

ANALIZA FITOESTROGENA CRVENE DETELINE

ANALYSIS OF PHYTOESTROGENS IN RED CLOVER

Bursać M¹, Atanacković M¹, Cvejić J¹, Vasiljević S²¹Zavod za farmaciju, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad²Odeljenje za krmno bilje, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, Novi Sad

SAŽETAK

Uvod: Crvena detelina (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) je jedan od značajnijih izvora fitoestrogena, od kojih su najzastupljeniji izoflavoni: daidzein, genistein, formononetin i biohanin A. Ove supstance se koriste za ublažavanje tegoba u menopauzi, a smatra se da mogu da imaju ulogu u prevenciji osteoporoze, kancera i kardioloških poremećaja.

Cilj: Cilj rad je utvrđivanje sadržaja pojedinačnih izoflavona različitih sorti crvene deteline gajenih na području Vojvodine, kao i u pojedinim delovima biljke.

Materijal i metode: Analizirano je pet sorti crvene deteline (stabljika, list i cvet). Nakon ekstrakcije, u uzorcima su identifikovani i kvantifikovani izoflavoni visoko-efikasnom tečnom hromatografijom (HPLC).

Rezultati: Sadržaj ukupnih izoflavona varira od 0,41 do 3,81 mg/g, a u proseku najzastupljeniji su u listovima (2,73±0,97 mg/g), dok stabljike crvene deteline sadrže najmanju koncentraciju tih jedinjenja (0,47±0,06 mg/g). U listovima je dominantan formononetin (prosečno 1,62±0,97 mg/g), dok je najmanji prosečni sadržaj biohanina A u stabljikama ispitivanih uzoraka (0,04±0,06 mg/g). U sorti m21 prosečna vrednost ukupnih izoflavona u stablu, listu i cvetu je najveća i iznosi 1,78±1,77 mg/g.

Zaključak: Najveća koncentracija izoflavona utvrđena je u listovima. Sorta m21 je najbogatija izoflavonima, a u svim analiziranim uzorcima, u proseku je najviše zastupljen formononetin.

Ključne reči: crvena detelina, izoflavoni, HPLC

SUMMARY

Introduction: Red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) is one of the main sources of phytoestrogens, among which are the most present isoflavones: daidzein, genistein, formononetin and biochanin A. These substances are used for reduction of menopausal symptoms, and they are considered to have certain role in prevention of osteoporosis, cancer and cardiovascular diseases.

Aim: The aim of this study was to determine content of isoflavones in different red clover cultivars, cultivated in Vojvodina, and also in their plant parts.

Material and methods: Five cultivars were analyzed (stem, leaf and flower). After extraction, isoflavones were identified and quantified in samples by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: Total isoflavone content varied between 0,41 do 3,81 mg/g, and it was on average the highest in leaves (2,73±0,97 mg/g), and the lowest in stems of red clover cultivars (0,47±0,06 mg/g). In leaves formononetin was dominant (on average 1,62±0,97 mg/g), while the lowest average content had biochanin A in stems (0,04±0,06 mg/g). Cultivar m21 had the highest average total isoflavone content in stem, leaf and flower - 1,78±1,77 mg/g.

Conclusion: The highest concentration of isoflavones was determined in leaves. Cultivar m21 was the richest in isoflavones, and on average in all analyzed samples formononetin was the most present isoflavone.

Key words: red clover, isoflavones, HPLC

Uvod

Izoflavoni su biljni proizvodi koji spadaju u klasu jedinjenja poznatoj pod nazivom fitoestrogeni ili biljni estrogeni. Fitoestrogeni takođe uključuju lignane, kumestane i gljivične estrogene [1]. Izoflavoni su polifenolne supstance strukturno bliske

estrogenima, čime se i objašnjava njihov afinitet vezivanja za humane estrogene receptore [2]. Utvrđen je veći afinitet vezivanja fitoestrogena za estrogene receptore β , u odnosu na α , a pored agonističkog dejstva, u zavisnosti od ciljnog tkiva i koncentracije izoflavona, mogu ispoljiti i antagonističko dejstvo [3-6]. Crvena detelina (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) je

