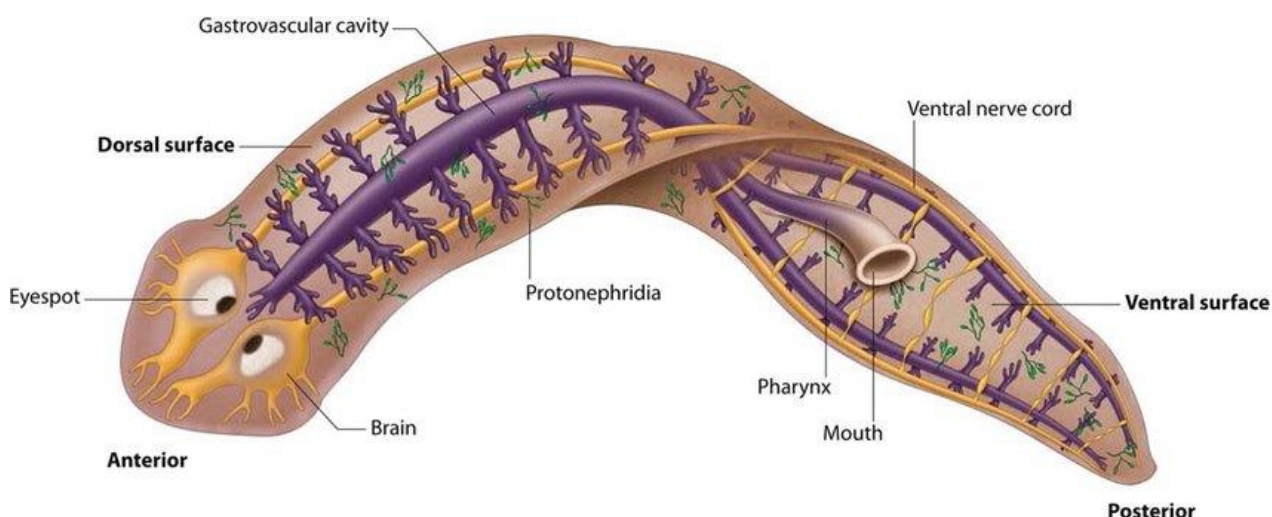
#### 2.1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA PLANARIJ

Planarije spadajo med vrtinčarje tričrevnike (Triclada), za katere je značilno črevesje, ki se začne z rilčasto iztegljivim mišičastim žrelom. Za požiralnikom se črevesje razcepi na tri glavne krake, ki pa so na drobno razvejani. Usta, ki so edina odprtina, saj nimajo anusa, imajo nekako sredi trebuha<sup>71</sup>.

Imajo preprosto živčevje, razporejeno kot lestev in zgrajeno iz dveh živčnih snopov, ki potekata vzdolž trebušne strani telesa. Osrednji živčni vozli – možganski gangliji – se nahajajo v prednjem delu telesa in posredujejo informacije vzdolž lestvičastega živčevja proti zadnjemu delu telesa. Pri vrtinčarjih že lahko govorimo o zametkih možganov osrednjega živčnega sistema, katerega naloga je analiza podatkov, postal pa je tudi koordinacijsko središče telesa<sup>20</sup>.

Za učinkovito odzivanje na dražljaje iz okolja se uporabljajo specializirani receptorji, med katerimi je najpomembnejši sklop očesc v predelu glave<sup>67</sup>.

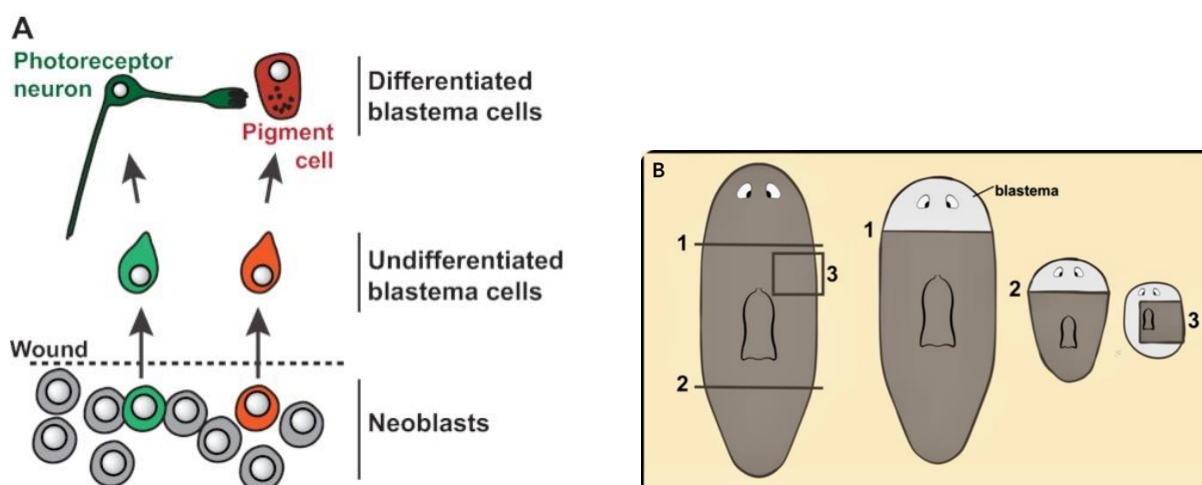
Planarije nimajo vidnega obtočnega (kardiovaskularnega) ali dihalnega sistema – zaradi ploščatega telesa lahko kisik sprejemajo preko difuzije skozi kožo<sup>45</sup>.



Slika 2: Ilustracija anatomije planarij<sup>1</sup>.

### 2.1.2 REGENERATIVNE SPOSOBNOSTI PLANARIJ

Regenerativne sposobnosti planarij so zgolj posledica visokega deleža (25–30 % vseh celic) pluripotentnih celic, imenovanih neoblasti. To so edina vrsta celic v telesu planarij, ki imajo zmožnost diferenciacije v katerokoli drugo vrsto celic. Regenerirajo lahko odstranjeno glavo, rep, eno stran telesa, ob razdelitvi telesa na več delov lahko celo zraste iz vsakega dela nov osebek. Regeneracija manjkajočega fragmenta telesa se začne z zaprtjem rane s krčenjem mišic v prvih 30–45 min po amputaciji. Neoblasti se nato začnejo hitro mitotično deliti v šestih urah po poškodbi (prvi vrh proliferacije neoblastov), čemur pa sledi migracija neoblastov proti rani v 18 urah po poškodbi. Drugi vrh v proliferaciji neoblastov se zgodi 48–72 ur po amputaciji, namnoženi neoblasti pa nato z diferenciacijo v tkivnospecifične progenitorske celice (to so še nediferencirane celice, ki se nato diferencirajo v tipe celic, ki tvorijo manjkajoče tkivo) tvorijo zaščitno maso novih celic, imenovano blastema<sup>27,48</sup>. Takšne povečave v proliferaciji so tesno usklajene s selektivnim uničenjem nekaterih starih celic (apoptoza) za učinkovito preoblikovanje – z avtofagijo (sestavine mrtvih celic se uporabijo za izdelavo novih) – novih in starejših tkiv v ustvaritev točno tistih tkiv, ki jih je planarija ob poškodbi izgubila<sup>48,14</sup>. Prilagodijo pa se tudi razmerja v velikosti med novonastalimi tkivi z že obstoječimi<sup>65,48</sup>. Skupaj s takšnim remodeliranjem tkiv in diferenciacijo celic, ki gradijo blastemo (torej progenitorske celice), je regeneracija končana<sup>77</sup>.



Slika 3: (A) Shematski prikaz diferenciacije neoblastov v progenitorske celice (na shemi poimenovane "undifferentiated blastema cells", ki se diferencirajo v določen tip celice)<sup>64</sup>.

Slika 4: (B) Tvorba blasteme po amputaciji različnih fragmentov telesa planarije<sup>65</sup>.

Regeneracija vključuje zapleteno interakcijo več sistemov na ravni organizma. Te interakcije so pod nadzorom raznih molekularnih signalnih poti, prehodov ionov in signalov živčnega sistema<sup>48</sup>.

### **2.1.2.1 VPLIV REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN NA REGENERACIJO**

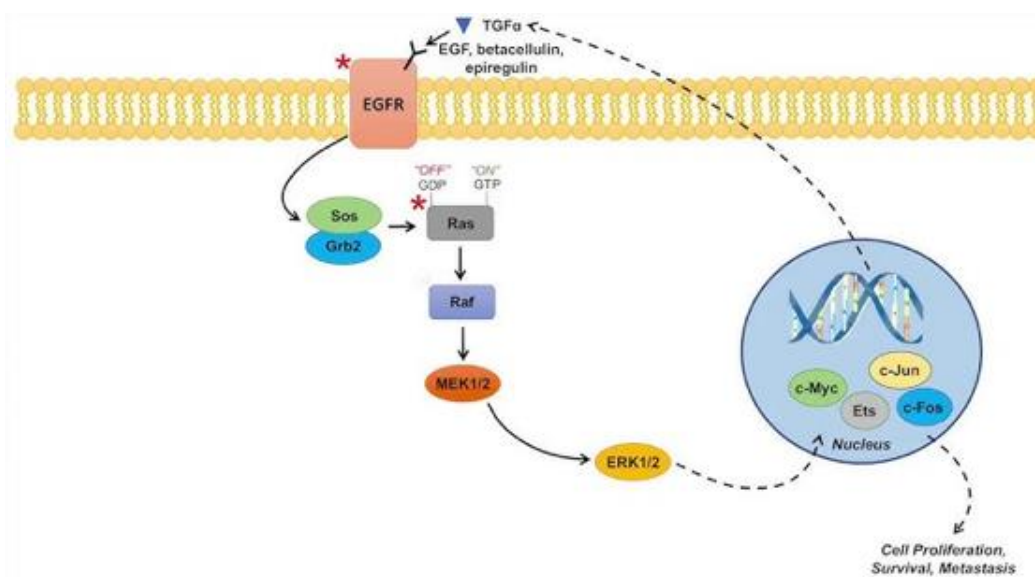
Med okoljske dejavnike, ki vplivajo na regeneracijo, lahko prištejemo temperaturo, gravitacijo in reaktivne kisikove spojine (ROS). Ta raziskava bo osredotočena samo na vpliv slednjih na regenerativnost planarij. Gre za visoko reaktivne stranske produkte celičnega metabolizma, ki vsebujejo kisik. Sprva so bile opredeljene kot povzročitelji oksidacijskega stresa in poškodb celic, zdaj pa je znano, da sodelujejo tudi kot pozitivni regulatorji celične signalizacije, kapacitete matičnih celic za samoobnovo in diferenciacijo ter signalizacije poškodb<sup>77</sup>. Namreč ob prevelikemu kopičenju reducentov ob hkratni nespremenjeni koncentraciji oksidantov se v celici poruši redoks ravnotežje (ravnovesje med produkcijo ROS in antioksidacijskimi sistemi), kar imenujemo redukcijski stres. Redoks reakcije so za normalno delovanje celic ključnega pomena, saj ustvarjajo energijo v obliki ATP (recimo pri prenašanju elektronov po notranji membrani v mitohondriju se sprošča energija, ki omogoča prenos protonov v medmembranski prostor mitohondrija za nastanek protonskega gradienta, kar povzroči pretok protonov skozi sintazo ATP, ki fosforilira ADP v ATP, poleg tega so tudi glavna gonilna sila za sintezo esencialnih celičnih komponent (npr. nukleinskih kislin). Posledice redukcijskega stresa lahko opazujemo na celični ravni kot manjšanje odziva celične rasti, zmanjšana funkcija mitohondrijev, znižanje aktivnosti metabolizma<sup>12</sup>. Med biološko pomembne ROS spadajo superoksidi ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikali ( $\bullet OH$ ) ter vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Slednji je tudi ena izmed glavnih signalnih molekul, deluje pa lahko tudi kot sekundarni obveščevalec, ki sodeluje pri regulaciji mnogih signalnih poteh<sup>77</sup>.

Mnoge raziskave opisujejo odločilen pomen ROS pri regeneraciji manjkajočih fragmentov. Raziskovalci so odkrili, da se po amputaciji količina ROS na mestu rane hitro drastično poveča. Razlog za to je povišana aktivacija encimov Nox (NADPH–oksidaza), ki sodelujejo pri produkciji ROS s tem, da na kisik vežejo elektrone iz NADPH<sup>4,35</sup>. Uporaba inhibitorjev Nox (kar povzroči zmanjšano produkcijo ROS) je zaznamovala zmanjšano velikost blasteme in neuspešno regeneracijo<sup>58</sup>.

Med ključnimi signalnimi potmi, sodelujočimi pri regeneraciji planarij, so v literaturi najpogosteje navedene MAPK(ERK), JAK/STAT in PI3K/Akt.

### 2.1.2.2 MAPK (ERK) SIGNALNA POT

Začetek regeneracije pri planarijah sprožijo različne signalne poti. Velikokrat je v literaturi kot najpomembnejša omenjena signalna pot MAPK (ERK), imenovana tudi Ras-Raf-MEK-ERK-signalna pot. Gre za verigo kinaznih encimov v celici, ki prenese signal iz receptorja na površini celice na DNA v njenem jedru (sino biological). Receptorji, ki navadno stimulirajo Ras-Raf-MEK-ERK-signalno kaskado, so RTK (tirozin receptorske kinaze), kot je EGFR-receptor (ang. epidermal growth factor receptor)<sup>50</sup>. Kinaze so encimi, ki iz ATP premestijo eno fosfatno skupino na tarčni protein (fosforilacija) in ga tako aktivirajo<sup>79</sup>. Tirozin kinazni encimi pa selektivno fosforilirajo tirozinske ostanke na substratnih molekulah<sup>54</sup>. Ob vezavi liganda, tj. signalna molekula, ki se veže na receptor, se na monomer receptorja (ena molekula receptorja) združita dve monomeri EGFR (dimerizirata). Nastanek takšnega dimera EGFR privede do avtofosforilacije šestih tirozinskih ostankov citoplazemskega dela EGFR vsake posamezne nasprotne molekule EGFR v dimeru, kar privede do popolne aktivacije receptorja. Na tako fosforilirane tirozinske ostanke (preko SH2 domene na proteinu, ki omogoča vezavo na tirozin) pa se lahko veže adapterska beljakovina, imenovana Grb2. Na Grb2 pa se lahko veže preko dveh domen SH3 SOS-protein, ki je zmožen aktivacije proteina Ras (in sicer tako, da v neaktivni obliki Ras beljakovine, na katero je vezan GDP, zamenja GDP z GTP – ker je v bistvu Ras monomerna G-beljakovina, za katere je značilna deaktivacija ob vezavi GDP in aktivacija ob vezavi GTP). Aktivirana Ras beljakovina nato aktivira Raf kinazo, Raf pa fosforilira in s tem aktivira MEK. MEK je tudi kinaza, katere tarčni protein pri fosforilaciji (in aktivaciji) je ERK. ERK (tj. z zunajceličnimi signali regulirana kinaza) spada v družino MAPK-beljakovin (to so z mitogenom aktivirane proteinske kinaze), ki sodelujejo v ključnih celičnih procesih, kot so proliferacija, diferenciacija, apoptoza in preživetje celic<sup>6,63,69</sup>. ERK nato sodeluje pri regulaciji mnogih transkripcijskih faktorjev, povezanih z geni za proteine, sodelujoče v regeneraciji; na primer protein ERK (natančneje ERK2) omogoča nastanek aktivacijskega proteina 1 (AP1) (z vezavo c-fos in c-Jun proteinov v transkripcijski faktor AP1) ki je transkripcijski faktor za razne gene, ki so vključeni pri regulaciji diferenciacije, proliferacije in apoptoze<sup>22,33</sup>.



Slika 5: MAPK (ERK) signalna pot<sup>40</sup>.

### 2.1.2.3 VPLIV ROS NA MAPK (ERK) KASKADO

V raziskavah je bilo ugotovljeno, da ROS, ki se sprostijo ob amputaciji, lahko med drugim inducirajo regeneracijo preko EGFR-MAPK (ERK) signalnih poti, kar stimulira izražanje genov za proteine, ki so ključnega pomena za napredovanje regeneracije, na primer aktivnost ERK-beljakovine je bila potrebna za začetek diferenciacije progenitorskih celic v blastemi<sup>75</sup>. Med najpomembnejšimi ugotovitvami glede vpliva ROS na MAPK (ERK) signalne kaskade lahko uvrstimo naslednje.

