

Wpływ kwercetyny na powstawanie*) anomalii plemnikowych u myszy

HANNA CZECZOT, MAŁGORZATA PODSIAD

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Czczot H., Podsiad M.

Effects of quercetin on the induction of sperm abnormalities in mice

Summary

The aim of this study was to determine the effects of quercetin on inducing abnormal sperm morphology in mice. 11, 14-week old mice (CFW x C57BL) F1 received a single injection of quercetin intraperitoneally at a dose of 100 mg/kg body weight (b.w.) and a total cumulative dose of 500 mg/kg b.w. was administered fractionally for 5 successive days (100 mg/kg b.w. per day). 7 and 35 days after injection the animals were put down and their sperm examined for morphological abnormalities. Quercetin at a dose of 100 and 500 mg/kg b.w. five weeks after the final injection significantly increased the frequency of sperm abnormalities (amorphous heads, and banana-like heads, twin tails). It was noted that abnormality in the shape of sperm heads was dose-dependent. 26.86% of abnormal sperm was observed with a total quercetin dose (500 mg/kg b. wt.) compared to the control of 0.92%.

The positive results with quercetin in this assay indicate that the latter induces a disruption of spermatogenesis in mice leading to an increased level of abnormal sperm heads. Data obtained in this work suggest that quercetin affects spermatogenesis at the very initiation of the process, interfering with spermatogenic cell proliferation and differentiation.

Keywords: mice, sperm; quercetin

Kwercetyna (3,3',4',5,7 pentahydroksyflawon) jest najbardziej rozpowszechnionym flawonoidem obecnym w roślinach i produktach roślinnych. Występuje w nich głównie w postaci glikozydów, w których jest ona połączona z glukozą, ramnozą lub arabinozą (2).

Przez długi czas kwercetynę i inne flawonoidy uważano za substancje chemiczne o niskiej toksyczności i nie wykazujące odległych skutków działania na organizmy żywe. W związku z tym dużym zaskoczeniem były wyniki badań opublikowane w latach 70. XX w. wskazujące na mutagenne działanie kwercetyny (1). Od tego momentu wzrosło zainteresowanie kwercetyną jako składnikiem roślinnego pokarmu ludzi i zwierząt, i rozpoczęto intensywne badania jej wpływu na organizmy żywe.

Działanie genotoksyczne kwercetyny zostało potwierdzone testem Ames w układach bakteryjnych i testach przeprowadzonych na komórkach ssaków (3, 16, 20). Wykazano, że kwercetyna indukowała *in vitro* oraz *in vivo* różnego typu uszkodzenia w materiale genetycznym komórki (mutacje punktowe, system SOS, aberracje chromosomowe, mikrojądra, pęknięcia nici DNA i inne) (4, 6, 18, 21, 26). Ponadto zaobserwowano, że może ona nasilać działanie mutagenne

niektórych związków chemicznych. Najwięcej danych dotyczy komutacyjnego i kokancerogenego działania kwercetyny *in vitro* w stosunku do heterocyklicznych i trójcyklicznych amin aromatycznych (22, 23). Należy jednak podkreślić, że wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo* są często kontrowersyjne, a nawet wątpliwe (17, 28, 37). Podobne rozbieżności dotyczą również informacji na temat rakotwórczego działania kwercetyny (11-14, 19). Szczególnie kontrowersyjne są dane opublikowane na temat cancerogenego działania kwercetyny *in vivo*. W długoterminowych badaniach przeprowadzonych na gryzoniach wykazano, że duże dawki kwercetyny indukują gruczolaki i gruczoloraki kanalików nerkowych, raki jelita grubego i pęcherza moczowego u szczurów (7, 25). U myszy z czerniakiem melanocytynym kwercetyna przyspieszała rozwój guza pierwotnego i nasilała przerzuty do płuc. Dochodziło do szybszego rozwoju nowej sieci naczyń krwionośnych w rozwijającym się guzie (24).