biljka koja predstavlja bogat izvor fitoestrogena. Zbog toga se danas sve češće koristi kao sirovina za izradu dijetetskih suplemenata koji se primenjuju u menopauzi. Soja, koja je najpoznatiji izvor fitoestrogena u ljudskoj ishrani, ima drugačiji profil izoflavona od crvene deteline. U semenu soje najviše su prisutni genistein, daidzein i glicitein, odnosno njihove glikozidne forme [7,8]. Ekstrakti crvene deteline takođe sadrže visoku koncentraciju izoflavona – ali pretežno genisteina, daidzeina i njihovih metilovanih derivata biohanina A i formononetina, kao i odgovarajućih glikozida. Ukazano je na mogućnost upotrebe suplemenata na bazi crvene deteline kao alternative hormonskoj terapiji [9,10]. Iako su dosadašnji rezultati kliničkih studija o efikasnosti preparata sa ekstraktom crvene deteline na ublažavanje tegoba u menopauzi često oprečni [11-14], uočeno je da, između ostalog, postoji potencijal ove biljke za smanjenje težih oblika napada vrućine [15].

Klasična terapija simptoma u menopauzi podrazumeva hormonsku supstitucionu terapiju. Glavni razlog primene hormona je olakšanje vazomotornih tegoba, ali i prevencija gubitka koštane mase kao i ishemijske bolesti srca [16]. Postoje, međutim, i dokazi koji ukazuju da hormonska terapija povećava rizik od raka dojke, šloga i infarka miokarda [17]. Zbog rizika povezanih sa dugoročnom primenom ovakve terapije, ali i činjenice da je kontraindikovana kod nekih pacijentkinja [18], uočava se trend prelaska na alternativne biljne lekove [19,20].

Na tržištu Srbije postoji veći broj preparata sa fitoestrogenima koji kao sirovinu koriste crvenu detelinu, tako da je od velike važnosti utvrditi kvalitativno i kvantitativno variranje fitoestrogena u zavisnosti od sorte kao i dela biljke. Takođe, takve analize su pored farmaceutske industrije, važne i sa aspekta poljoprivrede, jer se ova biljka koristi i u stočnoj ishrani.

Cilj ovog rada je prvo preliminarno utvrđivanje sastava i koncentracije izoflavona u sortama crvene deteline uzgajanim na teritoriji

Vojvodine, kao i u različitim delovima biljke (list, cvet, stabljika).

Materijal i metode

Biljni materijal

Sorte crvene deteline dobijene su od donatora (genetske banke: Nordic Gene Bank, Sweden). Matičnjak crvene deteline je zasnovan na polju na Rimskim Šančevima početkom aprila 2009 godine, a 2010. iz drugog otkosa (prva polovina jula meseca) u fazi punog cvetanja uzeti su uzorci Švedskih sorti crvene deteline. Zatim je urađeno fizičko odvajanje zelenog uzorka na tri dela: list, stabljika i cvast, nakon čega su tako odvojeni delovi sušeni na tavanu do vazdušno suvog stanja, a zatim spakovani u papirnu ambalažu, i čuvani na suvom i tamnom mestu do analize.

Analizirano je 5 sorti crvene deteline (*Trifolium pratense L.*) poreklom iz Švedske, i to hibridne tertraploidne (4n) sorte, sa oznakama: m21, m24, m26, m28, m29, a od svake posebno list, cvet i stabljika.

Supstance i rastvarači

Korišćeni su: etanol 96% (Zorka Pharm, Šabac), metanol p.a. (POCH, Poland), sumporna kiselina p.a. (RTB Bor), hlorovodonična kiselina (POCH, Poland), acetonitril HPLC čistoće (Sigma-Aldrich) i standardne supstance - formononetin, biochanin A (Sigma-Aldrich), daidzein, genistein (ChromaDex).