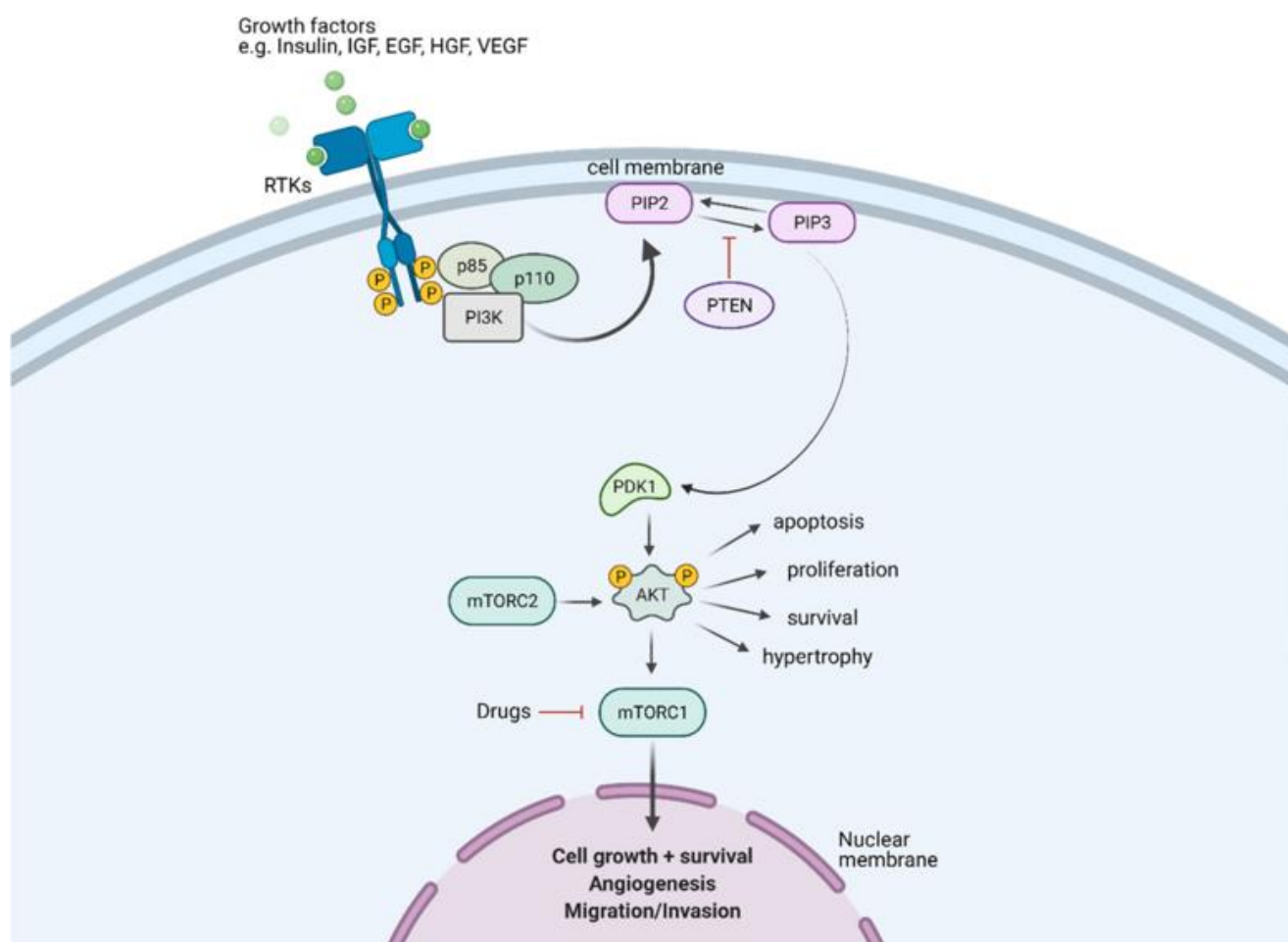
- Z inhibicijo MEK je bila regeneracija neuspešna. Ob nadaljnji namerni poškodbi takšne planarije, katere namen je bil sprožitev ROS, so se planarijam ponovno vrnile regenerativne sposobnosti, kar nakazuje na to, da so ROS prvi sprožilci začetka regeneracije in ponovno aktivirajo regeneracijski program.
- ROS so potrebni za fosforilacijo in tako pravilno aktivacijo ERK proteina.
- Predlagano je, da je aktivacija ERK preko ROS posredovana preko EGFR med regeneracijo.

Razlogov za takšne ugotovitve je več. Znano je, da so aktivacijski mehanizmi, povezani z RTK, pod strogo redoks kontrolo (torej ROS vplivajo nanje). ROS olajšajo avtofosforilacijo EGFR dimera, kar posledično poveča hitrost nadaljnje kaskade fosforilacije spodnjih (odvisnih) elementov v signalni poti, kot je tudi ERK-protein, in posledično povečanje njihove sinteze. Poleg EGFR receptorja so tudi MAP3K (kot je recimo Raf) kritične tarče oksidativnega stresa. Mnogo raziskav dokazuje takšno povezavo s povečano aktivacijo MAPK (kot je ERK) po dodatku eksogenega (z zunanjim izvorom) vodikovega peroksida med planarije, kar nakazuje na nekakšno ROS-odvisno povečavo aktivacije MAP3K encimov<sup>37</sup>. Prav tako ROS tudi povečujejo aktivnost EGFR z oksidacijo cisteinskih ostankov na receptorju, kar spet privede do povečane izdelave encimov pomembnih pri regulaciji regeneracije<sup>10,26</sup>, kar je morda povezano z olajšano avtofosforilacijo EGFR.

V grobem lahko povzamemo, da ROS vplivajo na razne beljakovine v MAPK(ERK) signalni poti, kar posredno vpliva na izražanje genov, ki kodirajo za beljakovine ključnega pomena pri regeneraciji.

#### 2.1.2.4 PI3K/Akt SIGNALNA POT

Stimulacija EGFR z vezavo signalnih molekul na receptor (v tem primeru razni rastni faktorji) pa lahko aktivira tudi PI3K-encim (fosfoinozitol-3 kinaza), ki pa je odgovoren za sprožitev Akt/mTor signalne kaskade, katere končni produkti so različni encimi, sodelujoči v pospeševanju regeneriranja manjkajočih delov<sup>23,84</sup>. Na fosforilirane tirozinske ostanke aktiviranega dimera EGFR se lahko veže podenota PI3K encima, imenovana p85, katere funkcija je, da omogoča vezavo p110 podenote PI3K encima, ki ima katalizno funkcijo – in sicer p110 fosforilira PIP2 (fosfatidilinozitol-(4,5)-bifosfat) v PIP3 (fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat), ta pa poveča prisotnost Akt (protein-serin/treonin kinaza) ob plazemski membrani celice, kjer jo fosforilirajo in posledično aktivirajo razni kinazni encimi<sup>30,34</sup>. Aktiviran Akt pa je nato zmožen aktivacije različnih encimov, kot je mTOR-protein, odgovornih za kontroliranje transkripcije in sinteze takšnih beljakovin, ki sodelujejo pri regulaciji proliferacije, diferenciacije, celične rasti in zaviranju apoptoze (programirana celična smrt)<sup>23,84</sup>.

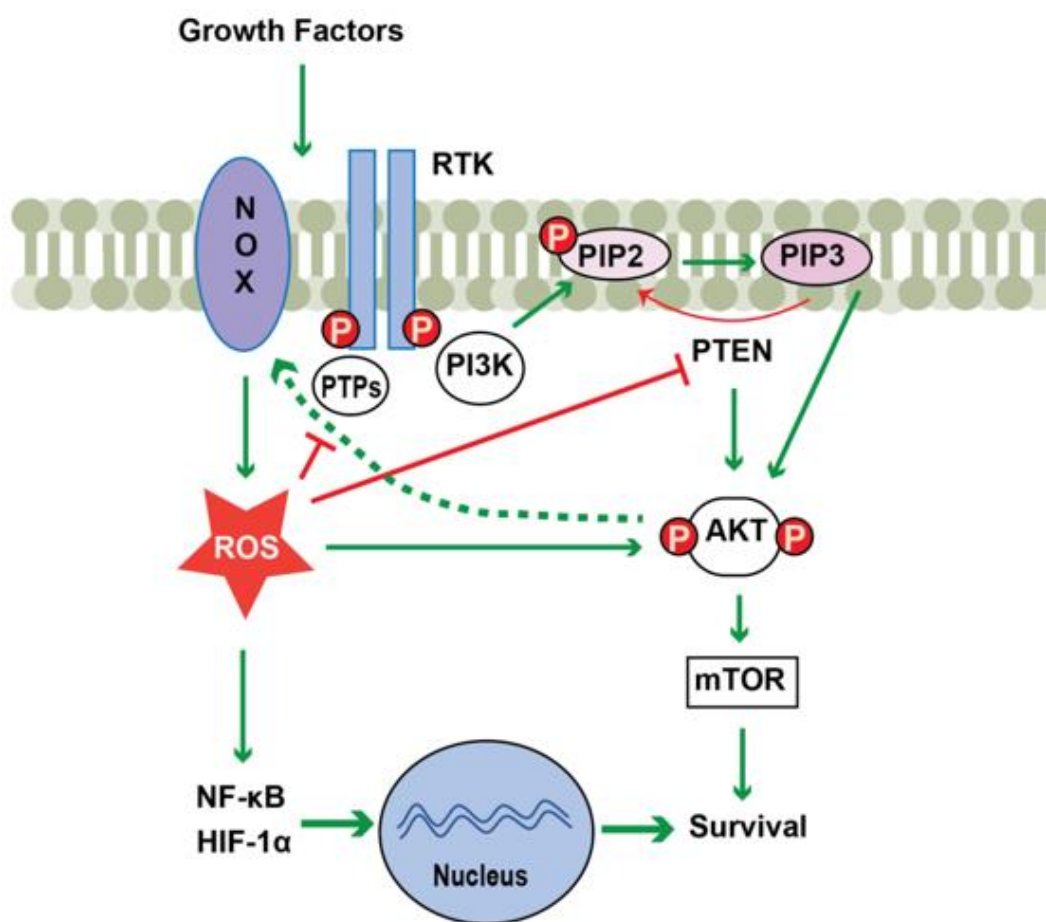


Slika 6: PI3K/Akt signalna pot<sup>19</sup>.

### 2.1.2.5 VPLIV ROS NA PI3K/Akt KASKADO

Povišane koncentracije ROS povečujejo aktivacijo PI3K/Akt signalne poti zlasti preko oksidacije fosfataz, kot je PTEN (negativni regulator PI3K encima), s čimer inhibirajo njihovo delovanje ali preko direktne aktivacije Akt.

ROS spodbuja hiperfosforilacijo (povečano fosforilacijo) PI3K-proteina in s tem njegovo aktivacijo, kar posledično povečuje tudi aktivnost Akt. Poleg tega lahko ROS uravnavajo PI3K/Akt signalizacijo preko regulacije protein tirozin fosfataz (PTP), ki inhibirajo RTK receptorje z defosforilacijo (in s tem deaktivirajo RTK). ROS so zmožne zmanjšati aktivnost PTP, tako da oksidirajo cisteinski ostanek na katalitski domeni (nekakšna funkcionalna enota proteina, kjer se odvijajo katalitske reakcije) PTP, kar je ravno nasprotno pri oksidaciji cisteinskih ostankov EGFR preko ROS, kar povečuje njegovo aktivnost)<sup>29,44</sup>.



Slika 7: Vpliv ROS na PI3K/Akt signalno pot<sup>3</sup>.

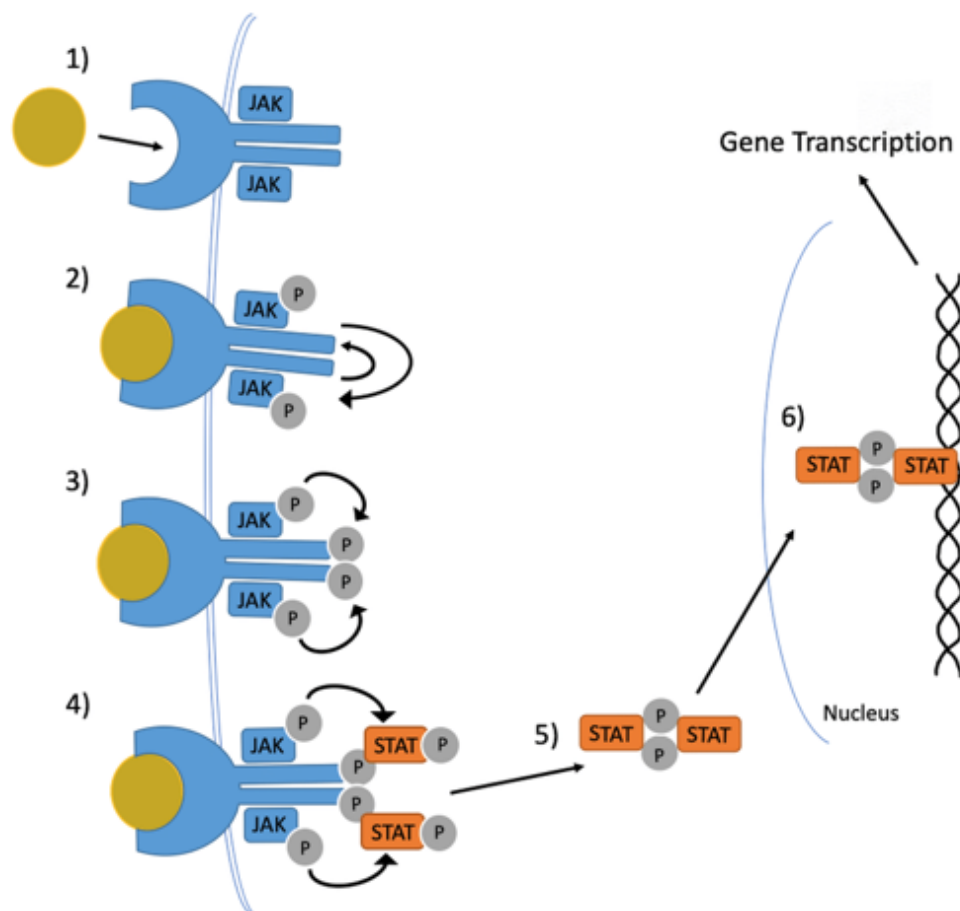
Legenda: Nox (NADPH–oksidaza) (encimi, ki sodelujejo pri produkciji ROS s tem, da na kisik vežejo elektrone iz NADPH)<sup>35</sup>; rdeča puščica s pravokotnim koncem predstavlja zaviranje, rdeča puščica nad PTEN predstavlja defosforilacijo PIP3; zelena puščica in zelena črtasta puščica predstavljata aktivacijo; P v rdečem krogu predstavlja fosforilacijo. ROS inducirajo tudi translokacijo NF-κB in HIF-1 transkripcijskih faktorjev, ki med drugim vplivajo tudi na izražanje genov za beljakovine, odgovorne za preživetje, proliferacijo in diferenciacijo<sup>3,28</sup>.

### 2.1.2.6 JAK/STAT SIGNALNA POT

Raziskave na področju regeneracije planarij tudi omenjajo pomembno vlogo proteinov, kot je hsp70 (protein toplotnega šoka 70). Signalizacija za to beljakovino med drugimi poteka tudi preko JAK/STAT-signalnih poti.

Na splošno JAK/STAT-signalne poti prenašajo informacije iz zunajceličnih kemičnih signalov za regulacijo rasti, preživetja in povečanja diferenciacije in proliferacije<sup>38,61</sup>.

JAK/STAT-signalno pot sestavljajo tri glavne komponente: receptor na površini celice – najpogosteje citokinski receptor, ki za razliko od RTK (kot je EGFR) nima tirozin-kinazne aktivnosti, temveč je na njegovem citoplazemskem (znotrajceličnem) delu povezan z JAK (Janusova kinaza), ki pa je nereceptorska tirozin kinaza, torej ima lastnosti tirozin kinaznih encimov (fosforilacija tirozinskih ostankov tarčnih proteinov)<sup>32,51,70</sup>. Vezava liganda na receptorsko molekulo omogoči, da dve JAK fosforilirata druga drugo (transfosforilacija) in se tako aktivirata. Aktivirani JAK molekuli nato fosforilirata rep receptorja, kar omogoči vezavo STAT (signalni prevodnik in aktivator transkripcije – to so transkripcijski faktorji za razne gene) beljakovin, ki ju fosforilirata (in aktivirata) aktivirani JAK molekuli. Nato se fosforilirani STAT molekuli odcepita od receptorja in dimerizirata. STAT dimer nato potuje (se translocira) v jedro, kjer regulira transkripcijo genov<sup>47</sup>.



Slika 8: JAK/STAT signalna pot<sup>47</sup>.

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

Znano je, da so hsp70 transaktivirani (aktivacija transkripcije gena s transkripcijskimi faktorji) s STAT, kar pomeni, da STAT posredno povečujejo sintezo hsp70 in s tem regeneracijo.

#### **2.1.2.7 VPLIV ROS NA JAK/STAT KASKADO**

Vodikov peroksid spodbuja aktivacijo JAK2 in TYK2 (to sta člana družine Junosovih kinaz), s pospešitvijo fosforilacije na tirozinska mesta na aktivacijski zanki teh encimov (polipeptidna veriga na kinaznih beljakovinah, kot je JAK2, kjer je za aktivacijo takšne beljakovine potrebna vezava fosfatne skupine na to mesto)<sup>2,8,49</sup>. Poleg pospeševanja aktivacije JAK encimov H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tudi pospeši vezavo fosfatnih skupin na tirozinske ostanke na STAT, prav tako pa je s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> povečana tudi premestitev STAT-dimerov v jedro (jedrna translokacija), kjer se bodo na DNK vezali na specifične promotorje za določen gen, kot je recimo gen za sintezo hsp70. Raziskave pa dokazujejo tudi, da je bila aktivnost promotorja z vezavnim mestom za STAT- za gen za hsp70 povečana ob prisotnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>49</sup>. Vsi ti vplivi ROS potemtakem prispevajo k povišani sintezi beljakovin, kot je hsp70, ki povečujejo proliferacijo in diferenciacijo ter s tem regeneracijo.

#### **2.1.2.8 POVEZAVE MED MAPK (ERK), PI3K/Akt IN JAK/STAT SIGNALNIMI POTMI**

Vse obravnavane signalne poti, na katere imajo ROS vpliv in so povezane z napredovanjem regeneracije, se močno prepletajo.

Za JAK/STAT-signalne poti je najbolj značilna je povezava z MAPK(ERK) signalno kaskado. Povezava med dvema je kompleksna, druga na drugo vplivata na različnih mestih.