Jednak większość badań na zwierzętach nie potwierdza zdolności kwercetyny do indukcji mutacji i cancerogenezy. Wyniki ostatnich lat badań wskazują, że kwercetyna może działać antymutagenie i antycancerogenie. Wykazano, że zmniejsza ona efekty działania wielu mutagenów bezpośrednich (np. MNNG)

*) Praca finansowana z tematu prac własnych AM w Warszawie nr 1WK/W2/2005.

i pośrednich (np. AFB1) (8, 9). Okazało się, kwercetyna jest zdolna do modulowania aktywności enzymów zaangażowanych w I i II fazie metabolizmu ksenobiotyków. Dotyczy to zarówno podwyższania, jak i obniżenia ich aktywności (31, 32). Wykazano, że kwercetyna zmniejsza aktywność cytochromu P-4501A1 (CYP1A1), który jest odpowiedzialny za przekształcenie benzo/a/pirenu do pochodnych epoksydowych, czego konsekwencją jest zmniejszenie ilości adduktów DNA oraz nowotworów skóry (29). Uczestniczy również w zmianach aktywności enzymów II fazy, obejmujących reakcje sprzęgania. Może powodować zarówno wzrost aktywności transferazy UDP-glukuronowej, jak i obniżenie aktywności S-transferazy glutationowej w wątrobie szczura (30, 38).

Pomimo intensywnych badań nad działaniem kwercetyny i innych flawonoidów na organizmy żywe ciągle brakuje aktualnych danych na temat ich wpływu na plemniki ssaków.

Celem obecnych badań była ocena wpływu kwercetyny na indukcję uszkodzeń w DNA męskich komórek płciowych myszy i powstawanie anomalii plemnikowych w czasie spermatogenezy.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy AM Warszawie na 11-14 tygodniowych samcach myszy pokolenia F1 – krzyżówki szczepów CFW × C57BL, które pochodziły ze zwierzętarni Akademii Medycznej w Warszawie. W trakcie trwania doświadczenia zwierzęta przetrzymywano w klatkach z tworzywa sztucznego. Wszystkie otrzymywały standardowy granulowany pokarm firmy Bacutil i wodę *ad libitum*. Zachowany był rytm dobowy (dzień/noc). Zwierzęta podzielono na grupy doświadczalne po 9 myszy w każdej grupie. Wykonano dwa oddzielne doświadczenia.

W celu określenia wpływu kwercetyny na powstawanie wad morfologicznych plemników zastosowano test anomalii plemnikowych (Sperm - abnormality Assay - test mouse sperm morphology). Pozwala on na wykazanie, czy zwiększenie w nasieniu ilości plemników o zmienionej morfologii jest konsekwencją indukcji przez badany związek zmian (mutacji) w materiale genetycznym (DNA) i zaburzenia procesu spermatogenezy (34).

Podawanie zwierzętom testowanych związków. Kwercetynę (firmy Aldrich) rozpuszczoną w oleju słonecznikowym (0,1 ml) podawano myszom w dwójaki sposób: grupa A – w jednorazowej iniekcji dootrzewnowej, w dawce 100 mg/kg masy ciała; grupa B – w 5-krotnej iniekcji dootrzewnowej przez 5 kolejnych dni (łącznie dawka kwercetyny – 500 mg/kg masy ciała). Kontrolę negatywną stanowiły myszy, które otrzymywały dootrzewnowo olej słonecznikowy w ilości 0,1 ml. Dodatkowo, w celu określenia liczby spontanicznych anomalii plemnikowych dla pokolenia F1 myszy krzyżówki CFW × C57BL, do układu doświadczalnego została włączona grupa myszy, która nie otrzymywała żadnych związków chemicznych. Kontrolą pozytywną był benzo/a/piren (B/a/P) podawany dootrzew-

nowo myszom przez 5 kolejnych dni w ilości 100 mg/kg masy ciała (łącznie dawka 500 mg/kg masy ciała). Zwierzęta przetrzymywano w klatkach 7 i 35 dni.

Analiza anomalii plemnikowych. Plemniki 11-14-tygodniowych samców myszy pokolenia F1 krzyżówki szczepów CFW × C57BL badano po 7 i 35 dniach od momentu podania kwercetyny. Zwierzęta usypiano eterem, a preparaty plemników przygotowywano wg metody opisanej przez Krzanowską (15).