Ekstrakcija izoflavona

Prethodno samleveni biljni materijal, 1 g (list, cvet ili stablo) pomešan je sa 2 ml vode i inkubiran u vodenom kupatilu 30 minuta na 37°C. Zatim je dodato 16 ml etanola i 2 ml 3M hlorovodonične kiseline, i uzorci su uz mešanje zagrevani do ključanja. Nakon hlađenja ekstrakti su filtrirani kroz filter hartiju. Metod ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE-Solid Phase Extraction) korišćen je za dalje prečišćavanje ekstrakata. Oasis HLB 3 ml kertridži kondicionirani su sa 5 ml metanola i ekvilibrisani sa 5 ml dejonizovane vode. Dodato je 1 ml biljnog ekstrakta sa 3 ml vode, ispiranje je vršeno sa 2 ml 20% metanola, a elucija sa 2

ml 80% metanola [21]. Pre HPLC analize dobijeni ekstrakti filtrirani su kroz membranske filtere (Agilent Technologies 0.45 μ m).

Kvantifikacija izoflavona

Za analizu izoflavona korišćen je Agilent 1100 series HPLC – tačni hromatograf, opremljen binarnom pumpom, degaserom, autosemplerom i DAD detektorom. Separacija izoflavona postignuta je na Zorbax SB C₁₈ koloni (250x4.6 mm, 5 μ m). Mobilna faza sastojala se od rastvarača A (voda podešena na pH=2.7 sa sumpornom kiselinom) i rastvarača B (acetonitril). Primenjeni su gradijentni program i uslovi analize kao u radu Krenn i sar. [22].

Izoflavoni su identifikovani na osnovu retencionog vremena i UV spektara odgovarajućih standardnih supstanci – daidzein, genistein, formononetin, biochanin A. Konstruisane su kalibracione krive od pet tačaka za svaki standard, sa koeficijentom korelacije $r^2 \geq 0.999$. Na osnovu kalibracionih kriva izvršena je kvantifikacija odgovarajućih izoflavona u uzorcima.

Statistička analiza

Sve analize rađene su u duplikatu, a vrednosti izražene kao srednje vrednosti uz standardne devijacije. Statistička analiza rađena je u programskom paketu Excel, uz primenu Student t-testa na nivou značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati

Ispitivani izoflavoni identifikovani su u gotovo svim ispitivanim uzorcima crvene deteline. Jedino prisustvo biohanina A nije detektovano primenjenom metodom u stabljikama sorti m21 i m28, kao i cvetu sorte m29. Najveći pojedinačni sadržaj izoflavona određen je u listu sorte m21, gde je sadržaj formononetina iznosi 2,89 mg/g (Tabela 1). Najveći sadržaj daidzeina utvrđen je u listu sorte m28 (0,50 mg/g), genisteina u listu sorte m29 (0,84 mg/g), a biohanina A u listu sorte m24 (0,57 mg/g) (Tabela 1).

Tabela 1. Sadržaj pojedinih izoflavona (mg/g) u uzorcima crvene deteline

sorta	deo	daidzein	genistein	formononetin	biohanin A
m21	stabljika	0.2297	0.0650	0.1833	/
	list	0.4434	0.1976	2.8983	0.2680
	cvet	0.1523	0.1347	0.6028	0.1619
m24	stabljika	0.1313	0.1564	0.1021	0.0225
	list	0.3528	0.3175	2.3822	0.5668
	cvet	0.1428	0.1683	0.3345	0.1947
m26	stabljika	0.1915	0.0950	0.1447	0.0340
	list	0.2163	0.5283	0.9071	0.0926
	cvet	0.1979	0.1993	0.0897	0.0446
m28	stabljika	0.1039	0.2242	0.0925	/
	list	0.5028	0.7749	1.2144	0.1984
	cvet	0.3267	0.4614	0.2382	0.1162
m29	stabljika	0.1327	0.1268	0.1636	0.1507
	list	0.1199	0.8446	0.6872	0.1667
	cvet	0.3336	0.1334	0.0777	/