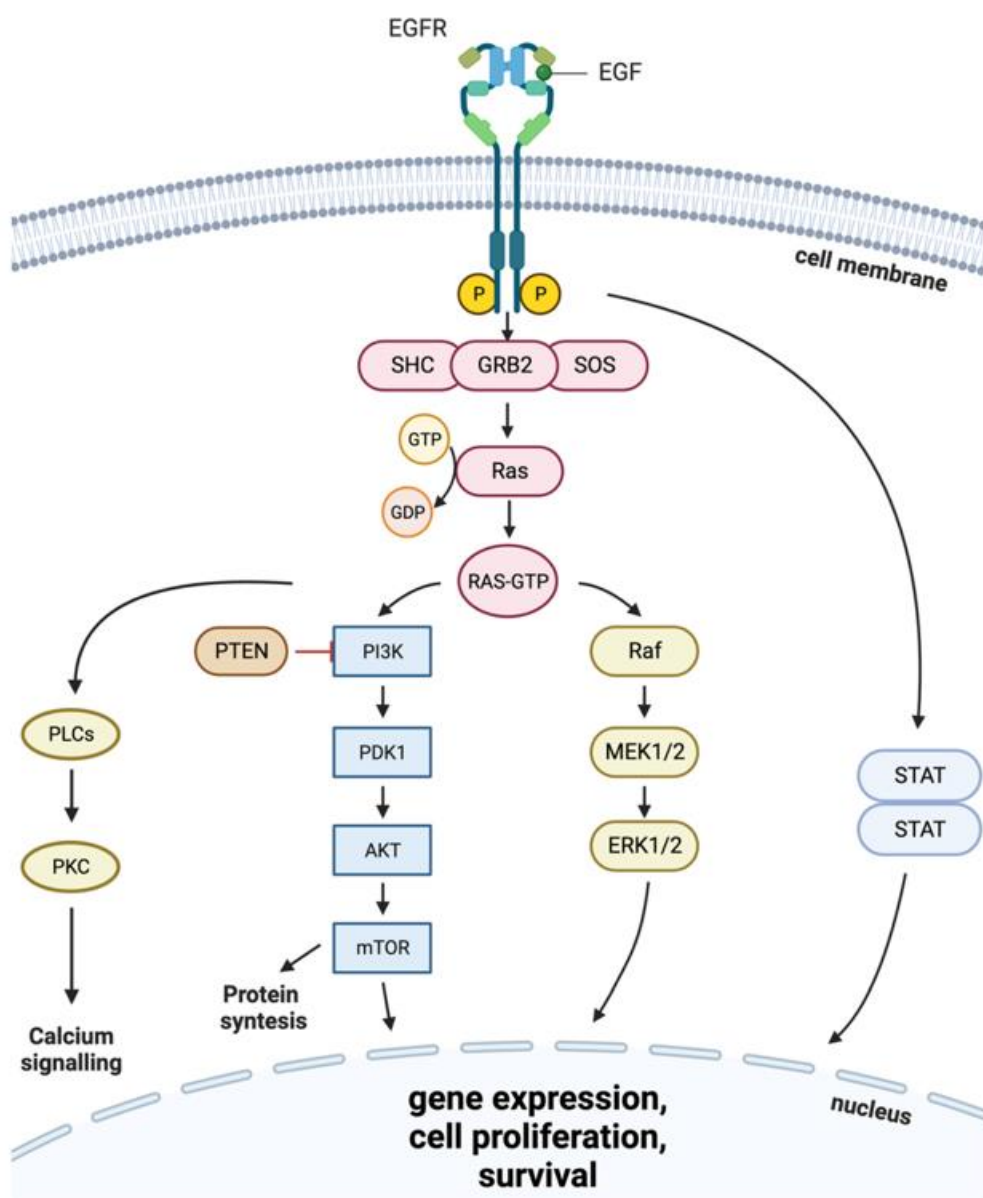
- Izgleda, da imajo PI3K/Akt, MAPK (ERK) in JAK/STAT povezavo z RTK. Poleg že omenjenih aktivacij PI3K/AKT in MAPK (ERK) signalnih kaskad s strani EGFR aktivacija EGFR lahko tudi povzroči fosforilacijo tirozinskih ostankov na STAT, neodvisno od JAK (najverjetneje posredno, preko drugih z EGFR-povezanih encimov)<sup>39</sup>.
- Dodatno lahko EGFR rekruiira STAT-JAK-kompleks – skupaj združi STAT- in JAK-molekule, kar sproži, da jih JAK aktivira<sup>5</sup>.
- Aktivirani JAK lahko s fosforilacijo receptorjev, s katerimi so povezani, omogočajo vezavo določenih adapterskih proteinov, kamor se lahko veže GRB2-adapter, nanj pa SOS, ki aktivira Ras kaskado (in s tem sintezo ERK).
- JAK/STAT-signalizacija tudi posredno spodbuja Ras signalizacijo preko transkripcijske aktivacije SOCS3 (ang. suppressor of cytokine signaling 3), katere funkcija je regulacija JAK/STAT z negativno povratno zanko<sup>82</sup>. SOCS3 pa vežejo tudi RasGAP (molekula, ki negativno regulira Ras signalizacijo) in tako zmanjšujejo njeno aktivnost, kar posledično povečuje aktivnost Ras signalne poti. Iz tega lahko sklepamo, da tudi ko je aktivnost JAK/STAT povratno negativno regulirana s strani SOCS3, slednja molekula povečuje aktivnost Ras in s tem prav tako MAPK (ERK)<sup>39</sup>.
- Vemo, da je Ras ključnega pomena pri nadaljnji sintezi ERK, dokazana pa je tudi direktna aktivacija PI3K kinaze preko aktivirane Ras beljakovine<sup>17</sup>.

- Omenil sem že regulacijo izražanja gena za hsp70 protein v odvisnosti od JAK/STAT signalizacije. Tudi PI3K/Akt signalna pot inducira izražanje gena za hsp70<sup>42</sup>.

Poudarimo lahko še povezanost MAPK (ERK) in JAK/STAT signalnih kaskad.

- MAPK ima zmožnost drastičnega povečanja transkripcijske aktivnosti STAT preko fosforilacije na serin v molekuli STAT, ki poveča vezanje STAT na promotorje na DNK<sup>73</sup>. Serinska fosforilacija z MAPK sicer ni nujna za transkripcijsko aktivacijo STAT, jo pa dramatično izboljša<sup>39</sup>.

Na podlagi vseh naštetih povezav lahko sklepamo, da je lahko z vplivom ROS na en člen v določeni signalni poti posredovan tudi vpliv na ostale signalne poti, sodelujoče v regeneraciji.



Slika 9: Povezave med MAPK (ERK), PI3K/Akt in JAK/STAT signalnimi potmi<sup>85</sup>.

## 2.2 UČINKOVINE VODNIH EKSTRAKTOV POSAMEZNIH RASTLINSKIH VRST

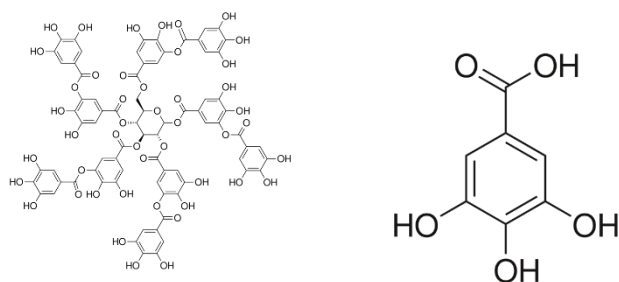
V nadaljevanju bomo za vsako rastlinsko vrsto, uporabljeno v raziskovanju, navedli celotno vsebino polifenolov (TPC), ki so med najpomembnejšimi bioaktivnimi učinkovinami v rastlinskem materialu. TPC je izražen kot masa ekvivalenta galne kisline / masa ekstrakta (GAE mg/g). Višji kot je, višji je tudi delež polifenolov v ekstraktu. Primerjali bomo TPC posameznih rastlin glede na njihov etanolski ekstrakt, saj ni pri vseh podatkih o TPC v vodnih ekstraktih<sup>41</sup>. Poleg tega pa bomo opisali tudi antioksidantne lastnosti posameznih ekstraktov, saj smo z ugotavljanjem možnih razlogov, zakaj vodni ekstrakti izbranih rastlinskih vrst vplivajo na regeneracijo planarij glede na pomembnost ROS pri regeneraciji, prišli do sklepa, da je razlog verjetno v antioksidantnih lastnostih ekstraktov. Antioksidanti so splošen izraz za katerokoli snov, ki lahko deluje proti ROS, tako da jim odda svoje elektrone (jih reducira – kar prepreči, da bi ROS odvzele elektrone od molekul, pomembnejših za zdravje celic)<sup>76</sup>. Antioksidantna aktivnost je navadno izražena z IC(50), tj. koncentracija, potrebna za 50 % inhibicijo določenega prostega radikala (tukaj bomo obravnavali IC(50) za DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ki se uporablja kot model za ROS<sup>53</sup>. Torej, manjša kot je vrednost IC(50) snovi, višje antioksidantne lastnosti ima ta snov<sup>46</sup>.

**Tabela 1: Intenziteta antioksidantne aktivnosti ekstrakta, glede na IC(50) vrednost<sup>53</sup>.**

IC(50) ekstrakta za DPPH <sup>•</sup>	Intenziteta antioksidantne aktivnosti ekstrakta
< 50 mg/L	zelo močna
50–100 mg/L	močna
100–250 mg/L	zmerna
250–500 mg/L	šibka

### 2.2.1 ŠIŠKE PUHASTEGA HRASTA (*Quercus pubescens*)

Šiške so bolezenske tvorbe na nekaterih rastlinah, nastale zaradi vboda žuželke, delovanja gliv in drugih organizmov<sup>72</sup>. Znale so predvsem po visoki vsebnosti predvsem podrazredov polifenolnih spojin z visoko antioksidantno aktivnostjo, kot so flavonoidi, galotanini in fenolne kisline (najbolj taninska in galna kislina)<sup>9,31</sup>. Vrednosti TPC za hrastove šiške so okoli 437,27 ± 3,14 mg/g GAE etanolskega ekstrakta<sup>7</sup>. Za etanolske ekstrakte hrastovih šišek (za vrsto hrasta iz rodu *Quercus*) so v raziskavah ugotovili, da znaša 0,5 mg/L za prosti radikal (DPPH<sup>•</sup>). Takšna vrednost je precej nizka, kar pomeni, da ima ekstrakt šišek zelo močno antioksidantno aktivnost. V isti raziskavi so slednjo pripisali vsaj delno kot posledico visoke vsebnosti taninske kisline (19,925 % ekstrakta) in galne kisline (8,75 %)<sup>42</sup>.



**Slika 10: Skeletne formule taninske (levo) in galne kisline (desno)<sup>81</sup>.**

## 2.2.2 STORŽKI ČRNE JELŠE (*Alnus glutinosa*)

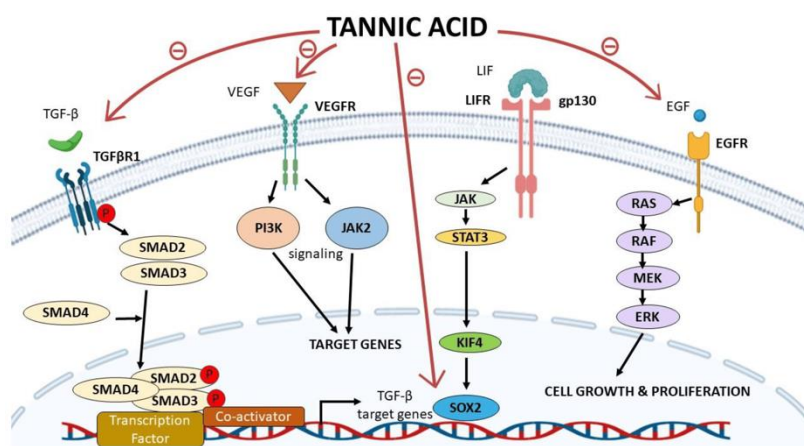
Zreli plodovi (storžki) črne jelše in njeno lubje imajo visok delež taninov<sup>25</sup>. Poleg taninov so med antioksidantnimi učinkovinami, ki jih najdemo v črni jelši, tudi terpenoidi, flavonoidi, fenolne kisline, zelo pa so značilni še diaril heptanoidi. Vsebnost taninske kisline znaša 16–20 %, kar je podobno kot pri hrastovi šiški<sup>52</sup>. Etanolski ekstrakt TPC znaša približno 610 mg/g GAE,  $172,73 \pm 3,14$  mg/g več kot pri hrastovih šisках. Zanimivo pa je, da IC(50) od ekstraktov črne jelše v organskih topilih za DPPH<sup>•</sup> variira 4,05–9,58 mg/L, kar je 8,1–19,16 več od hrastovih šisček<sup>46</sup>. Vseeno gre za zelo močno antioksidantno aktivnost teh ekstraktov.

## 2.2.3 LISTJE NAVADNE BUKVE (*Fagus sylvatica*)

Med učinkovinami v listju navadne bukve se znajdejo galna, abscizinska (ki je tudi rastni hormon) in cimetova kislina, poleg kislin pa so prisotni tudi mnogi flavonoidi. TPC etanolskega ekstrakta listja navadne bukve znaša  $69,64 \pm 3,1$  mg/g GAE ekstrakta. To je znatno manj kot TPC etanolskih ekstraktov hrastovih šisček in storžkov črne jelše. IC(50) za listje navadne bukve znaša okoli 125,5 mg/mL, upoštevati pa moramo tudi možnosti za variabilnost v teh vrednostih (enako kot pri že omenjenih za ostale rastlinske vrste), saj nanje vpliva mnogo okoljskih dejavnikov<sup>86</sup>. Posledično lahko opredelimo ekstrakt listja bukve kot zmerno intenzivno antioksidantno sredstvo.

## 2.2.4 VPLIV ANTIOKSIDANTOV NA REGENERACIJO

Če povežemo dejstva o močnih antioksidantih, kot je taninska kislina, z dejstvi o signalnih poteh, sodelujočih v regeneraciji (JAK/STAT, EGFR/MAPK (ERK) in PI3K/Akt), opazimo zmanjšanje v njihovi aktivnosti. Glede na že spoznana dejstva o vplivu ROS na te signalne poti lahko sklepamo, da z redukcijo ROS in njihovo “deaktivacijo” taninska kislina in drugi antioksidanti, prisotni v ekstraktih omenjenih rastlin, posredno vplivajo na regeneracijo. Moramo pa tudi vedeti, da taninska kislina zatira razne beljakovine, ključne pri teh signalnih poteh, tako da lahko denaturira ali povzroči obarjanje raznih beljakovin (in s tem njihovo inhibicijo) z ustvarjanjem vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami na kislini in peptidnimi vezmi na beljakovini<sup>80</sup>.



Slika 11: Vpliv taninske kisline na nekatere signalne poti. Rdeča puščica z minusom prikazuje negativno regulacijo, črna pa aktivacijo<sup>83</sup>.

### 3 METODE DELA

#### 3.1 TESTNI ORGANIZMI

Za testne organizme smo uporabili planarije vrste črna mnogooka (*Polycelis nigra*), saj je plenilska vrsta in ima podobno fiziologijo ostalih plenilskih vrst planarij, ki se lahko znajdejo v našem akvariju in predstavljajo grožnjo manjšim akvarijskim živalim. Nabrali smo po velikosti čim bolj enake planarije v bližnjem potoku v Črnovi in jih aklimatizirali na sobne pogoje. Za raziskavo smo zbrali okoli 60 osebkov.

Za mnogooke (rod *Polycelis*) je značilno, da imajo po nekaj deset očesc, razporejenih ob robu, na sprednjem delu telesa (Sket s sod., 2003). Črna mnogooka se od ostalih mnogook razlikuje po črni do rjavi barvi telesa, ki je na prsni in hrbtne telesa enakomerno pigmentirana. Povprečna velikost *P. nigra* je 8 mm, iztegljivo žrelo pa je malo večje od polovične velikosti telesa (Lejla Knezović s sod., 2015)

##### 3.1.1 GOJENJE PLANARIJ

Enakomerno smo jih razporedili v dve posodi s svežo izvirsko vodo po 750 mL, ki je vsebovala esencialne minerale za planarije in je imela temperaturo 19–23 °C. Dvakrat tedensko smo v posodo s planariji vstavili majhen kos trdo kuhanega rumenjaka in planarijam pustili tri ure prehranjevanja z rumenjacom. Po hranjenju smo rumenjaka odstranili ter staro vodo zamenjali s svežo. Ker planarije izločajo sluz za lažje premikanje in za boljši stik s podlago<sup>13</sup>, smo vsaj enkrat tedensko planarije prestavili v drugo posodo volumna 750 mL, s prejšnje pa smo očistili vso nabrano sluz.



Slika 12: Po dodatku hrane v akvarij, postanejo planarije zelo aktivne (Foto: J. A. Sever).

### 3.2 VODNI EKSTRAKTI

Pripravili smo vodne ekstrakte treh različnih rastlinskih vrst, in sicer iz črne jelše (*Alnus glutinosa*), navadne bukve (*Fagus sylvatica*) ter puhastega hrasta (*Quercus pubescens*). Za izdelavo ekstrakta črne jelše smo uporabili njene storžke, od navadne bukve listje, za izdelavo vodnega ekstrakta puhastega hrasta pa šiške.

#### 3.2.1 DOBAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Storžke črne jelše smo kupili v trgovine za akvaristiko (INVITAL). Proti koncu oktobra 2024 pa smo v bližnjem gozdu v Črnovi nabrali odpadlo, že v celoti rjavo listje navadne bukve, ter zrele šiške (suhe in rjavkaste barve) iz listnih ploskev mladega puhastega hrasta.

Pridobljen rastlinski material smo umili s hladno vodo in ga nato pustili sušiti na zraku sobne temperature.



Slika 13: Uporabljen rastlinski material (levo so šiške puhastega hrasta, na sredini storžki črne jelše, desno pa je listje navadne bukve) (Foto: J. A. Sever).

#### 3.2.2 PRIPRAVA EKSTRAKTOV

Metodologijo za ekstrakcijo bioaktivnih snovi iz rastlinskega materiala z destilirano vodo smo prevzeli (z manjšimi modifikacijami) iz raziskave z naslovom “*Antioxidant Activity of Different Extracts from Black Alder (*Alnus glutinosa*) Bark with Greener Extraction Alternative*”. V raziskavi so dokazali, da lahko s posebnim postopkom pridobimo do 90 % vseh ekstraktivov iz rastlinskega materiala, kakor če bi opravljali ekstrakcijo z organskimi topili (ki so izredno učinkoviti pri pridobivanju učinkovin iz rastlin). Opisana metoda naj bi omogočila maksimalen izkoristek ekstrakcije in vrednost TPC.