Plemniki usuwano przez delikatne naciskanie ogona nądrzy pozwalające na ich przejście do nasieniowodów. Następnie plemniki wyciskano z nasieniowodów na szkiełka mikroskopowe z łezką i zawieszano w 0,2 ml soli fizjologicznej. Z otrzymanej zawiesiny przygotowywano na szkiełkach po 3 preparaty. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej (24 godz.) preparaty utrwalano 15 min. w roztworze absolutnego alkoholu etylowego i kwasu octowego lodowatego w stosunku 3 : 1. Następnie barwiono je 30 min. w 1% roztworze eozyny Y. Gotowe preparaty obserwowano w mikroskopie świetlnym produkcji PZO typ MB 30 przy powiększeniu 600 ×. Analizowano po 1000 plemników w każdym preparacie. Anomalie plemnikowe klasyfikowano wg Wyrobka i wsp. (34, 35).

Dla każdego układu określano odsetek plemników o zmienionej morfologii. Przed odczytem preparaty – rozmaży z plemników odpowiednio znakowano, w ten sposób, że osoba oglądająca je pod mikroskopem nie znalazła dawki badanych związków chemicznych. Zawsze jedna osoba analizowała wszystkie przygotowane preparaty z każdego, oddzielnego przeprowadzonego doświadczenia. W celu wyeliminowania błędów preparaty – rozmaży plemników oglądały 2 osoby, a otrzymane wyniki porównywano. Wyniki przedstawiono w postaci średniej liczonej łącznie z 2 oddzielnych doświadczeń i wyrażono jako procent plemników o zmienionej morfologii ± SEM. Ocena statystyczną otrzymanych wyników oparto na porównaniu danych uzyskanych dla negatywnej grupy kontrolnej, pozytywnej grupy kontrolnej (po podaniu myszom B/a/P oraz indywidualnej grupy badanej (po podaniu kwercetyny) stosując nieparametryczny test Kolmogorowa-Smirnova (5).

Wyniki i omówienie

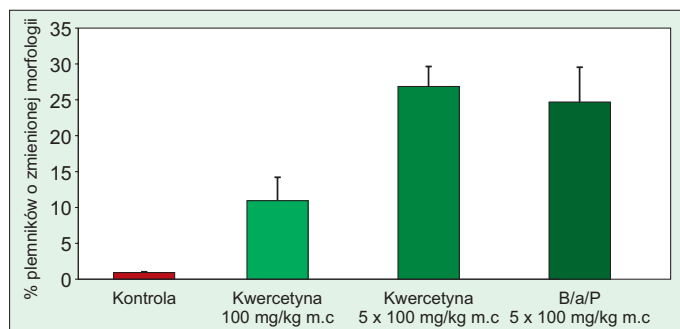
Wyniki badań wpływu kwercetyny na indukcję plemników o zmienionej morfologii w nasieniu myszy przedstawione w tab. 1 i na ryc. 1 wskazują, że kwercetyna jest związkiem, który dociera do gonad i w czasie spermatogenezy i spermogenezy oddziałuje na proces różnicowania się komórek rozrodczych u samców myszy rasy (CFW × C57BL) F1. Wykazano, że liczba spontanicznych anomalii plemnikowych dla pokolenia F1 myszy krzyżówki CFW × C57BL wynosiła średnio $0,80 \pm 0,55$. W grupach kontrolnych, w których zwierzętom podawano sam olej słonecznikowy w sposób identyczny z podawaniem kwercetyny nie stwierdzono różnic w liczbie plemników o zmienionej morfologii zarówno po 1, jak i po 5 tygodniach od chwili jego podania.