*date su srednje vrednosti merenja, a standardne devijacije su $\leq 0,18$

Rezultati analize pokazuju da je generalno u svim ispitivanim sortama i njihovim biljnim delovima najzastupljeniji formononetin, koji čini u proseku polovinu sadržaja ukupnih

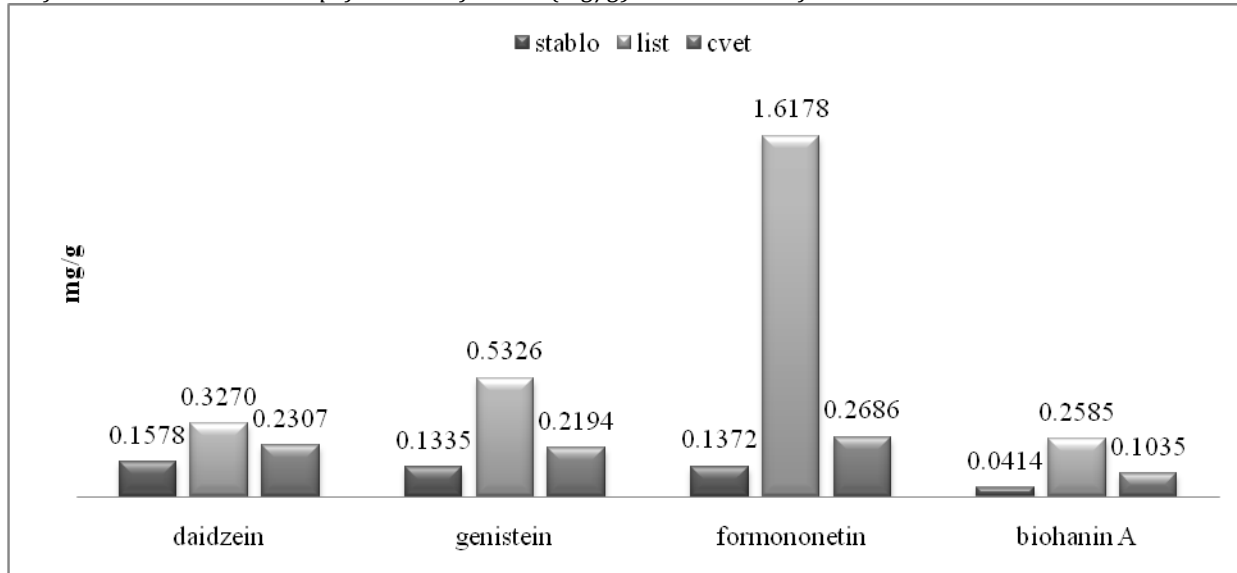
ispitivanih izoflavona sa sadržajem 0,67 mg/g. U proseku je u analiziranim uzorcima najmanje zastupljen biohanin A (0,13 mg/g), dok je

prosečni sadržaj genisteina 0,24 mg/g, a daidzeina 0,29 mg/g.