3,56 g zdrobljenega posameznega rastlinskega materiala smo kuhali v 5,3-minutnem intervalu v 30 mL deionizirane vode, predhodno segrete na temperaturno območje med 93 in 95 °C. Po intervalu smo precedili čim več ekstrakta, isti rastlinski material pa smo ponovno dali kuhati v novih 30 mL predhodno segrete deionizirane vode. Postopek smo ponovili trikrat (trije intervali kuhanja po 5,3 min, vsakič v novih 30 mL segrete deionizirane vode).

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025



Slika 14: Vodna ekstrakcija (tehtanje, predhodno segrevanje deionizirane vode, kuhanje) (Foto: J. A. Sever).

### 3.2.3 IZRAČUN KONCENTRACIJE PRIDOBLJENIH VODNIH EKSTRAKTOV

Skupna poraba deionizirane vode za posamezen rastlinski material je bila 90 mL, masa rastlinskega materiala pa 3,56 g. Preden lahko izračunamo masne koncentracije (masa porabljenega rastlinskega materiala/prostornino ekstrakta), moramo upoštevati prostornino deionizirane vode, ki je izhlapela med segrevanjem na omenjeno temperaturno območje (93–95 °C) in ob vztrajanju na tem temperaturnem območju za 5,3-minutni interval. Sprememba prostornine je znašala 4,5 mL. Zaradi trikratne ponovitve ekstrakcije je torej skupno izhlapelo 13,5 mL vode, prostornina dejanske deionizirane vode v ekstraktu znaša 76,5 mL. Glede na to, da smo iz ekstraktov izželi skoraj ves ekstrakt po vsakem intervalu in je v rastlinskem materialu ostala zanemarljiva količina deionizirane vode, lahko predpostavimo, da je bila prostornina ekstrakta enaka prostornini deionizirane vode po končani ekstrakciji (76,5 mL).

Iz teh podatkov lahko izračunamo masno koncentracijo po naslednji enačbi:

$$\gamma(\text{ekstrakt}) = \frac{m(\text{uporabljen rastlinski material})}{V(\text{ekstrakt})}$$

Masna koncentracija posameznih vodnih ekstraktov je znašala ~46,54 mg/mL. Tako koncentrirane vodne ekstrakte smo nato v vialah skladiščili v zamrzovalniku pri -19 °C. S tem smo zagotovili maksimalno svežino in kakovost ekstraktov, ki smo jih lahko nato uporabljali med raziskovanjem, hkrati pa smo lahko koncentrirane ekstrakte razredčili po želji, kadarkoli je bilo to potrebno. Zelo pomembno je, da so bili vsi posamezni ekstrakti, ki smo jih uporabljali med raziskovanjem, enaki, saj samo tako lahko verodostojno pridobivamo podatke o njihovi učinkovitosti.

### 3.2.4 METODA OCENJEVANJA UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV

Glede na visoko uporabnost regeneracije pri hitrem porastu populacije planarij z nespolnim razmnoževanjem smo se odločili ocenjevati učinkovitost posameznih vodnih ekstraktov preko opazovanja njihovega vpliva na regeneriranje amputiranega dela telesa planarije (oslabitev regeneracijskih sposobnosti planarij vpliva negativno na njihovo nespolno razmnoževanje). Poleg tega bi planarije z oslavitvijo regeneracije postale ranljivejše, saj se v primeru poškodb ne bi hitro zacelile ali regenerirale poškodovanega tkiva.

#### 3.2.4.1 IZBIRA KONCENTRACIJ VODNIH EKSTRAKTOV

Preden smo lahko začeli z eksperimentiranjem, smo morali določiti uporabo takšne koncentracije vodnih ekstraktov, ki je na meji s koncentracijo vodnega ekstrakta, pri kateri osebki že poginejo. Pri tem predeksperimentu smo uporabili vodni ekstrakt črne jelše s hipotezo, da ima največji vpliv na planarije zaradi najvišjega deleža polifenolnih snovi (TPC). Posamezne koncentracije smo pripravili z redčenjem koncentriranih vodnih ekstraktov (46,56 g/mL). Redčenje smo opravili tako, da smo v 50 mL merilno bučko dodali potrebno prostornino koncentriranega ekstrakta, izračunano po naslednji formuli:

$$V(\text{konc. ekstrakt}) = 50 \times \frac{(\text{želena koncentracija})}{46,54}$$

Po dodatku izračunane prostornine smo v merilno bučko do oznake dolili izvirsko vodo.

S polnilno pipeto smo nato predstavili 15 mL določene koncentracije v epruvete. Najprej smo testirali vpliv 4 različnih koncentracij (2,00; 4,00; 6,00 in 8,00 mg/mL). Preživel je samo osebek v ekstraktu koncentracije 2,00 mg/mL. S tem smo predvideli, kolikšne koncentracije planarije še prenesejo. Za natančnejšo določitev maksimalne meje smo testirali še vpliv šestih različnih koncentracij (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,10 in 2,25 mg/mL). Pri tem eksperimentu smo za vsako koncentracijo uporabili dva osebka. Po desetih dneh opazovanja so preživeli vsi osebki, razen tistih v ekstraktu s koncentracijo 2,25 mg/mL).

Glede na omenjene ugotovitve smo se odločili testirati vpliv dveh koncentracij vodnih ekstraktov, in sicer 1,75 mg/mL ter 2,1 mg/mL.

Za pripravo 50 mL ekstraktov s koncentracijo 1,75 mg/mL smo uporabili 1,88 mL koncentriranega ekstrakta, za pripravo 50 mL ekstraktov s koncentracijo 2,10 mg/mL pa 2,26 mL.

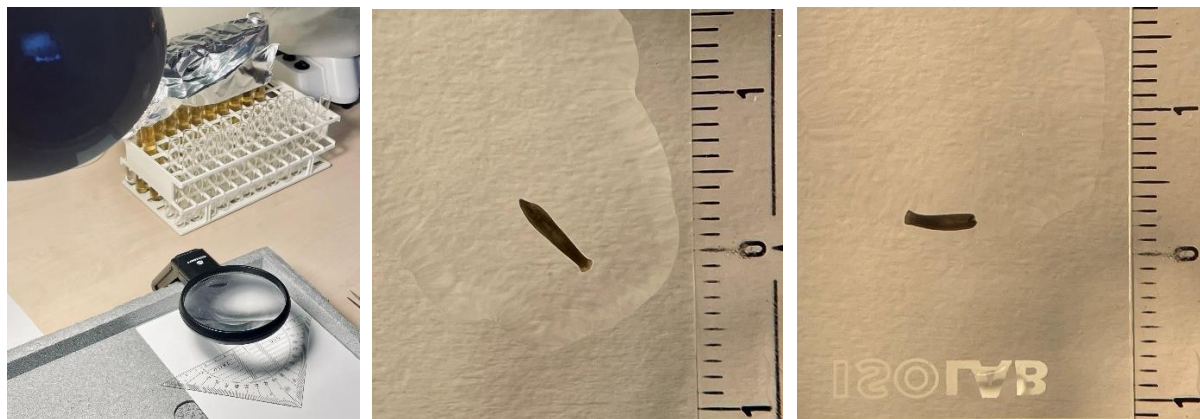


Slika 15: Redčenje in priprava koncentracij vodnih ekstraktov (Foto: J. A. Sever).

#### 3.2.4.2 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV

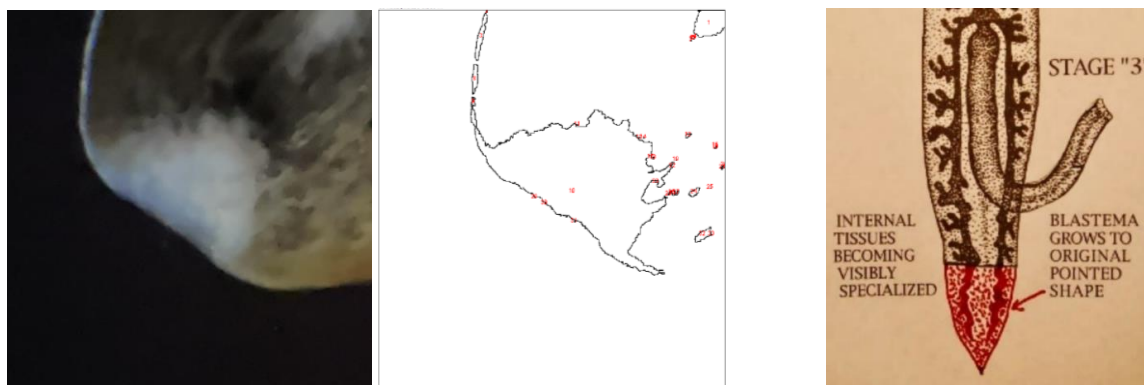
V eksperimentu ocenjevanja vpliva vodnih ekstraktov na regeneracijo so bili za vsako koncentracijo posameznega ekstrakta uporabljeni trije osebk planarij za pravilnejše rezultate. Tri osebk smo tudi prenesli v kontrolni medij (izvirna voda), ki je koristil pri primerjavi učinkovitosti ekstraktov. Skupno smo za ta eksperiment uporabili 21 osebkov *P. nigra*. Izbrali smo zdrave (ješče in aktivne) osebk približno enake velikosti, ki so bili stradani vsaj sedem dni pred eksperimentom (da bi preprečili spreminjanje parametrov s presnovnimi odpadki v raztopini, v kateri so nameščeni). Posamezne osebk smo nato poimenovali in pred amputacijo fotografirali, njihova dorzalna (hrbta) površina pa je bila izmerjena s pomočjo računalniškega orodja ImageJ. Planarije smo počasi ohladili na 4 °C (za upočasnitev njihovega gibanja, kar pripomore k natančnejši in lažji amputaciji repa), prav tako pa so bili enako ohlajeni tudi vsi pripomočki (kapalka, predmetna stekla, skalpel in epruvete z ekstrakti), ki smo jih uporabili pri amputaciji repa osebkov. Planarije smo prenesli na predmetno steklo, pod katerim je bil vir svetlobe – za lažjo vidljivost iztegljivega požiralnika planarij, kar je koristilo pri zarezi planarije tik za iztegljivim požiralnikom, saj sta se ločila rep in preostali del telesa. Posamezne osebk smo ponovno fotografirali in njihova dorzalna površina je bila ponovno izmerjena. Z razliko prvotne površine in površine po amputaciji lahko izmerimo površino odstranjenega fragmenta planarije in izračunamo delež telesa, ki ga predstavlja odstranjen fragment. S tem smo preverili, da je bilo povprečje odstranjenega dela trojice osebkov za posamezne

koncentracije približno enako (saj ob prevelikih razlikah v odstranjenih fragmentih lahko pride do razlik v hitrosti regeneracije). Posamezne planarije brez repa smo nato s kapalko prenesli v posamezne epruvete, v katere smo predhodno s polnilno pipeto vlili 15 mL določene koncentracije posameznih vodnih ekstraktov in izvirske vode). Koncentracije so bile pripravljene v skladu z že prej opisanim postopkom redčenja. Epruvete s planarijami sem nato zamažil z gumijastim zamaškom, da bi preprečili izhlapevanja vode iz raztopin in posledično spreminjanja njihovih parametrov. Vsak dan zjutraj in zvečer je bilo preverjeno stanje osebkov v posamezni epruveti (zabeleženo v primeru pogina).



**Slika 16:** Določevanje deleža telesa, ki ga predstavlja amputiran rep planarij (Foto: J. A. Sever).

Posamezne osebkke smo nato vsake tri dni (po treh dneh je blastema že oblikovana) fotografirali na 40-kratni povečavi pod presevnim mikroskopom, ki ima vstavljen filter za "črno polje" (ang. "darkfield"), katerega namen je večja izrazitost blasteme (ki je prozorne barve) na fotografiji. Površina nastajajoče blasteme je bila nato izmerjena z ImageJ. Planarije smo pod mikroskopom opazovali 24 dni.



**Slika 17:** Merjenje blasteme s programom ImageJ (Foto: J. A. Sever). **Slika 18:** Končana regeneracija<sup>16</sup>.

Regeneracija je bila končana, ko je planarijam ponovno zrasel rep s špičastim koncem, površina blasteme pa je znašala 0 – torej takrat, ko je blastema postala enakomerno obarvana in ne več prozorna/bela (saj to zaznamuje diferenciacijo blastemskih celic med drugim tudi v pigmentne celice).

### 3.3 VPLIV NAJUČINKOVITEJŠEGA RASTLINSKEGA MATERIALA NA SLADKOVODNE KOZICE (*Neocaridina davidi*)

Po ugotovitvi, kateri rastlinski material najbolj učinkuje na zatiranje planarij, smo želeli testirati njegov vpliv na sladkovodne kozice.

#### 3.3.1 TESTNA VRSTA

Kot testni organizmi so bile uporabljene kozice vrste *Neocaridina davidi*, saj je verjetno med najbolj razširjenimi v akvarijih po svetu, planarije pa so njihovi znani škodljivci. Ker imajo rajši tršo vodo in načeloma višji pH, nas je zanimalo, kako se bodo vedle v okolju z malo nižjim pH.



Slika 19: Sladkovodne kozice vrste *Neocaridina davidi* (Foto: J. A. Sever).

### 3.3.2 NASTAVITEV BIVALIŠČ ZA KOZICE

Populacijo 20 odraslih živali smo enakomerno razdelili v dva 45 L akvarija. Akvarija sem napolnil z 20,5 L deklorirane vode s karbonatno trdoto 13° KH in 15° dH (izmerjeno z JBL GH in KH testom). pH vode je znašal 7,65, temperatura pa med 20 in 22 °C. Vsi opisani parametri vode so v optimalnem območju za to vrsto kozic. Pred naselitvijo kozic smo akvarij 7 dni tretirali z 2,5 mL pripravka z nitrifikacijskimi bakterijami, ki so pomagale pri pretvorbi strupenih dušikovih spojin, kot sta  $\text{NH}_4^+$  in  $\text{NO}_2^-$  iona v  $\text{NO}_3^-$ , ki pa ni več toliko strupen, poleg tega pa ga za rast porabljajo alge in rastline. V ta namen (in še dodatno za skrivališče kozic) smo v akvarija naselili par vodnih rastlinskih vrst (*Pistia stratiotes*, *Salvinia natans*, *Aegagropila linnaei*). Dno akvarija je prekrivala približno 6 cm debela plast silikatnega peska in okoli 25 poroznih keramičnih valjev, kar je služilo kot podlaga za razmnoževanje nitrifikacijskih bakterij in biofilma, s katerim so se lahko kozice prehranjevale. V obeh akvarijih sta bila nameščena filtra na zračno črpalko. Po enem mesecu se je v akvarijih vzpostavilo biološko ravnovesje (testi za analizo vode so pokazali, da je koncentracija  $\text{NH}_4^+$  in  $\text{NO}_2^-$  iona po dnevu dodatka hranil v akvarij 0), preden so bile v akvarij vstavljene kozice (s počasno aklimatizacijo).



Slika 20: Pripravljena akvarija za kozice (Foto: J. A. Sever)

### 3.3.3 OSKRBA KOZIC

Kozice v vsakem akvariju smo dnevno hranili s priporočeno količino visokokakovostne hrane, specializirane za kozice (QualDrop®). Enkrat tedensko je bila opravljena 30 % menjava vode, da so se odstranili morebitni delci hrane in neporabljeni  $\text{NO}_3^-$  ioni (saj so v previsokih koncentracijah tudi ti strupeni za kozice).

### 3.3.4 DOLOČITEV VPLIVA NAJUČINKOVITEJŠEGA RASTLINSKEGA MATERIALA NA AKVARIJ S KOZICAMI

Ker se je z raziskovanjem izkazalo, da so najučinkovitejši na zatiranje planarij vodni ekstrakti hrastovih šišek, so bili uporabljeni pri testiranju njihovega vpliva na vstavitv v akvarij s kozicami.

Na začetki je bilo treba s predeksperimentom ugotoviti, kolikšna je največja masa hrastovih šišek v določeni prostornini vode, ki jo kozice še tolerirajo. Pripravili smo pet različnih mas suhih in zdrobljenih hrastovih šišek (0,1; 0,15; 0,25; 0,875 in 1,05 g), ki smo jih dodali v 500 mL akvarijske vode. Kozice smo nato vstavili v posamezne raztopine, ki so se postopoma skoncentrirale na določene koncentracije (0,2; 0,3; 0,5; 1,75 in 2,1 mg/mL). Stanje kozic se je preverjalo 10 dni dvakrat na dan (zjutraj in zvečer). Izkazalo se je, da je po treh dneh poginila samo kozica, nastavljena v raztopini hrastovih šišek s koncentracijo 2,1 mg/mL.

Glede na visoko učinkovitost 1,75 mg/mL vodnega ekstrakta na zatiranje planarij iz rezultatov ocenjevanja učinkovitosti ekstraktov in zaradi dolgega preživetja kozic v raztopini hrastovih šišek s takšno koncentracijo je bilo določeno, da bomo nadalje testirali vpliv te koncentracije.

Izveden je bil eksperiment z dodatkom hrastovih šišek (17,5 g) v 10 L vode v akvarij z 10 osebki *N. davidi* in 10 osebki *P. nigra*. Za primerjavo pa smo enako število osebkov kozic in planarij naselili še v kontrolni akvarij z 10 L akvarijske vode brez hrastovih šišek.

Planarije so bile naseljene v majhne plastične ribje valilnice (odprtine so bile prekrte z zelo fino mrežico), ki so bile vstavljene v oba akvarija s kozicami. Hrastove šiške so se namakale v akvariju dva dni, kar je zagotovilo pogin planarij. Po tretiranju smo v akvarij po kapljicah vlili 10 L sveže vode, naslednji dan pa je sledila 70 % menjava vode, da je bilo iz akvarija odstranjenega čim več ekstrakta hrastovih šišek, hkrati pa kozice niso bile izpostavljene prehitrim nenadnim spremembam v parametrih vode. Po menjavi vode smo akvarij opazovali še 10 dni. Preverjalo se je stanje kozic ter tudi posledice tretiranja vode s šiškami na rastline in splošno estetiko v akvariju, kar je bilo preverjeno s primerjavo v netretiranem oziroma kontrolnem akvariju.