Kwercetyna podana myszom dootrzewnowo w dawce jednorazowej 100 mg/kg masy ciała, jak i w dawce

Tab. 1. Wpływ kwercetyny na indukcję plemników o zmienionej morfologii w nasieniu samców myszy (CFW × C57BL) F1 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 18)

Badany związek Podawana dawka w mg/kg masy ciała	Procent plemników o zmienionej morfologii	
	czas działania 7 dni	czas działania 35 dni
Kontrola – olej słonecznikowy (0,1 ml)	0,94 ± 0,10	0,92 ± 0,12
Kontrola pozytywna benzo/a/piren (B/a/P) 100 mg/kg masy ciała × 5 dni	1,15 ± 0,09	24,7 ± 3,26 ^a
Kwercetyna 100 mg/kg masy ciała × 1 dzień	0,78 ± 0,23	10,95 ± 2,79 ^{a,b}
Kwercetyna 100 mg/kg masy ciała × 5 dni	0,68 ± 0,29	26,86 ± 4,84 ^{a,b}

Objaśnienia: każdy wynik przedstawiano jako średni % zmienionych plemników liczonych w 1000 plemników każdego zwierzęcia; a – różnice statystycznie istotne przy ($p < 0,005$) między 7. a 35. dniem doświadczenia, b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,005$) między dawką kwercetyny 100 mg/kg masy ciała a dawką kumulacyjną 500 mg/kg masy ciała



Ryc. 1. Efekt antyspermatogenego działania kwercetyny

łącznej 500 mg/kg masy ciała (5×100 mg/kg masy ciała/dzień) po 7 dniach od chwili jej podania nie zwiększała liczby zmienionych morfologicznie plemników w porównaniu z wynikami uzyskanymi w kontrolnej grupie zwierząt. Natomiast po upływie 35 dni od jednorazowego podania myszom 100 mg kwercetyny/kg masy ciała, a więc po okresie, kiedy plemniki, na które kwercetyna działała w procesie spermatogenezy i spermiogenezy osiągnęły *cauda epididymis*, zwiększała się liczba plemników o zmienionej morfologii do 10,95% w grupie badanej, podczas gdy w grupie kontrolnej procent ten wynosił 0,92%.

Jeszcze silniejszy efekt działania kwercetyny na plemniki obserwowano po 5-krotnym jej podaniu zwierzętom w dawce 100 mg/kg masy ciała \times dzień⁻¹. Po 35 dniach od chwili podania ostatniej dawki kwercetyny liczba plemników o zmienionej morfologii wzrosła do 26,86% w stosunku do 0,92% w grupie kontrolnej i ponad 2,5-krotnie w porównaniu z wynikami uzyskanymi po 7 dniach od chwili jej podania.

Zbliżony wzrost anomalii plemnikowych (24,7%) obserwowano po 35 dniach od dootrzewnowego podania myszom znanego modelowego mutagenu i kan-

cerogenu – B/a/P w dawce 100 mg/kg masy ciała przez okres 5 kolejnych dni (łącznie 500 mg/kg masy ciała). Natomiast po 7 dniach od chwili podania myszom B/a/P procent zmienionych plemników wynosił 1,15% i podobnie jak w przypadku kwercetyny pozostawał na poziomie obserwowanym w grupie kontrolnej.

Porównując poziom anomalii plemnikowych w grupie kontrolnej myszy i grupach badanych, w których oceniano zmiany w morfologii plemników po 7 dniach od momentu podania kwercetyny i B/a/P, nie stwierdzono istotnych różnic. Natomiast statystycznie istotne różnice ($p < 0,005$) wykazano po 35 dniach w grupie myszy, którym podano dootrzewnowo kwercetynę w dawce jednorazowej i wielokrotnej/kumulowanej oraz w grupie myszy poddanych działaniu B/a/P (kontrola pozytywna) w porównaniu z grupą zwierząt otrzymujących tylko olej. Stwierdzono również statystycznie istotny wzrost anomalii plemnikowych po 35 dniach od podania myszom wyższej dawki kwercetyny (łącznie 500 mg/kg masy ciała) w porównaniu z efektami działania 100 mg kwercetyny/kg masy ciała, co wskazuje na zależność dawka–efekt.