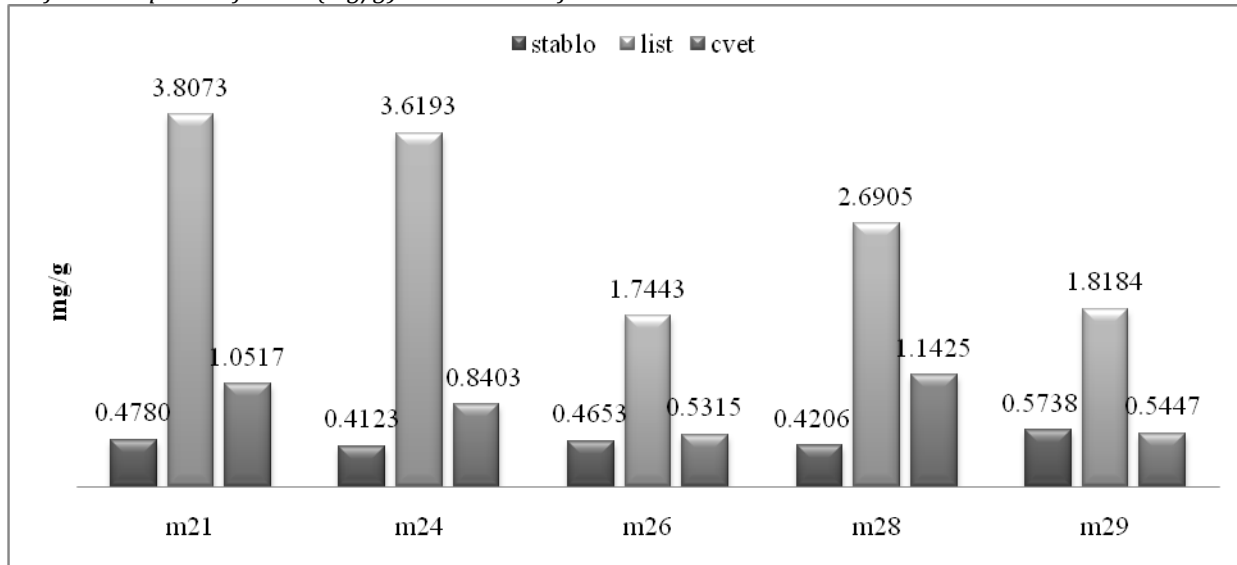
Na Grafiku 1 se uočava da je sadržaj svih ispitivanih izoflavona, posmatrajući biljne delove, najveći u listovima, a najmanji u

stablama sorti crvene deteline. Prosečni sadržaj ukupnih izoflavona u listovima svih sorti iznosi $2,73 \pm 0,97$ mg/g, u cvetovima $0,82 \pm 0,28$ mg/g, a u stablima je najmanji – $0,47 \pm 0,06$ mg/g.

Grafik 1. Prosečne vrednosti pojedinih izoflavona (mg/g) u različitim biljnim delovima uzoraka crvene deteline



Grafik 2. Ukupni* izoflavoni (mg/g) u delovima biljke različitih sorti crvene deteline



* ukupni sadržaj izoflavona predstavlja zbir sadržaja daidzeina, genisteina, formononetina i biohanina A u mg/g

Sorta najbogatija izoflavonima je m21 (prosečna vrednost ukupnih izoflavona u stablu, listu i cvetu iznosi 1,78 mg/g), a takodje to je i sorta sa najvećim sadržajem ukupnih izoflavona u listovima (3,81 mg/g). Najmanji sadržaj ukupnih izoflavona je detektovan u sorti m26 (sa prosečnom vrednošću ukupnih izoflavona 0,91 mg/g) koja je takođe imala najmanji sadržaj i u listu (1,74 mg/g) i u cvetu (0,53

mg/g). U cvetovima je najveći sadržaj izoflavona određen u sorti m28 (1,14 mg/g). Generalno je u stabljikama ispitivanih uzoraka najmanji sadržaj izoflavona i iznosi od 0,41 do 0,57 mg/g. Jedino je kod sorte m29 sadržaj ukupnih izoflavona veći u stabljiki u odnosu na cvet (Grafik 2).

S obzirom na to da sorta m21 ima i najveći ukupni sadržaj fitoestrogena, može se

reći da je formononetin komponenta koja ima najveći udeo u ovakvom rezultatu. Kako je već pomenuto, to je najzastupljeniji izoflavon u analiziranim sortama, a i sorte se najviše razlikuju po njegovom sadržaju.

Poredeći prosečne vrednosti pojedinih izoflavona po sortama, utvrđena je statistički značajna razlika između sadržaja svih izoflavona međusobno ($p < 0,05$), osim daidzeina i genisteina, koji imaju i sličnu prosečnu zastupljenost.