Slika 21: Nastavitev eksperimenta za določitev vpliva najučinkovitejšega ekstrakta na akvarij s kozicami (Foto: J. A. Sever).

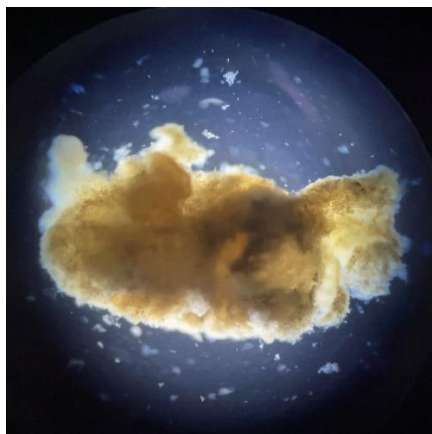
## 4 REZULTATI

### 4.1 OCENJEVANJE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV

Kot že razloženo je bila 21 podobno velikim (dorzalna površina =  $6 \text{ mm}^2 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ ) osebkom *P. nigra* po amputaciji repa in vstavitvi v določene medije vsake tri dni s programom ImageJ izmerjena površina blasteme, s čimer smo lahko določili vpliv ekstraktov na regeneracijo.

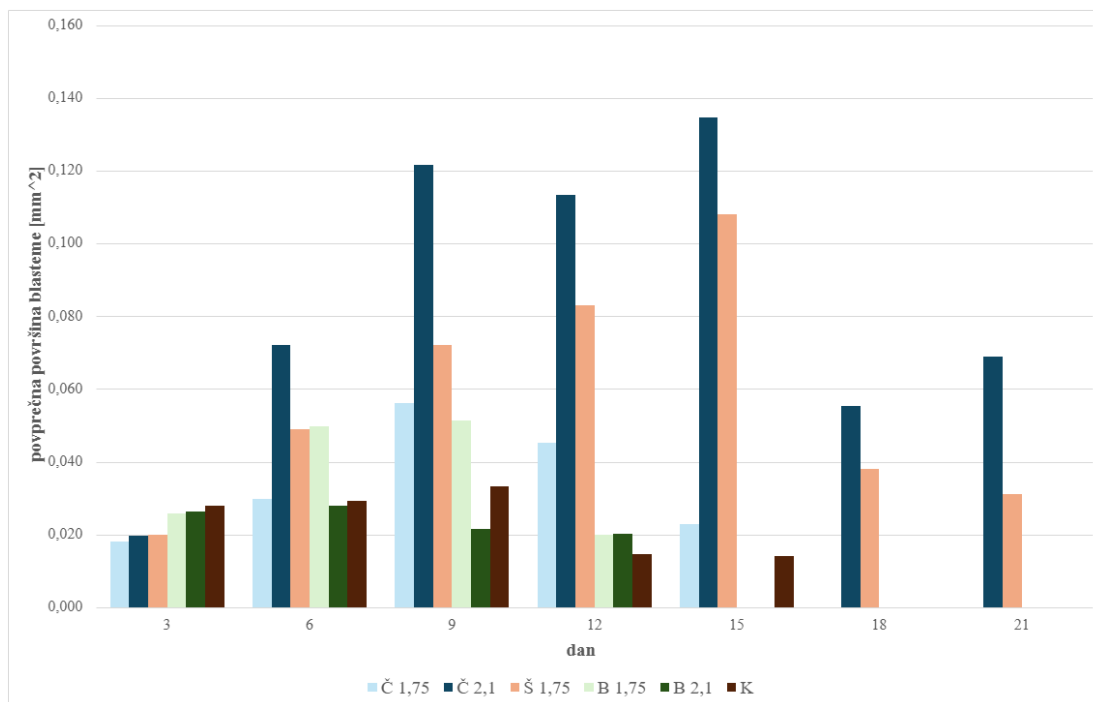
Pred začetkom eksperimenta je bil izračunan delež telesa, ki ga predstavlja amputiran rep. To je bilo pomembno, saj v primeru, da bi prišlo do prevelikih razlik med osebki, bi to vplivalo na kapaciteto regeneracije, kar bi onemogočilo veljavno primerjavo vpliva posameznih vodnih ekstraktov na regeneracijo. V primeru, da je pri osebkcu delež telesa, ki ga predstavlja odstranjen fragment, odstopal od tistih pri ostalih osebkih za več kot 5 %, takšni osebki niso bili uporabljeni v eksperimentu, amputacija pa je bila opravljena ponovno na novem osebkcu.

Dvakrat dnevno je bilo preverjeno tudi stanje osebkov v posameznih medijih. Čez celotno opazovanje so po enem dnevu poginili vsi osebki v 2,1 mg/mL in en osebek v 1,75 mg/mL koncentriranemu vodnemu ekstraktu hrastovih šišek. Poleg naštetih je v štirih dneh po amputaciji poginila še ena planarija v ekstraktu šišek hrasta s koncentracijo 1,75 mg/mL. V slednjem mediju je potemtakem čez proces regeneracije preživel samo en osebek, zaradi česar ne moremo dobiti realnega pogleda v vpliv ekstrakta na regeneracijo, vseeno pa lahko potrdimo, da delujejo najučinkoviteje na zatiranje planarij, saj pri enakih koncentracijah kot ostali ekstrakti že smrtonosno škoduje planarijam. Posledično je sledila odločitev, da se rezultatov izmerjene površine blasteme ne bo primerjalo s povprečnimi meritvami blastem ostalih medijev, vseeno pa bodo prikazani.



**Slika 22:** Osebek je poginil po enem dnevu bivanja v vodnem ekstraktu hrastovih šišek koncentracije 2,1 mg/mL (Foto: J. A. Sever).

**Graf 1: Povprečna površina blasteme osebkov v posameznih vodnih ekstraktih**



Legenda:

- Č 1,75 – osebki v vodnem ekstraktu črne jelše s koncentracijo 1,75 mg/mL
- Č 2,1 – osebki v vodnem ekstraktu črne jelše s koncentracijo 2,1 mg/mL
- Š 1,75 – osebki v vodnem ekstraktu hrastovih šišek s koncentracijo 1,75 mg/mL
- B 1,75 – osebki v vodnem ekstraktu navdane bukve s koncentracijo 1,75 mg/mL
- B 2,1 – osebki v vodnem ekstraktu navadne bukve s koncentracijo 2,1 mg/mL
- K – osebki v izvirski vodi (kontrola)

Analiza podatkov iz zgornjega grafa kaže, da so imeli v treh dneh po amputaciji največje povprečje površine blasteme kontrolni osebki ( $0,028 \text{ mm}^2$ ). Malo manjše povprečje ( $0,026 \text{ mm}^2$ ) so imeli osebki v obeh koncentracijah vodnega ekstrakta navadne bukve. Osebki v vodnem ekstraktu črne jelše koncentracije 2,1 mg/mL in 1,75 mg/mL pa so imeli povprečno površino blasteme  $0,020$  in  $0,018 \text{ mm}^2$ , kar je bila najnižja vrednost.

Šest dan po amputaciji je bilo povprečje površine blasteme najvišje pri osebkih v ekstraktu črne jelše s koncentracijo 2,1 mg/mL ( $0,072 \text{ mm}^2$ ). Površina blasteme je pri teh osebkih naraščala vse do 15. dneva po amputaciji. Če to primerjamo s povprečjem pri kontrolnih osebkih ( $0,029 \text{ mm}^2$ ), opazimo veliko razliko. Ker se v treh dneh po amputaciji začnejo blastemske celice že diferencirati (med drugim tudi v pigmentne celice), zaradi česar blastema ni več vidna, je površina blasteme do dokončane regeneracije vse manjša, dokler blasteme ni več (popolna diferenciacija, ki zaznamuje konec regeneracije). Torej vodnih ekstrakti, v katerih se je osebkom površina blasteme začela manjšati zelo pozno (obe koncentraciji vodnih ekstraktov storžkov črne jelše), so vplivali na diferenciacijo blastemskih ali progenitorskih celic.

Razločnejšo določitev učinkovitosti posameznih ekstraktov kaže tabela 1.

**Tabela 2: Čas regeneracije amputiranega dela po osebkih planarij v posameznih medijih**

Medij	Številka osebk	Dan končane regeneracije (viden obarvan, špičast rep)
ČRNA JELŠA, 1,75 mg/mL	1	18
	2	18
	3	15
<i>povprečje</i>		<b>17</b>
ČRNA JELŠA, 2,1 mg/mL	1	24
	2	21
	3	21
<i>povprečje</i>		<b>22</b>
HRASTOVE ŠIŠKE 1,75 mg/mL	1/	
	2/	
	3	24
<i>povprečje</i>		<b>/</b>
HRASTOVE ŠIŠKE 2,1 mg/mL	1/	
	2/	
	3/	
<i>povprečje</i>		<b>/</b>
NAVADNA BUKEV 1,75 mg/mL	1	15
	2	15
	3	12
<i>povprečje</i>		<b>14</b>
NAVADNA BUKEV 2,1 mg/mL	1	15
	2	15
	3	15
<i>povprečje</i>		<b>15</b>
KONTROLA	1	18
	2	15
	3	12
<i>povprečje</i>		<b>15</b>

Legenda:

/ - ni določeno

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

Najhitreje so amputirane repe uspešno regenerirali osebki v vodnem ekstraktu navadne bukve s koncentracijo 1,75 mg/mL. Sledili so jim osebki v enakem vodnem ekstraktu, vendar z višjo koncentracijo, ter osebki v kontrolnem mediju s povprečnim časom regeneracije 15 dni. Osebki v vodnem ekstraktu storžkov črne jelše s koncentracijo 1,75 mg/mL so v povprečju potrebovali 17 dni, v koncentraciji 2,1 mg/mL pa so osebki regenerirali amputiran fragment najdlje, in sicer 22 dni.

Najučinkovitejši vodni ekstrakt na zatiranje planarij je zagotovo iz hrastovih šišk v koncentraciji 2,1 mg/mL, hkrati pa je zelo učinkovit tudi v koncentraciji 1,75 mg/mL. Sledijo jima vodni ekstrakti črne jelše, kjer je spet višja koncentracija učinkovitejša. Vodni ekstrakti navadne bukve ne vplivajo znatno na regeneracijo.



**Slika 23:** Primerjava velikosti blasteme tri dni po amputaciji med osebko v ekstraktu črne jelše (levo) in kontrolnim osebkom (desno) (Foto: J. A. Sever).



**Slika 24:** Primerjava obarvanosti blasteme 21 dni po amputaciji med osebkom v ekstraktu črne jelše (levo) in kontrolnim osebkom (desno) (Foto: J. A. Sever).

## 4.2 REZULTATI EKSPERIMENTA ZA DOLOČITEV VPLIVA NA AKVARIJ S KOZICAMI

### 4.2.1 VPLIV NA KOZICE IN PLANARIJE

Po dveh dnevih namakanja 17,5 g zdrobljenih hrastovih šišek v akvarij z 10 L vode je preživel vseh 10 kozic, pomrle pa so vse planarije. Po 10 dneh opazovanja po tretiranju so se kozice normalno levile, prehranjevale, njihova aktivnost pa je ostala enaka kot pred tretiranjem s hrastovimi šiškami.

### 4.2.2 VPLIV NA RASTLINE IN ESTETSKOST AKVARIJA

Nobena plavajoča rastlinska vrsta v tretiranem akvariju se ni vidno razlikovala od tistih v kontrolnem akvariju. Imele so približno enako dolge korenine, obarvanost listov pa je tudi bila enaka. Kljub temu se je pomembno zavedati, da bi predolgo namakanje hrastovih šišek onemogočilo absorpcijo svetlobe (zaradi zelo temnega obarvanja vode) podvodnih rastlin, kar jim seveda lahko škoduje. Zaradi hitre učinkovitosti in kratkega časa tretiranja s hrastovimi šiškami tudi podvodne rastline niso bile oškodovane.

Zaradi visoke koncentracije temno obarvanih polifenolnih spojin in ostalih snovi v hrastovih šiškah je tretiranje povzročilo temno rjavo obarvanje keramičnih valjev, ne pa tudi belega silikatnega peska. Razlog je verjetno v visoki poroznosti keramičnih valjev, kamor je vstopila temno obarvana voda. Verjetno bi prišlo do enakih dogodkov v akvariju z belim kamenjem, ki je porozno, in še s kakšnimi drugimi dekoracijami.



Slika 25: Primerjava rastline vrste *Pistia stratiotes*, po namakanju hrastovih šišek z rastlino v kontrolnem akvariju (Foto: J. A. Sever).



Slika 26: Obarvanje poroznih, keramičnih valjev (Foto: J. A. Sever).

## 5 DISKUSIJA

Planarije lahko prenesemo v naše akvarije na različne načine: z nakupom žive hrane, akvarijskih dekoracij, rastlin, živali in še bi lahko naštevali. Večinoma ne predstavljajo grožnje večjim akvarijskim ribam ter ostalim organizmom, skrbeti nas začne, ko se pojavijo v akvarijih z manjšimi živalmi, kot so sladkovodne kozice, manjši polži ter ribje mladice.

V ta namen se je razvilo veliko načinov za zatiranje planarij. Biološko zatiranje izvedemo z vnosom organizmov, ki se prehranjujejo s planarijami, na primer določene vrste rib in nekatere vrste polžev ter večjih kozic. Takšno obvladovanje planarij lahko izvedemo le v akvarijih, v katerih ni majhnih kozic in ribjih mladice, saj bi drugače biološki zatiralci plenili tudi njih. Mehansko zatiranje vključuje posebno oblikovane pasti, ki učinkovito zmanjšajo število planarij, vendar jih ne iztrebijo v celoti. Kemično zatiranje planarij je zelo učinkovito, vendar je po navadi dražje, hkrati pa ni povsem varno za vse akvarijske organizme. Nekatere učinkovine za zatiranje planarij (fenbendazol), ki v prevelikih odmerkih povzročajo razne deformacije in razmnoževalne motnje kozic, lahko ostanejo v substratu še sedem mesecev po doziranju zdravila (Planarian flatworms..., 5.1.2024). Akvaristična podjetja pa so že razvila sredstva za zatiranje planarij, katerih učinkovine temeljijo na naravnih materialih, kot je ekstrakt orehov betlove palme (*Areca catechu*). Slednji naj bi bil varen za kozice, rastline in vse koristne bakterije, močno pa že v majhnih koncentracijah škoduje planarijam in ostalim črvom podobnim organizmom (nematode, ostali ploski črvi ipd.)<sup>55</sup>. Takšni izdelki niso najcenejši (8,12 € za 35g ekstrakta), poleg tega pa njihova pridelava ni najprijaznejša okolju (krčenje pragozdov s plantažami betlovih palm v tropskih krajih in dolg transport, kar onesnažuje okolje).



Slika 27: Past za planarije<sup>59</sup>.



Slika 28: Vrsta ribe, ki jo lahko uporabimo pri biološkem zatiranju planarij<sup>66</sup>.

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

V ta namen smo želeli ugotoviti, kakšna je uporabnost lokalno dostopnega rastlinskega materiala kot okolju in denarnici prijaznejša alternativa pri zatiranju planarij v akvariju. Pripravili smo vodne ekstrakte hrastovih šišek, storžkov črne jelše in listja navadne bukve v dveh koncentracijah, 1,75 mg/mL in 2,1 mg/mL in preverjali njihov vpliv na planarije.

V prvi hipotezi se je domnevalo, da bo **najučinkovitejši vodni ekstrakt storžev črne jelše, najmanj pa vodni ekstrakt listja navadne bukve**. Ta hipotezo je bila zapisana zaradi predvidevanja pred raziskovanjem, da bo učinkovitost ekstraktov posameznega rastlinskega materiala premosorazmerna z njihovo celotno vrednostjo polifenolnih snovi. V literaturi je opisano, da jih imajo sotržki črne jelše največ (610 mg/g GAE), listje navadne bukve pa najmanj ( $69,64 \pm 3,1$  mg/g GAE). Izkazalo se je, da to drži le delno. Najmanj učinkovit je res bil vodni ekstrakt listja navadne bukve, saj na regenerativnost planarij praktično ni vplival, za najučinkovitejši vodni ekstrakt na zatiranje planarij pa velja ekstrakt hrastovih šišek, ki ima nižjo vrednost polifenolnih snovi kakor storžki črne jelše ( $437,27 \pm 3,14$  mg/g GAE). V obeh koncentracijah je povzročil pogin vseh osebkov z izjemo enega v koncentraciji 1,75 mg/mL. Z raziskovanjem o možnih razlogih smo prišli do zaključka, da je učinkovitost ekstraktov bolj povezana z njihovo antioksidantno kapaciteto. Obrazložitev sledi proti koncu diskusije.

V vseh primerih je učinkovitost ekstraktov naraščala z naraščajočo masno koncentracijo, zaradi česar lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da bodo **višje koncentracije rastlinskega materiala bolj zatirale planarije kot nižje**.

Da bi preveril veljavnost tretje hipoteze (**najučinkovitejši vodni ekstrakt bo manj učinkovit kakor komercialna sredstva za zatiranje planarij v akvariju**), je bil opravljen eksperiment primerjave učinkovitosti hrastovih šišek z dvema kupljenima izdelkoma za zatiranje planarij: ekstrakt betlove palme (Ex-it) in raztopina bakrovega sulfata, cinkovega sulfata in metilen modrega (STOP-HYDRIN). V 500 mL akvarijske smo vnesli predpisano količino posameznega sredstva z dodatkom 0,875 g hrastovih šišek (kar ustvari koncentracijo 1,75 mg/mL, saj hrastove šiške že učinkujejo pri tej koncentraciji). V pripravljene medije sta bila nato vstavljena dva osebka planarij, katerih stanje se je preverjalo trikrat dnevno (zjutraj, popoldne in zvečer). Presenetljivo sta najhitreje poginili obe planariji v vodi s hrastovimi šiškami in en osebek v raztopini ekstrakta betlove palme, in sicer drugi dan zjutraj. Popoldan istega dneva je umrla še druga planarija v raztopini ekstrakta betlovega oreha. Očitno predpisan odmerek za odstranitev planarij s pomočjo raztopine STOP-HYDRIN ni dovolj močan, saj sta oba osebka preživela celotnih 10 dni opazovanja. Posledično lahko tretjo hipotezo ovržemo.