Najczęściej obserwowanymi wadami morfologicznymi plemników, powstającymi pod wpływem działania kwercetyny czy B/a/P były przede wszystkim nieprawidłowe – bezkształtne główki, główki o kształcie banana lub haczyka oraz podwojone witki. Przedstawione wyniki są zbliżone do tych jakie, uzyskali Rastogi i Levin (27). Wiadomo, że wiele związków chemicznych może indukować anomalie plemnikowe. Wykazano, że podawanie zwierzętom związków mutagennych prowadzi do zaburzeń procesu spermatogenezy, co w konsekwencji zwiększa liczbę plemników o zmienionej morfologii (36). Stwierdzono, że ok. 90% związków, które indukują anomalie plemnikowe u myszy wykazuje działanie mutagenne lub kancerogenne (10, 33, 34). Dane piśmiennictwa wskazują, że zmiany w morfologii plemników powstają w wyniku indukcji przez tego typu związki mutacji punktowych i aberracji chromosomalnych (małych delecji lub translokacji chromosomów) (10, 15, 35, 36).

Uzyskane wyniki badań wskazują na zależność pomiędzy udowodnionymi w testach bakteryjnych właściwościami mutagennymi kwercetyny a zdolnością do indukcji anomalii plemnikowych. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że jądra ssaków są organem docelowego działania kwercetyny, gdzie indukuje ona zmiany w DNA, co zaburza proces różnicowania plemników podczas spermatogenezy i spermiogenezy i prowadzi do powstawania anomalii. Zwiększona liczba plemników o zmienionej morfologii występująca w nasieniu myszy po podaniu zwierzętom w iniekcji dootrzewnowej kwercetyny wyraźnie wskazuje na jej antyspermatogenne działanie.