Diskusija

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u sadržaju ukupnih izoflavona u različitim delovima biljke. Generalno, listovi su najbogatiji izoflavonima, dok je njihov sadržaj u stabljikama najmanji.

U studiji Vetter i saradnika (1995) analizirano je više *Trifolium* vrsta, kod kojih je ispitivan sadržaj daidzeina, genisteina, biohanina A i formononetina u različitim biljnim delovima [23]. Dobijeni rezultati ukazuju da je sadržaj ukupnih izoflavona u crvenoj detelini bio najveći u cvetovima, a najmanji u stabljikama, što su i rezultati ove studije potvrdili. U svim fazama zrelosti u studiji Sivesind i Seguin (2005), prosečne koncentracije izoflavona su najviše u listovima, što je u skladu sa rezultatima ovog rada, dok su najniže bile u cvetovima ili u stabljikama, u zavisnosti od faze cvetanja [21], a u ispitivanim sortama u ovoj studiji najniža koncentracija zabeležena u stabljikama. Takođe, Tsao i saradnici su u svom istraživanju pokazali da listovi crvene deteline sadrže najveću koncentraciju izoflavona, što odgovara rezultatima prikazanim u ovom radu [24].

Prosečni sadržaj svih određivanih izoflavona u ovom radu se u stabljikama i listovima značajno razlikuje, dok je koncentracija genisteina i formononetina značajno različita i u cvetovima u odnosu na listove.

U istraživanju Booth-a i saradnika (2006) rezultati pokazuju da nadzemni delovi biljke i cvasti sadrže u najvećoj meri

formononetin [25], što je potvrdila analiza u ovom radu. U studiji Vetter i saradnika (1995) u listovima najviše je bio zastupljen formononetin 0,38 mg/g, a u stablu i cvetovima daidzein 0,33-0,46 mg/g [23], dok je u uzorcima analiziranim u ovom radu formononetin dominantni izoflavon u listovima i cvetovima, a daidzein u stabljikama (Grafik 1).

Sivesind i Seguin (2005) su u svom radu naveli da se koncentracija formononetina u ispitivanim uzorcima iz Kanade kreće od 4,84 do 7,19 mg/g u zavisnosti od sorte, a sadržaj biohanina 4,08 - 5,33 mg/g. Sadržaj formononetina u uzorcima analiziranim u ovom radu kreće se između 0,07 i 2,89 mg/g, a sadržaj biohanina do 0,57 mg/g, što je manje u odnosu na Kanadske sorte [21].

Od svih ispitivanih faktora koji mogu uticati na sadržaj izoflavona u crvenoj detelini utvrđeno je da deo biljke, faza razvoja, faktori spoljašnje sredine i sorta mogu imati značajni uticaj, što može objasniti i vrlo različite koncentracije izoflavona dobijene u rezultatima sprovedenih studija.

U pogledu pojedinačnih izoflavona, formononetin i biohanin su bili dominantni u profilima ispitivanih sorti u studiji Tsao i saradnika (2006), dok su sorte ispitivane u ovom radu, pokazale da je biohanin procentualno najmanje zastupljen fitoestrogen, posmatrajući sve biljne delove, što može biti karakteristika sorti ili ukazuje da je potrebna dalja optimizacija primenjenjene metodologije.

Međutim, sastav izoflavona u različitim sortama crvene deteline može značajno varirati, tako da formononetin i biohanin ne moraju biti dominantni po sadržaju, kao što je prikazano u studiji Wu i saradnika (2003). Ovaj podatak bi mogao objasniti i neočekivano mali sadržaj biohanina A u uzorcima ispitivanim u našem radu. U pomenutom radu dokazano je i da je sadržaj izoflavona mnogo veći u crvenoj detelini u odnosu na srodne vrste (*T. repense*, *T. campestre*, *T. hybridum*), kao i da su ukupni izoflavoni značajno veći u listu, stablu i korenu, nego u cvetu crvene deteline [26].