Slika 29: Komercialna sredstva za zatiranje planarij (Foto: J. A. Sever).

Za določitev možnih razlogov, ki so odgovor na vprašanje, zakaj vodni ekstrakti vplivajo na regeneracijo oz. preživetje planarij, so bili opravljeni še enostavnejši eksperimenti.

Ker so planarije občutljive na pH, vodni ekstrakti pa vsebujejo veliko fenolnih kislin, smo sprva preverili njegov vpliv. Pripravljeni sta bili dve raztopini z istim pH: ena raztopina je bila najučinkovitejši vodni ekstrakt (2,1 mg/mL ekstrakt šišek hrasta), druga raztopina pa je bila zgolj izvirna voda, z nižanim pH z 0,1M (mol/L) HCl na isti pH kot v najučinkovitejšem ekstraktu (pH = 7,13). Tako se je ugotavljalo, če je vzrok za določen vpliv na stanje osebkov v pH ali je razlog v nečem drugem. Pri tem eksperimentu so bili uporabljeni trije enako veliki osebki za posamezen medij (najučinkovitejši ekstrakt, izvirna voda z nižanim pH in navadna izvirna voda kot kontrola). Po sedmih dneh opazovanja so poginili samo osebki v vodnem ekstraktu hrastovih šišek. Ugotovljeno je bilo, da nižan pH s strani rastlinskega materiala ni vzrok za vpliv ekstraktov na stanje oz. regeneracijo planarij.

Glede na visoko antioksidantno kapaciteto učinkovitih vodnih ekstraktov (hrastova šiška, črna jelša) smo začeli raziskovati pomen antioksidantov pri regeneraciji oz. stanju planarij. Antioksidanti so snovi, ki zmanjšujejo aktivnost ROS, tako da jim z donacijo elektronov "nevtralizirajo" (jih reducirajo). Kot že navedeno v teoretičnem delu raziskovalne naloge lahko z gotovostjo potrdimo ključen pomen zmerne količine ROS pri uspešni regeneraciji in splošni funkcionalnosti planarij. ROS so namreč pozitivni regulatorji mnogih med seboj povezanih signalnih poti, kot so MAPK (ERK), PI3K/Akt in JAK/STAT, ki so povezane z diferenciacijo, proliferacijo in apoptozo (biološki procesi, sodelujoči med regeneracijo). Poleg tega pa so ROS v zmernih koncentracijah pomembni pri ključnih bioloških procesih, kot je recimo proizvodnja ATP med celičnim dihanjem. Torej ko so planarije v okolju s preveliko količino reducentov, kot so antioksidanti (v tem primeru v vodnih ekstraktih črne jelše in hrastovih šišek), se v planarijah zmanjša koncentracija aktivnih ROS, kar negativno vpliva na biološke procese kot sta regeneracija in sinteza ATP. Ko pa je količina antioksidantov izredno prevelika (v vodnem ekstraktu hrastovih šišek koncentracije 1,75 in 2,1 mg/mL), lahko planarije tudi poginejo zaradi redukcijskega stresa in posledično onemogočanje opravljanja življenjsko pomembnih biokemičnih procesov. Na tem temelji četrta hipoteza, ki pravi, da ***vodni ekstrakti vplivajo na regeneracijo planarij preko reduciranja ROS***.

Zaradi preverjanja pravilnosti hipoteze se je izvedel eksperiment: tri podobne osebke planarij smo vstavili v epruvete s 15 mL 4 različnih medijev – vodni ekstrakt hrastovih šišek koncentracije 2,1 mg/mL; vodni ekstrakt hrastovih šišek 2,1 mg/mL, ki ima hkrati množinsko koncentracijo  $\text{H}_2\text{O}_2$  300  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ); raztopina 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in izvirna voda.

Razlog za izbiro  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in v takšni koncentraciji je zaradi omembe  $\text{H}_2\text{O}_2$  v literaturi kot ene izmed najpomembnejših ROS signalnih molekul in v koncentraciji do 300  $\mu\text{M}$  nima negativnih učinkov na zdravje osebkov, vseeno pa lahko reducira neko količino antioksidantov. 50 mL raztopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  s koncentracijo 300  $\mu\text{M}$  smo pripravili z razredčitvijo 3 % raztopine  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tako da smo 8,50 mL 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  vlili v 500 mL bučko, jo napolnili do oznake z izvirno vodo (množinska koncentracija raztopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  15  $\mu\text{mol/mL}$ ) in 1 mL raztopine z 1 mL polnilno pipeto prenesli v 50 mL merilno bučko, v katero smo do oznake dolili izvirno vodo. Postopek priprave najučinkovitejšega ekstrakta, ki ima hkrati koncentracijo  $\text{H}_2\text{O}_2$  300  $\mu\text{M}$ , je podoben pripravi 50 mL raztopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  s koncentracijo 300  $\mu\text{M}$ , razlika je le v tem, da je bil v merilno bučko pred dopolnitvijo z izvirno vodo dodan še 2,26 mL koncentriran ekstrakt šišek hrasta.

S primerjavo stanja osebkov v ekstraktu hrastovih šišek in osebkov v ekstraktu, ki ima hkrati koncentracijo  $\text{H}_2\text{O}_2$   $300\mu\text{M}$ , smo lahko ugotovili, ali ROS vplivajo na stanje planarij (bodisi na regeneracijo bodisi na preživetje). Izvirna voda in  $300\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  sta bila kontrolna medija. Izkazalo se je, da so vsi osebki v ekstraktu hrastovih šišek z dodanim  $\text{H}_2\text{O}_2$  preživeli kar tri dni več kakor osebki v samem vodnem ekstraktu hrastovih šišek. V celotnih 14 dneh opazovanja stanja planarij so preživeli vsi kontrolni osebki (v izvirski vodi in  $300\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ta ugotovitev potrjuje pravilnost četrte hipoteze.

V zadnji hipotezi je bilo predvideno, da ***vodni ekstrakt, ki učinkovito zatira planarije, ne bo škodoval sladkovodnim kozicam***. Po dveh dneh tretiranja akvarija s kozicami s hrastovimi šiškami lahko potrdimo, da se kljub poginu vseh desetih planarij ni enako zgodilo niti enemu osebkcu kozic v akvariju. Zato lahko svojo peto hipotezo potrdimo.

Raziskavo bi lahko razširili z raziskovanjem vpliva vodnih ekstraktov na druge vodne organizme, kot so akvarijski polži, saj nanje negativno vpliva veliko sredstev za zatiranje planarij (kot so fenbendazol, ekstrakt oreha betlove palme in sredstvo STOP-HYDRIN). Ker sredstva še dolgo ostanejo v akvariju (v podlagi ipd.), pomeni, da bi lahko polže, ki smo jih morali pred zdravljenjem odstraniti iz akvarija, ponovno naselili v akvarij šele čez zelo dolgo časa v primeru, da ne bi opravili celotne menjave vode in prečiščenja peska (saj naštetu ukrepa slabotno vplivata na biološko ravnovesje v akvariju). Vodni ekstrakti bi tako lahko bili potencialna učinkovita alternativa za odstranitev planarij v akvarijih z okrasnimi polži. Za večjo natančnost in verodostojnost podatkov bi za posamezen vodni ekstrakt lahko uporabili več kot tri osebkce, prav tako pa bi realnost rezultatov izboljšala uporaba boljšega fotoaparata in vsakodnevno slikanje osebkov. V bodoče pa bi lahko raziskali tudi razloge, zakaj vodni ekstrakti v koncentracijah, pri katerih smrtonosno škodujejo planarijam, ne škodujejo kozicam.

## 6 ZAKLJUČEK

- Vodni ekstrakt hrastovih šišek koncentracije 2,1 mg/mL velja za najučinkovitejšega.
- Z naraščajočo koncentracijo ekstraktov narašča tudi njihova učinkovitost.
- Najučinkovitejši vodni ekstrakt ima boljšo učinkovitost kot komercialno sredstvo za zatiranje planarij iz ekstrakta oreha betlove palme
- Vodni ekstrakt hrastovih šišek v koncentraciji 1,75 mg/mL škoduje planarijam, ne pa tudi kozicam, zaradi česar je učinkovito sredstvo za odstranitev planarij iz akvarija.
- Vodni ekstrakti vplivajo na regeneracijo in stanje planarij s spreminjanjem redoks ravnotežja.
- Z antioksidantno kapaciteto vodnih ekstraktov narašča tudi njihov vpliv na planarije.

## 7 POVZETEK

Z globalizacijo je drastično napredoval tudi trg z akvaristiko, predvsem na področju izbora vodnih organizmov, ki so naprodaj. Skupaj z vnosom takšnih tujerodnih vrst pa mnogokrat prinesemo potencialne škodljivce. Med nezaželenimi v akvarijih s kozicami zagotovo držijo sloves tudi planarije, saj so plenilke kozic, hkrati pa se zelo hitro razmnožujejo. Gre za ploske črve z izjemnimi regenerativnimi sposobnostmi, ki jih koristijo pri nespolnem razmnoževanju. Akvaristične trgovine nudijo razne izdelke za njihovo zatiranje, ki pa so dragi ali pa negativno vplivajo na kozice ter druge organizme. V ta namen smo začeli raziskovati, kako vodni ekstrakti lokalno dostopnih rastlinskih vrst vplivajo na zatiranje planarij kot cenejša in okolju prijaznejša alternativa komercialnim sredstvom. Pripravljeni so bili trije vodni ekstrakti dveh različnih koncentracij iz šišek hrasta, storžkov črne jelše ter listja bukve. Za ocenitev učinkovitosti posameznih ekstraktov na zatiranje populacije planarij se je upoštevala hitrost njihove regeneracije. Planarijam vrste *Polycelis nigra* se je odstranil rep, vstavljene so bile v posamezne ekstrakte in kontrolni medij. Za vsak ekstrakt posamezne koncentracije do bili uporabljeni trije osebki, kar je skupaj 21. Posamezne osebkke se je vsake tri dni fotografiralo, tj. skupno 24. S pomočjo programa ImageJ je bila izmerjena površina novega, nediferenciranega tkiva (blasteme) vsakega osebka. Regeneracija repa je bila končana, ko je površina blasteme znašala 0, kar nakazuje na diferenciacijo novonastalega tkiva, oblika repa pa špičasta. Najučinkovitejši je bil ekstrakt šišek puhastega hrasta, najmanj pa ekstrakt listja navadne bukve. Višje koncentracije so bile učinkovitejše kakor nižje. Ugotovili smo, da učinkovitost ekstraktov narašča z naraščajočo vsebnostjo antioksidantov v rastlinskem materialu zaradi reduciranja reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki so ključnega pomena za uspešno regeneracijo, saj dokazano sodelujejo pri pospešitvi mnogih signalnih poti, sodelujočih v regeneraciji, kot so MAPK/ERK, JAK/STAT in PI3K/Akt. Zelo prevelika koncentracija antioksidantov poruši ravnovesje med antioksidanti in ROS, kar povzroči pogin osebkov zaradi redukcijskega stresa.

## 8 SUMMARY

With the improvement of globalization, the aquarium market has also advanced drastically, especially in the field of the selection of aquatic organisms for sale. Along with the introduction of such alien species, however, we often bring in potential pests. Planaria certainly hold a reputation among the unwanted ones in aquariums with freshwater shrimp, as they are known to predate them and at the same time, reproduce very quickly in the aquarium. Planarians are flatworms with remarkable regenerative abilities which can benefit from them in asexual reproduction, causing a big population boom. Aquarium stores offer various products for their suppression, however they can be expensive, or, can also negatively impact shrimp and other inhabitants.

For this very purpose, I began researching the effect of water extracts of locally available plant species on the suppression of planaria as a cheaper and more environmentally friendly alternative to commercial means. I prepared three water extracts of two different concentrations from Italian oak galls, black alder cones and common beech leaves. To assess the effectiveness of each extract on suppressing the population of planarias, I took into account the rate of their regeneration. I amputated a tail fragment of *Polycelis nigra* planarian species and placed the planaria into individual extract solutions and control medium. For each extract of particular concentration, I used 3 specimens, 21 in total. Individual specimens were photographed every three days, 24 altogether. Using ImageJ program, I was able to measure the surface area of new, undifferentiated tissue, called the blastema of each specimen. Completion of regeneration was remarked with blastema surface value equaling 0, indicating differentiation of the newly formed tissue, and with a pointed shape of the tail (cell proliferation end). The extract of Italian oak galls was the most effective and the extract of common beech leaves was the least. Higher concentrations were more effective than the lower ones. I noticed that the efficiency of the extracts increases with increasing antioxidant content in the plant material, due to the reduction of reactive oxygen species (ROS), which are crucial for successful regeneration as they have been shown to participate in the acceleration of many signaling pathways involved in regeneration such as MAPK (ERK), JAK/STAT and PI3K/Akt signaling cascade. Excessive antioxidant concentrations disrupt the redox balance, resulting in death of specimens due to the reductive stress.

## 9 VIRI IN LITERATURA

1. Accorsi A, Williams M, Ross EJ, Robb SMC, Elliott SA, Tu KC, Sánchez Alvarado A. 2017. Hands-On Classroom Activities for Exploring Regeneration and Stem Cell Biology with Planarians The American Biology Teacher, Vol. 79 No. 3. [https://www.researchgate.net/publication/314093970\\_Hands-On\\_Classroom\\_Activities\\_for\\_Exploring\\_Regeneration\\_and\\_Stem\\_Cell\\_Biology\\_with\\_Planarians](https://www.researchgate.net/publication/314093970_Hands-On_Classroom_Activities_for_Exploring_Regeneration_and_Stem_Cell_Biology_with_Planarians)
2. Activation loop. Collins English Dictionary. Copyright © HarperCollins Publishers. <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/activation-markers>
3. Akhiani AA, Martner A. 2022. Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Regulation of NOX-Derived Reactive Oxygen Species in Cancer. Antioxidants (Basel). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9854495/#:~:text=Regulation%20of%20NOX%20Enzymes%20by,AKT1%20%5B59%2C60%5D>
4. Al Haj Baddar NW, Chithrala A, Voss SR. 2019. Amputation-induced reactive oxygen species signaling is required for axolotl tail regeneration. Dev Dyn. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6340771/>
5. Andl C.D., Mizushima T., Oyama K., Bowser M., Nakagawa H., Rustgi A.K. 2004. EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2004. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpgi.00253.2004>
6. Animated biology With arpan. 2022. Ras-MAPK pathway : Ras-MAPK in cancer : The MAP Kinase (MAPK) signalling pathway. <https://youtu.be/Pa11Jw0JAdk?si=gG8ouhkTF7gSjwZk>
7. Azmaz M, Aksoy ÖK, Katılmış Y, Mammadov R. 2020. Investigation of the Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Andricus quercustozae Gall and Host Plant (Quercus infectoria). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20203465951>
8. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. 2014. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. Biochem J. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4112375/#:~:text=Activated%20JAK%20is%20characterised%20by,principal%20downstream%20effectors%2C%20the%20STATs>
9. Banc R, Rusu ME, Filip L, Popa DS. 2023. Phytochemical Profiling and Biological Activities of Quercus sp. Galls (Oak Galls): A Systematic Review of Studies Published in the Last 5 Years. Plants (Basel). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10674842/#sec4-plants-12-03873>

10. Behring JB, van der Post S, Mooradian AD, Egan MJ, Zimmerman MI, Clements JL, Bowman GR, Held JM. 2020. Spatial and temporal alterations in protein structure by EGF regulate cryptic cysteine oxidation. *Sci Signal*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7263378/#:~:text=Stimulation%20of%20plasma%20membrane%20receptor,proteins%20to%20potentiate%20downstream%20signaling>
11. Bizjak-Mali, L., Kostanjšek, R., Girandon, L., Jafari, P., Di Summa, P. Trotošek, B. 2020. RTV Slovenija, Ljubljana. <https://4d.rtvlo.si/arhiv/ugriznimo-znanost/174674573> (2.1.2024).
12. Blagovič N. 2022. Celični redukcijski stres. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
13. Bocchinfuso DG, Taylor P, Ross E, Ignatchenko A, Ignatchenko V, Kislinger T, Pearson BJ, Moran MF. 2012. Proteomic profiling of the planarian *Schmidtea mediterranea* and its mucous reveals similarities with human secretions and those predicted for parasitic flatworms. *Mol Cell Proteomics*. [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3434776/#:~:text=Planarians%20are%20covered%20in%20a,adhesion%20\(10%2C%2011](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3434776/#:~:text=Planarians%20are%20covered%20in%20a,adhesion%20(10%2C%2011)
14. Cebrià F, Adell T, Saló E. 2018. Rebuilding a planarian: from early signaling to final shape. *Int J Dev Biol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29938765/>
15. Chadwick, M., Carvalho, L. G., Vanegas, C., & Dimartino, S. 2025. A Comparative Review of Alternative Fucoidan Extraction Techniques from Seaweed. *Marine Drugs*. <https://www.mdpi.com/1660-3397/23/1/27>
16. Collins EL. 2007. The Effect of Caffeine and Ethanol on Flatworm Regeneration. *Electronic Theses and Dissertations. Paper 2028*. <https://dc.etsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3389&context=etd> (22.12.2023)
17. Cuesta, C., Arévalo-Alameda, C., & Castellano, E. 2021. The Importance of Being PI3K in the RAS Signaling Network. *Genes*, 12(7), 1094. [https://www.mdpi.com/2073-4425/12/7/1094#:~:text=From%20here%2C%20PI3K%20could%20be,bound%20Protein%202%20\(GRB2\)%20mediated](https://www.mdpi.com/2073-4425/12/7/1094#:~:text=From%20here%2C%20PI3K%20could%20be,bound%20Protein%202%20(GRB2)%20mediated)
18. Dean MRP, Duncan EM. 2020. Laboratory Maintenance and Propagation of Freshwater Planarians. *Curr Protoc Microbiol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33058563/>
19. Deng S, Leong HC, Datta A, Gopal V, Kumar AP, Yap CT. 2022. PI3K/AKT Signaling Tips the Balance of Cytoskeletal Forces for Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8997157/#:~:text=The%20activation%20of%20the%20PI3K,migratory%20potential%20of%20cancer%20cells>
20. Dermastia, M., Kreft, M., Lenasi, H., Turk, T. 2013. Čudovite oblike: Zgradba in delovanje evkariontskih organizmov za gimnazije. Rokus Klett, Ljubljana.