Piśmiennictwo

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

2. *Bravo L.*: Polyphenols chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998, 56, 317-321.
3. *Brown J. P.*: A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat. Res.* 1980, 75, 243-277.
4. *Carver J. H., Carrano A. V., MacGregor J. T.*: Genetic effects of flavonols quercetin, kaempferol and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat. Res.* 1983, 113, 45-60.
5. *Conover W. J.*: Practical nonparametric statistics. Wiley J. and Sons. Inc., New York 1971, 309-314.
6. *Czczot H., Kuzstelak J.*: A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. *Acta Biochim. Pol.* 1993, 40, 549-554.
7. *Erturck E., Nunoya T., Hatcher J. F., Pamucku A. M., Brayon G. T.*: Comparison of bracken fern and quercetin carcinogenicity in rats. *Cancer Res.* 1983, 24, 53.
8. *Francis A. R., Shetty T. K., Bhattacharya R. K.*: Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1 (AFB1) in vitro effect of plant flavonoids. *Mutat. Res.* 1989, 222, 393-401.
9. *Francis A. R., Shetty T. K., Bhattacharya R. K.*: Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1989, 10, 1953-1955.
10. *Heddle J. A., Bruce W. R.*: Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays of sperm abnormalities; formation of micronuclei and mutation in Salmonella, [w:] Hiatt H. H., Watson J. D., Winsten J. A. (wyd.): Origins of human cancer. Book C., Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1977, 1549-1557.
11. *Hirano I., Ueno I., Hosaka S., Takanashi H., Matsuhima T., Sugimura T., Natori S.*: Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett.* 1981, 13, 15-21.
12. *Hirose M., Fukushima S., Sakata T., Inui M., Ito N.*: Effect of quercetin on two-stage carcinogenesis of the rat urinary bladder. *Cancer Lett.* 1983, 21, 23-27.
13. *Anon.*: International Agency for Research on Cancer. IARC working group. Quercetin. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC, Lyon 1999, 73, 497-516.
14. *Ito N., Hagiwara A., Tamano S., Kagawa M., Shibata M., Kurata S., Fukushima S.*: Lack of carcinogenicity of quercetin in F344/DuCrj rats. *Jpn J. Cancer.* 1989, 80, 317-325.
15. *Krzanowska H.*: Sperm head abnormalities in relation to the age and strain of mice. *J. Reprod. Fertil.* 1981, 62, 385-392.
16. *MacGregor J. T., Jurd L.*: Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 1978, 54, 297-309.
17. *MacGregor J. T., Wehr C. M., Manners G. D., Jurd L., Minkler J. L., Carrano A. V.*: In vivo exposure to plant flavonols: influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Mutat. Res.* 1983, 124, 255-270.
18. *Maruta A., Enaka K., Umeda M.*: Mutagenicity of quercetin and kaempferol on cultured mammalian cells. *Gann.* 1979, 70, 273-276.
19. *Morino K., Matsukura N., Kawachi T., Ohgaki H., Sugimura T., Hirano I.*: Carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamsters by oral administration. *Carcinogenesis* 1982, 3, 93-97.
20. *Nagao M., Morita N., Yagagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fugino T., Sugimura T. M.*: Mutagenicity of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis* 1981, 3, 401-419.
21. *Nakayasu M., Sakamoto H., Terada M., Nagao M., Sugimura T.*: Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutat. Res.* 1986, 174, 79-83.
22. *Ogawa S., Hirayama T., Fujioka Y., Ozasa S., Tokuda M., Hirai K., Fukui S.*: Mutagenicity modulating effect of quercetin on aromatic amines and acetamides. *Mutat. Res.* 1987, 192, 37-46.
23. *Ogawa S., Hirayama T., Nohara M., Tokuda M., Hirai K., Fukui S.*: The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and B/a/P in *S. typhimurium* strains. *Mutat. Res.* 1985, 142, 103-107.
24. *Palagan K., Drewa G., Owczerek-Wereszko M., Sobiś M.*: Quercetin, rutin, silinin and (+)-catechin stimulate capillary proliferation in hamster bearing melanotic melanoma, [w:] Flavonoids in Biology and Medicine III. Das N.P. National University of Singapore 1989, 317-331.
25. *Pamucku A. M., Yalciner S., Hatcher J. F., Bryan G. T.*: Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.* 1980, 40, 3468-3472.
26. *Popp R., Schimmer O.*: Induction of sister chromatid exchanges (SCE), polyploidy and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures, comparative study of 19 flavonoids. *Mutat. Res.* 1991, 246, 205-213.
27. *Rastogi P. B., Levin R. E.*: Induction of sperm abnormalities in mice by quercetin. *Environ. Mutagen.* 1987, 9, 79-86.
28. *Sahu R. K., Basu R., Sharma A.*: Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 1981, 89, 69-74.
29. *Shah G. M., Bhattacharya R. K.*: Modulation by plant flavonoids and related phenolics of microsome catalyzed adduct formation between benzo(a)pyrene and DNA. *Chem. Biol. Interact.* 1986, 59, 1-15.
30. *Siess M. H., Guillemic M., Le Bon A. M., Suschetet M.*: Induction of mono-oxygenase and transferase activities in rat by dietary administration of flavonoids. *Xenobiotica* 1989, 19, 1379-1386.
31. *Siess M. H., Leclerc J., Canivenc-Lavier M. C., Rat P., Suschetet M.*: Heterogenous effects of natural flavonoids on monoxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995, 130, 73-78.
32. *Sousa R. L., Marletta M. A.*: Inhibition of cytochrome P-450 activity in rat liver microsome by the naturally occurring flavonoid quercetin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985, 240, 345-357.
33. *Topham J. C.*: The detection of carcinogen-induced sperm head abnormalities in mice. *Mutat. Res.* 1980, 69, 149-155.
34. *Wyrobek A. J., Bruce W. R.*: Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, 72, 4425-4429.
35. *Wyrobek A. J., Heddle J. A., Bruce W. R.*: Chromosomal abnormalities and the morphology of mouse sperm heads. *Can. J. Genet. Cytol.* 1975, 17, 675-679.
36. *Wyrobek A. J., Gordon L. A., Burkhart J. G., Francis M. W., Kapp R. W. Jr, Letz G., Malling H. V., Topham J. C., Whorton M. D.*: An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1983, 115, 1-72.
37. *Yoshida M. A., Sasaki M., Sugimura K., Kawachi T.*: Cytogenetic effects of quercetin on cultured mammalian cells. *Proc. Jap. Acad.* 1980, 56, 443-447.
38. *Zhang K., Das N. P.*: Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 2063-2068.

Adres autora: dr hab. Hanna Czczot, ul. Magellana 1 m. 27, 02-777 Warszawa; e-mail: hanna.czczot@wp.pl