Zaključak

Utvrđeno je da se analizirane sorte međusobno razlikuju po sadržaju izoflavona, kao i da sorta m21 sadrži najveću količinu izoflavona. Deo biljke koji je najbogatiji izoflavonima je list, dok je u stablima zabeležen prosečno najmanji sadržaj izoflavona. Generalno, u ispitivanim sortama najzastupljeniji izoflavon u listovima i

cvetovima je formononetin, dok je u stabljikama daidzein dominantni fitoestrogen.

Ispitivanje profila izoflavona u crvenoj detelini, i faktora koji utiču na sadržaj fitoestrogena, je od značaja za farmaceutsku industriju, s obzirom da je ekstrakt crvene deteline sirovina za izradu sve popularnijih dijetetskih suplemenata na domaćem tržištu, pa dobijeni rezultati tu mogu naći svoju primenu.

Literatura:

1. Cvejić J. Disease preventing effect of soy and phytoestrogens. *Pharmaca Serbica* 2009;1(3-4):17-22.
2. Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, Mcguire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 1978;103:1860-7.
3. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998;139(10):4252-63.
4. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 1997;62:365-72.
5. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140:5566-78.
6. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Tox Sci* 2004;80:14-25.
7. Cvejić J, Malenčić Đ, Tepavčević V, Poša M, Miladinović J. Determination of phytoestrogen composition in soybean cultivars in Serbia. *Nat Prod Commun* 2009;4:1-6.
8. Tepavčević V, Atanacković M, Miladinović J, Malenčić Đ, Popović J, Cvejić J. isoflavone composition, total polyphenolic content and antioxidant activity in soybeans of different origin. *J Med Food* 2010;13(3):1-8.
9. Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78(1):67-75.
10. Nachtigall LE. Isoflavones in the management of menopause. *J Br Menopause Soc* 2001;S1:8-12.
11. Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric* 1999;2:85-92.
12. Knight DC, Howes JB, Eden JA. The effect of Promensil, an isoflavone extract on menopausal symptoms. *Climacteric* 1999;2:79-84.
13. Van der Weijer PHM, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas* 2002;42:187-93.
14. Jeri AR. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. *The Female Patient* 2002;27:35-7.
15. Huntley AL, Ernst E. A systematic review of herbal medicinal products for the treatment of menopausal symptoms. *Menopause* 2003;10(5):465-76.
16. Seidl MM, Stewart DE. Alternative treatment for menopausal symptoms. *Can Fam Physician* 1998;44:1299-1308.
17. Writing group for the women's health initiative investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principle results from the Women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(3):321-7.
18. Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstetrics and Gynecology* 1998;91(1):6-11.
19. Hirata JD, Small R, Swiersz LM, Ettinger B, Zell B. Does dong-quai have estrogenic effects in postmenopausal women? A double-blind placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 1997;68:981-7.
20. Mantyranta T, Hemminki E, Kangas I, Topo P, Utela A. Alternative drug use for the climacteric in Finland. *Maturitas* 1997;27:5-11.
21. Sivesind E, Seguin P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *J Agric Food Chem* 2005;53:6397-402.

22. Krenn L, Unterrieder I, Ruprechter R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2002;777:123-8.
23. Vetter J. Isoflavones in different parts of common *Trifolium* species. *J Agric Food Chem* 1995;43:106-8.
24. Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, Young JC, McRae K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J Agric Food Chem* 2006;54:5797-805.
25. Booth NL, Overk CR, Yao P, Totura S, Deng Y, Hedayat AS, et al. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity. *J Agric Food Chem* 2006;54:1277-82.
26. Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2003;1016:195-209.

Adresa autora: dipl farm Mira Bursać, Katedra za farmaciju, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, 21 000 Novi Sad, Srbija;
e-mail: mira-bursac@hotmail.com;

PREDATO U ŠTAMPU:15.06.2011.

PRIHVAĆENO ZA ŠTAMPU:30.06.2011