21. Dillon, C., Aguilera, M. 2017. UC San Diego Researchers Explain the Mechanism of Asexual Reproduction in Freshwater Flatworms. [https://biology.ucsd.edu/about/news/article\\_092517.html#:~:text=Through%20a%20process%20called%20fission,worms%20within%20about%20a%20week.](https://biology.ucsd.edu/about/news/article_092517.html#:~:text=Through%20a%20process%20called%20fission,worms%20within%20about%20a%20week.)
22. Eferl, R., Wagner, E. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859–868. <https://www.nature.com/articles/nrc1209>
23. Freudlsperger C, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen Z, Van Waes C. 2010. EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin Ther Targets*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3399735/#:~:text=One%20frequently%20altered%20axis%20is,ultimately%20contributes%20to%20HNSCC%20progression>
24. Frezzato F, Raggi F, Martini V, Severin F, Trimarco V, Visentin A, Scomazzon E, Accordi B, Bresolin S, Piazza F, Facco M, Basso G, Semenzato G, Trentin L. 2019. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31044428/#:~:text=We%20found%20that%20patients%20showing,expression%20of%20HSF1%20and%20HSP70>
25. Gaertn L. *Alnus glutinosa*. <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Alnus+glutinosa>
26. Garrido Ruiz D, Sandoval-Perez A, Rangarajan AV, Gunderson EL, Jacobson MP. 2022. Cysteine Oxidation in Proteins: Structure, Biophysics, and Simulation. *Biochemistry*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9583617/#:~:text=Oxidation%20of%20catalytic%20cysteines%20of,of%20EGFR%20increases%20its%20activity>
27. Ge XY, Han X, Zhao YL, Cui GS, Yang YG. 2022. An insight into planarian regeneration. *Cell Prolif*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9436907/#:~:text=Recent%20studies%20have%20shown%20that,regenerate%20appropriate%20tissues%20after%20injury> (10. 12. 2023).
28. Giuliani C, Bucci I, Napolitano G. 2018. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6110821/#:~:text=Nuclear%20factor-kappa%20B%20\(NF,survival%2C%20proliferation%2C%20and%20differentiation](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6110821/#:~:text=Nuclear%20factor-kappa%20B%20(NF,survival%2C%20proliferation%2C%20and%20differentiation)
29. Haddadi, N., Lin, Y., Travis, G. et al. 2018. PTEN/PTENP1: ‘Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling’, new targets for cancer therapy. *Mol Cancer* 17, 37. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0803-3#:~:text=The%20phosphatase%20and%20tensin%20homologue,PI3K%2FAkt%20signalling%20driving%20tumourigenesis>

30. Horvat J., 2011. Citotoksični učinek melitina na endotelijske celice človeka. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
31. Hricovíniová Z, Mascaretti Š, Hricovíniová J, Čížek A, Jampílek J. 2021. New Unnatural Gallotannins: A Way toward Green Antioxidants, Antimicrobials and Antibiofilm Agents. Antioxidants (Basel). [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8389200/#:~:text=Gallotannins%20\(GTs\)%20from%20various%20species,7%2C8%2C9%5D](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8389200/#:~:text=Gallotannins%20(GTs)%20from%20various%20species,7%2C8%2C9%5D)
32. Hu, X., li, J., Fu, M. et al. 2021. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Sig Transduct Target Ther 6, 402. <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00791-1#Sec57>
33. Hussain Biology. 2018. MAPK/ERK Signaling Pathway. <https://youtu.be/thLsxvqDZ04?si=9Wd4XH-pti6e7ogv>
34. Hussain Biology. 2020. AKT/PKB Signaling Pathway: PI3k Signaling. <https://youtu.be/Mc61VOhhNkg?si=O7ptBPZy9Xwdc353>
35. Ibi M., Yabe-Nishimura C. 2020. Chapter 1 - The role of reactive oxygen species in the pathogenic pathways of depression, Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases, Academic Press, Pages 3-16. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128177808000013>
36. J. Lopez, M., A. Hall, C. 2023. Physiology, Osmosis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557609/#:~:text=In%20hypotonic%20solutions%2C%20there%20is,a%20process%20known%20as%20cytolysis.> (3.1.2024)
37. Jaenen V, Fraguas S, Bijmens K, Heleven M, Artois T, Romero R, Smeets K, Cebrià F. 2021. Reactive oxygen species rescue regeneration after silencing the MAPK-ERK signaling pathway in *Schmidtea mediterranea*. Sci Rep. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33441641/>
38. Jak-STAT Signaling Pathway. SinoBiological. <https://www.sinobiological.com/pathways/jak-stat-signaling-pathway>
39. Jason S. Rawlings, Kristin M. Rosler, Douglas A. Harrison; The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci 15 March 2004; 117 (8): 1281–1283. <https://journals.biologists.com/jcs/article-abstract/117/8/1281/28255/The-JAK-STAT-signaling-pathway?redirectedFrom=fulltext>
40. JJ Medicine, AKT Signaling Pathway: Regulation and Downstream Effects. <https://youtu.be/W3ZASYwqjNc?si=c2Nhmt2zRWi57GJZ>
41. Johari, M. A., Khong, H. Y. 2019. Total Phenolic Content and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Pereskia bleo*, Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2019/7428593#:~:text=3.1.,antioxidants%20%5B6%2C%207%5D>

42. Kaur G, Athar M, Alam MS. 2008. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem Biol Interact.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18076871/>
43. Knezović, L., Miliša, M., Kalfatić, M., Rajević, N., Planinić, A. 2015. A key to the freshwater triclads (Platyhelminthes, Tricladida) of Herzegovina watercourses. <https://hrcak.srce.hr/file/222463> (3.1.2024)
44. Koundouros N., Poulgiannis G. 2018. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. *Front. Oncol.* 8:160. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00160/full>
45. Kvas, T. 2023. Spoznajmo planarije. <https://alfa-in-betta.si/spoznajmo-planarije/>
46. Lauberts, M., & Pals, M. 2021. Antioxidant Activity of Different Extracts from Black Alder (*Alnus glutinosa*) Bark with Greener Extraction Alternative. *Plants.* [https://www.mdpi.com/2223-7747/10/11/2531#:~:text=The%20antioxidant%20activity%20\(IC50,showed%20promising%20results%20in%20the](https://www.mdpi.com/2223-7747/10/11/2531#:~:text=The%20antioxidant%20activity%20(IC50,showed%20promising%20results%20in%20the)
47. Lin CMA, Cooles FAH, Isaacs JD 2020. Basic Mechanisms of JAK Inhibition. *Mediterr J Rheumatol* 2020;31(Supp 1):100-4 [https://www.researchgate.net/publication/342339514\\_Basic\\_Mechanisms\\_of\\_JAK\\_Inhibition](https://www.researchgate.net/publication/342339514_Basic_Mechanisms_of_JAK_Inhibition)
48. Lobo, D., S. Beane, W., Levin, M. 2012. Modeling Planarian Regeneration: A Primer for Reverse-Engineering the Worm. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343107/#:~:text=A%20trunk%20fragment%20cut%20from,worm%20within%201%E2%80%932%20weeks.> (2.1.2024)
49. Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. 2001. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11231909/>
50. MAPK/Erk Signaling Pathway. SinoBiological. <https://www.sinobiological.com/pathways/mapk-erk-pathway>
51. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. 1992. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1590989/#:~:text=Cytokines%20play%20a%20vital%20role,are%20classified%20into%20several%20groups>
52. Mushkina OV, Gurina NS, Konopleva MM, Bylka W, Matlawska I. 2013. Activity and total phenolic content of *alnus glutinosa* and *alnus incana* leaves. [file:///C:/Users/User/Downloads/Activity\\_and\\_total\\_phenolic\\_content%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Activity_and_total_phenolic_content%20(1).pdf)

53. Nakanishi, I., Ohkubo, K., Ogawa, Y., Matsumoto, K. I., Ozawa, T., & Fukuzumi, S. 2016. Aluminium ion-promoted radical-scavenging reaction of methylated hydroquinone derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(33), [https://www.researchgate.net/publication/305743300\\_Aluminium\\_ion-promoted\\_radical-scavenging\\_reaction\\_of\\_methylated\\_hydroquinone\\_derivatives](https://www.researchgate.net/publication/305743300_Aluminium_ion-promoted_radical-scavenging_reaction_of_methylated_hydroquinone_derivatives)
54. Paul MK, Mukhopadhyay AK. 2004. Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci*. [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1074718/#:~:text=Tyrosine%20kinases%20are%20enzymes%20that,dimerization%20\(except%20Insulin%20receptor](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1074718/#:~:text=Tyrosine%20kinases%20are%20enzymes%20that,dimerization%20(except%20Insulin%20receptor)
55. Pests In the Aquarium, Planaria. *Aquarium Science*. <https://aquariumscience.org/index.php/10-13-3-planaria/>
56. Peterson, B., 2023. Benefits of Alder Cones in Botanical Method Aquariums. [https://bettabotanicals.com/blogs/bens-aquarium/alder-cones-for-the-aquarium#:~:text=As%20they%20decompose%2C%20alder%20cones,%20DpH%2C%20tinted%20water%20ecosystems.\(5.1.2024\)](https://bettabotanicals.com/blogs/bens-aquarium/alder-cones-for-the-aquarium#:~:text=As%20they%20decompose%2C%20alder%20cones,%20DpH%2C%20tinted%20water%20ecosystems.(5.1.2024))
57. PI3K-Akt Signaling Pathway. *SinoBiological*. <https://www.sinobiological.com/pathways/akt-signaling-pathway>
58. Pirotte N, Stevens AS, Fraguas S, Plusquin M, Van Roten A, Van Belleghem F, Paesen R, Ameloot M, Cebrià F, Artois T, Smeets K. 2015. Reactive Oxygen Species in Planarian Regeneration: An Upstream Necessity for Correct Patterning and Brain Formation. *Oxid Med Cell Longev*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26180588/>
59. Planaria Glass Traps, 3 entrances. *GarnelenHaus*. <https://www.garnelenhaus.com/gh-goods/planaria-trap-glass-3-entrances>
60. Planarian flatworms: Detection and treatment of harmful flatworms. [https://www.aquasabi.com/aquascaping-wiki\\_parasites\\_planarian-flatworms#:~:text=Flublenol%20contains%20the%20active%20substance,the%20planarians%20will%20eventually%20starve.\(5.1.2024\).](https://www.aquasabi.com/aquascaping-wiki_parasites_planarian-flatworms#:~:text=Flublenol%20contains%20the%20active%20substance,the%20planarians%20will%20eventually%20starve.(5.1.2024).)
61. Rah B, Rather RA, Bhat GR, Baba AB, Mushtaq I, Farooq M, Yousuf T, Dar SB, Parveen S, Hassan R, Mohammad F, Qassim I, Bhat A, Ali S, Zargar MH, Afroze D. 2022. JAK/STAT Signaling: Molecular Targets, Therapeutic Opportunities, and Limitations of Targeted Inhibitions in Solid Malignancies. *Front Pharmacol*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8987160/#:~:text=Thus%2C%20the%20activation%20of%20JAK,et%20al.%2C%202019>
62. R. P. Dean, M., M. Duncan, E., 2020. Laboratory Maintenance and Propagation of Freshwater Planarians. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941200/#:~:text=Many%20planarian%20species%20reproduce%20sexually,Grasso%20%26%20Benazzi%2C%201973\).\(1.1.2024\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941200/#:~:text=Many%20planarian%20species%20reproduce%20sexually,Grasso%20%26%20Benazzi%2C%201973).(1.1.2024))

63. Raut R, Gupta P, Saini T, Mishra P, Misra A, Chapter 17 - Src kinase: An attractive therapeutic target for prostate cancer, Protein Kinase Inhibitors, Academic Press, 2022, Pages 479-503.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323912877000296#:~:text=In%20prostate%20cancer%2C%20these%20kinases,different%20stages%20of%20clinical%20trials.>
64. Reddien, PW. 2013. Specialized progenitors and regeneration. Development (Cambridge, England). <https://europepmc.org/article/pmc/3583037>
65. Reddien, PW. 2020. The cellular and molecular basis for planarian regeneration. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7706840/> (3.1.2024)
66. Rhinogobius rubromaculatus. Aquarium Glaser, GmbH. [https://www.aquariumglaser.de/en/25-perchlike-fishes/25f-perchlike-fishes-6-gobies/rhinogobius\\_rubromaculatus\\_en/](https://www.aquariumglaser.de/en/25-perchlike-fishes/25f-perchlike-fishes-6-gobies/rhinogobius_rubromaculatus_en/)
67. Rompolas, P., Patel-King, R., M. King, S. 2009. Methods in cell biology. Chapter 4 - Schmidtea mediterranea: A Model System for Analysis of Motile Cilia. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0091679X08930041> (20.12.2023)
68. Salgado de Oliveira, M. , Ruiz Lopes, K. A., Sarmeiro Corrêa Marciano Leite, P. M., Rodrigues de Campos Velho, N. M., 2018. Physiological evaluation of the behavior and epidermis of freshwater planarians (Girardia tigrina and Girardia sp.) exposed to stressors. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6031348/> (26.12.2023).
69. Science With Tal. 2023. MAPK Pathway Of Receptor Tyrosine Kinase Explained: Clip. <https://youtu.be/ceBCFIPcPOA?si=2ennJQWy9MysQ1Ux>
70. Shawky AM, Almalki FA, Abdalla AN, Abdelazeem AH, Gouda AM. 2022. A Comprehensive Overview of Globally Approved JAK Inhibitors. Pharmaceutics. [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9146299/#:~:text=Janus%20kinase%20\(JAK\)%20is%20a,%2C%20immune%2C%20and%20cancer%20conditions](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9146299/#:~:text=Janus%20kinase%20(JAK)%20is%20a,%2C%20immune%2C%20and%20cancer%20conditions)
71. Sket, B., Gogala, M., Kuštor, V., 2003. Živalstvo Slovenije: Vrtinčarji. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana.
72. Slovar strokovnih pojmov v varstvu gozdov. Varstvo gozdov Slovenije. <https://www.zdravgozd.si/prirocnik/slovar.aspx?crka=%C5%A0>
73. Song, J.H., So, E.Y., Lee, C.E. 2002. Increased Serine Phosphorylation and Activation of STAT1 by Oncogenic Ras Transfection, Molecules and Cells, Volume 13, Issue 2. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1016847823150400#:~:text=Serine%20phosphorylation%20has%20been%20specifically,\(S%20FT\)P](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1016847823150400#:~:text=Serine%20phosphorylation%20has%20been%20specifically,(S%20FT)P)

74. Spiegelman, M., L Dudley, P. 1973. Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: A light and electron microscopic study. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30336649/#:~:text=A%20precise%20sequence%20of%20four,%2C%20growth%3B%20IV%2C%20differentiation> (10.12.2023).
75. Tasaki J, Shibata N, Nishimura O, Itomi K, Yoshimichi Tabata, Fuyan Son, Nobuko Suzuki, Ryoko Araki, Masumi Abe, Agata K, Umesono Y. 2011. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. <https://journals.biologists.com/dev/article/138/12/2417/44442/ERK-signaling-controls-blastema-cell>
76. Understanding antioxidants 2019. Harvard Medical School : Harvard Health Publishing. <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/understanding-antioxidants#:~:text=Antioxidants%20neutralize%20free%20radicals%20by,other%20cells%20in%20the%20body>
77. Van Huizen AV, Hack SJ, Greene JM, Kinsey LJ, Beane WS. 2022. Reactive Oxygen Species Signaling Differentially Controls Wound Healing and Regeneration. [https://www.researchgate.net/publication/359841082\\_Reactive\\_Oxygen\\_Species\\_Signaling\\_Differentially\\_Controls\\_Wound\\_Healing\\_and\\_Regeneration](https://www.researchgate.net/publication/359841082_Reactive_Oxygen_Species_Signaling_Differentially_Controls_Wound_Healing_and_Regeneration)
78. Vila-Farré M, Rozanski A, Ivanković M, Cleland J, Brand JN, Thalen F, Grohme MA, von Kannen S, Grosbusch AL, Vu HT, Prieto CE, Carbayo F, Egger B, Bleidorn C, Rasko JEJ, Rink JC. 2023. Evolutionary dynamics of whole-body regeneration across planarian flatworms. *Nat Ecol Evol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37857891/>
79. Ware TB, Hsu KL. 2021. Advances in chemical proteomic evaluation of lipid kinases-DAG kinases as a case study. *Curr Opin Chem Biol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34311404/>
80. What is the mechanism of Tannic Acid? 2024. <https://synapse.patsnap.com/article/what-is-the-mechanism-of-tannic-acid>
81. Wikipedia, The Free Encyclopedia. <https://www.wikipedia.org/>
82. Williams, J. J. L., Munro, K. M. A., & Palmer, T. M. (2014). Role of Ubiquitylation in Controlling Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3) Function and Expression. *Cells*, 3(2), 546-562. <https://www.mdpi.com/2073-4409/3/2/546>
83. Youness, AR., Kamel, R., A. Elkasabgy, N., Shao, P., & A. Farag, M. 2021. Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement; A Comprehensive Review. *Molecules*, 26(5), 1486. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/5/1486>
84. Zou, Z., Tao, T., Li, H. et al. 2020. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci* 10, 31. <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-020-00396-1#:~:text=The%20mTOR%20signaling%20pathway%2C%20which,important%20role%20in%20tumor%20metabolism>

Sever, J. A., Zatiranje planarij v akvariju z vodnimi ekstrakti izbranih rastlinskih vrst  
Raziskovalna naloga, ŠC Velenje, Gimnazija, 2025

85. Zhaban, N., Kamashev, D., Emelianova, A., & Buzdin, A. (2024). Targeted Inhibitors of EGFR: Structure, Biology, Biomarkers, and Clinical Applications. *Cells*, 13(1), 47. <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/1/47>
86. Zidorn, C.; Pacifico, S. Formato, M.; Piccolella, S. 2021 UHPLC-HRMS Analysis of *Fagus sylvatica* (Fagaceae) Leaves: A Renewable Source of Antioxidant Polyphenols. *Antioxidants* 2021, 10, 1140. <file:///C:/Users/User/Downloads/antioxidants-10-01140-v2.pdf>

## **ZAHVALA**

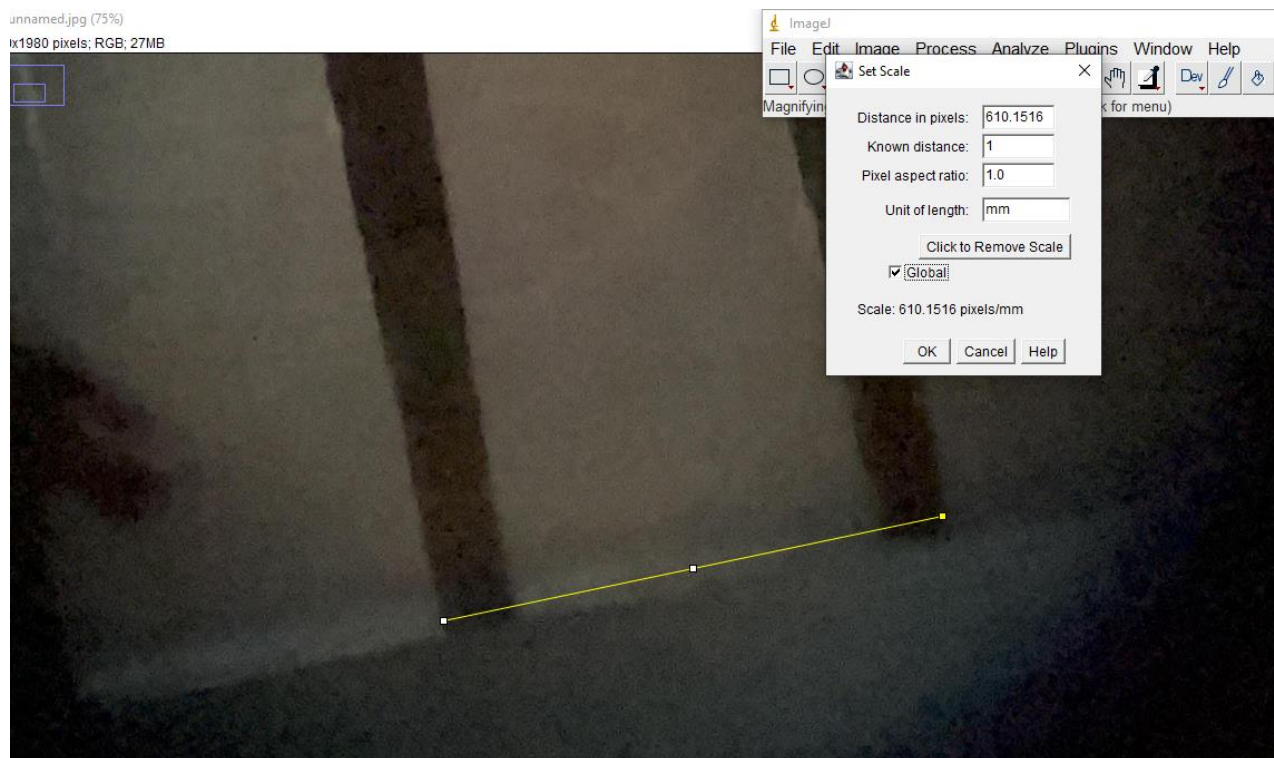
Iskreno se zahvaljujem mentorici Ireni Štimac, univ. dipl. biol., za vso podporo med raziskovanjem. Hvala tudi profesorici Polonci Glojek za lektoriranje celotne raziskovalne naloge in Darji Joger Avberšek za lektoriranje angleških prevodov.

Prisrčno pa se zahvaljujem moji družini, ki me je skozi raziskovanje podpirala in mi vedno stala ob strani tudi ob najtežjih časih.

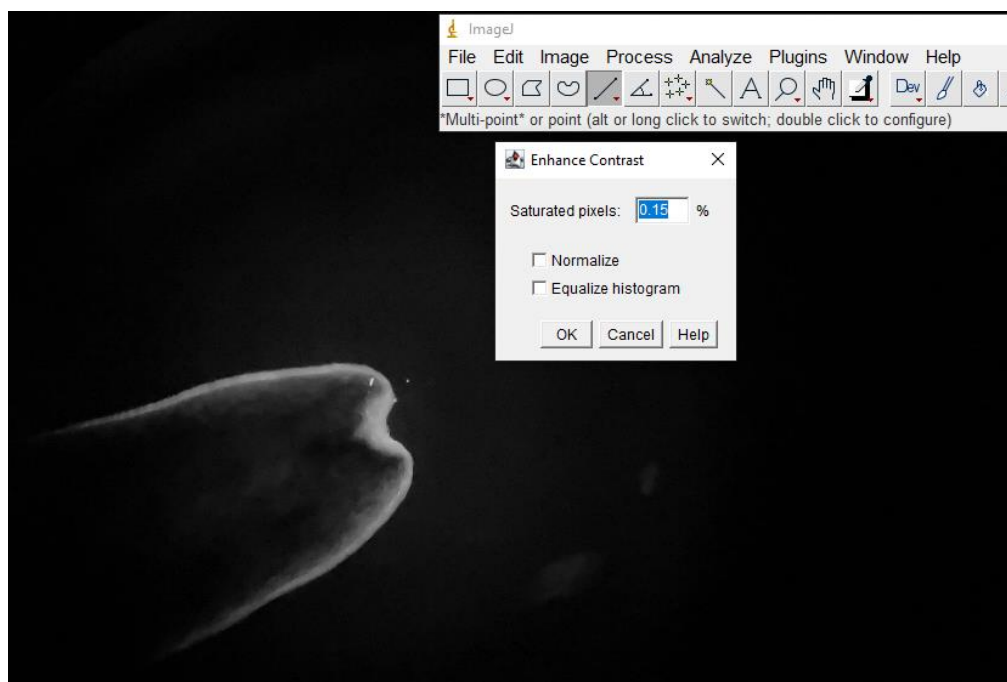
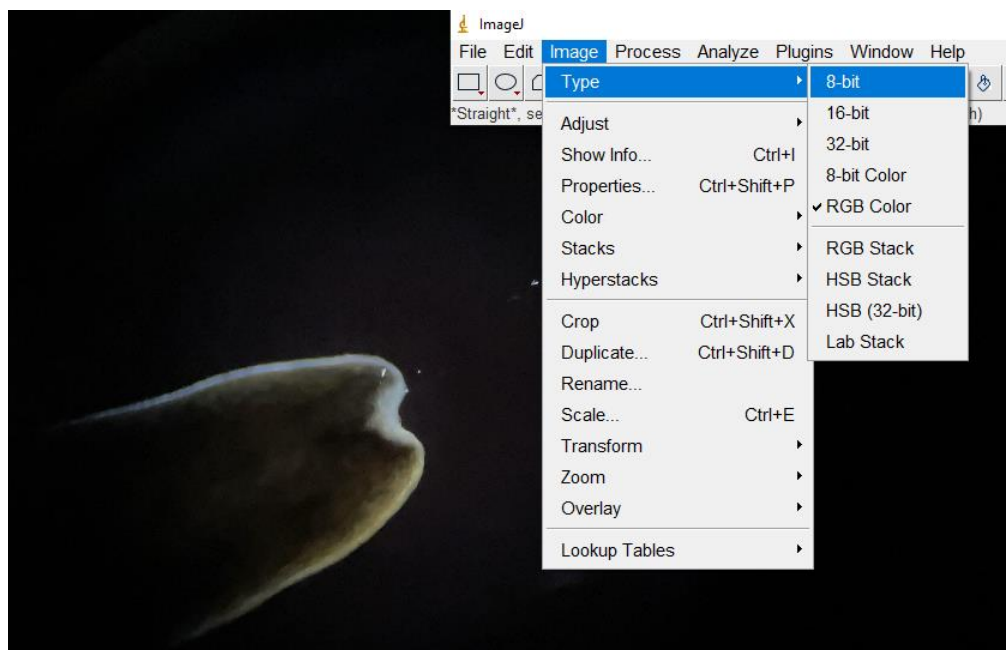
### Priloga A: Postopki merjenja površine blastme s programom ImageJ

1. Osebek prenesemo pod mikroskop s temnim vidnim poljem, na katerega je nameščena kamera. Predhodno pod mikroskop vstavimo tudi geotrikotnik in z njim določimo merilo (Analyze > Set scale in označimo Global).
2. Osebke slikamo, ko so v iztegnjeni drži, slike pa naj bodo kvalitetne.
3. Slike osebkov z nastajajočo blastemo nato odpremo v programu ImageJ.
4. Sliko pretvorimo v črno-belo (Image > Type > 8 bit) in povečamo kontrast med blastemo in črno podlago (Process > Enhance Contrast > 0.15% > OK).
5. Izrežemo del slike, tako da bo blastema povečana, vseeno pa se vidi še nekaj podlage (z »rectangle« orodjem označimo blastemo > Duplicate > OK ).
6. Označimo blastemo (Image > Adjust > Threshold; označeno je Default; Red; Dark background; Don't reset range; in prilagodimo, da rdeče polje zavzema celotno blastemo > pritisnemo Apply).
7. Na koncu pa izmerimo še površino blasteme (Analyze > Analyze particles > označimo Show: Outlines; Display results; Clear results; Include holes in Overlay > OK).
8. S klikom na OK se nam prikažejo vrednosti izmerjenih površin za posamezno oštevilčeno območje. Rezultate odčitamo iz tistega območja, na kateremu je blastema.

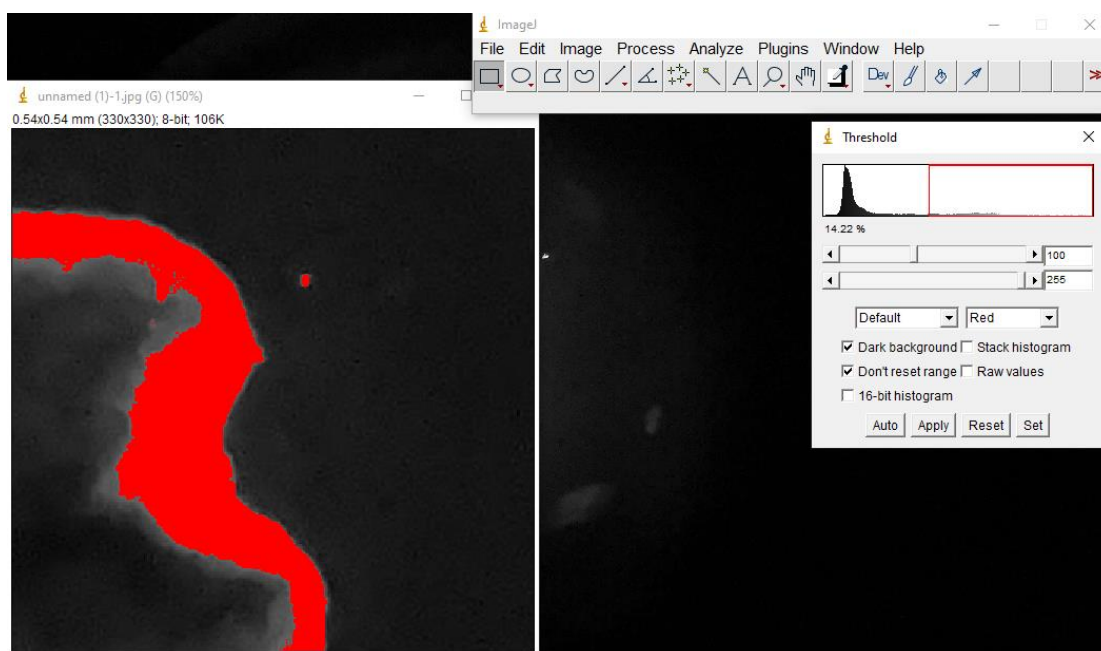
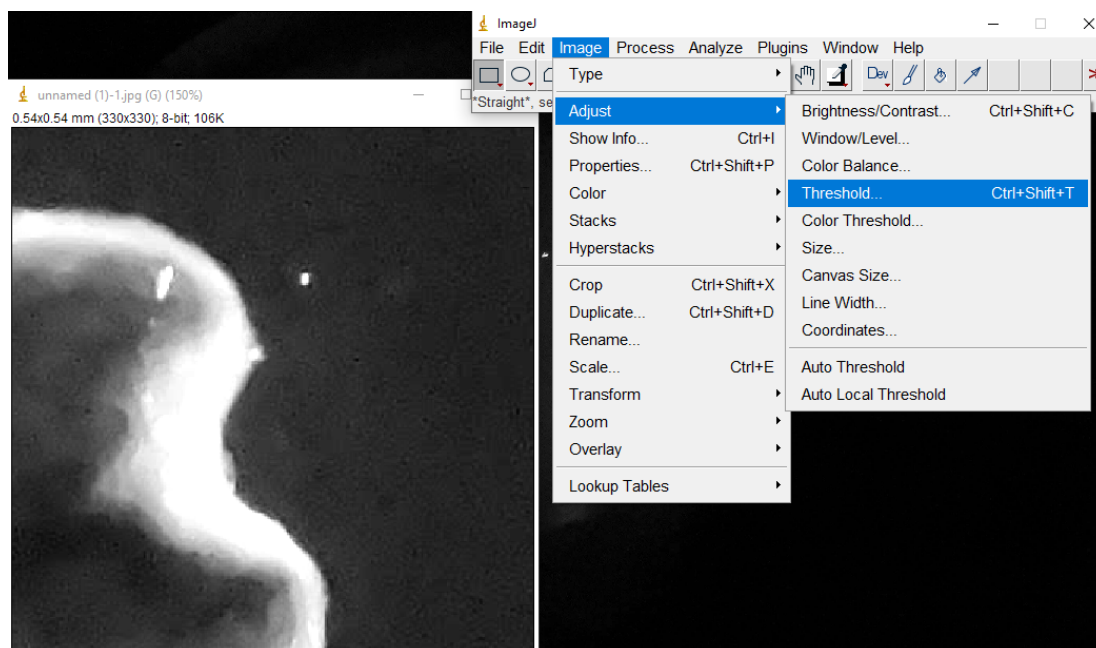
1.

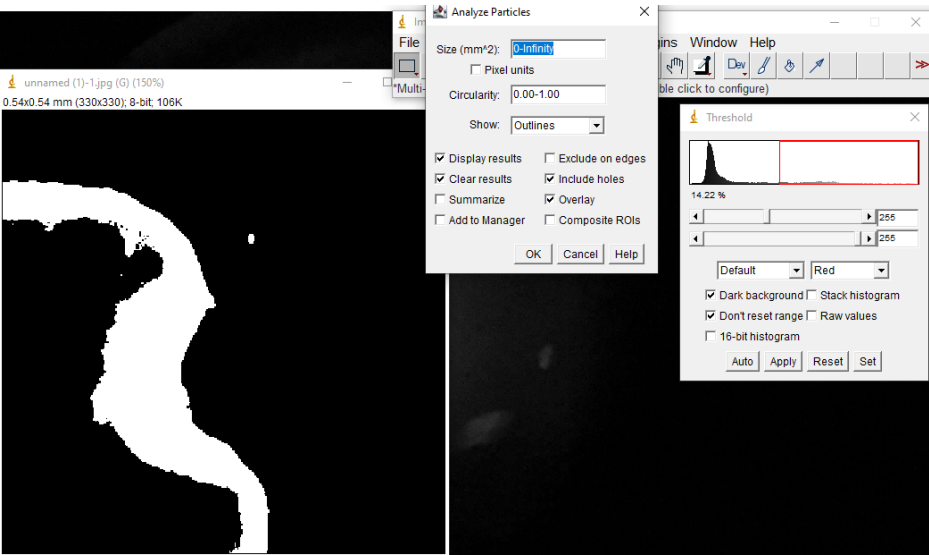
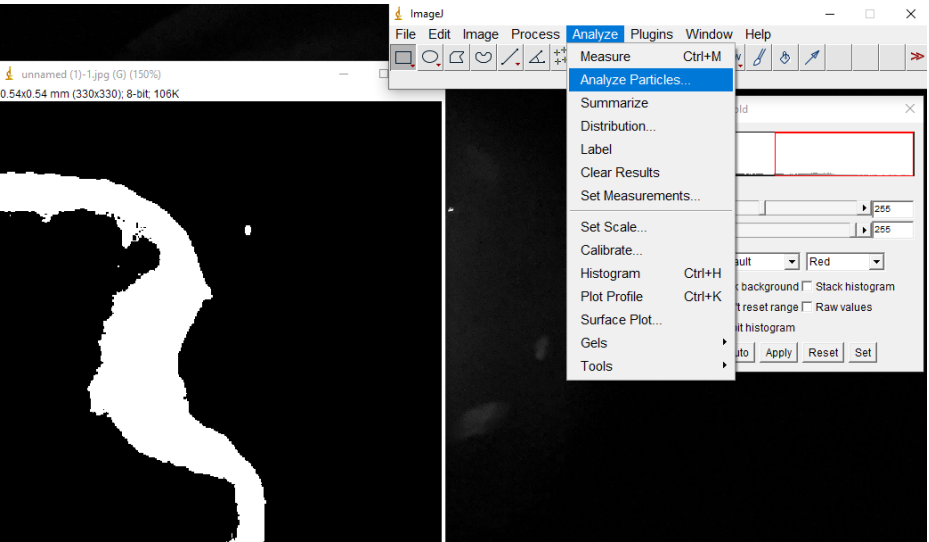


4.



6.





8.

