

**UTICAJ EUGENOLA NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE
KOD PACOVA***
EFFECT OF EUGENOL ON HEMATOLOGICAL PRAMETERS IN RATS

**Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Mirjana Milovanović,
Dragica Stojanović, N. Jezdimirović, D. Đurđević, Jasna Kureljušić****

Ispitivan je mogući hematotoksični efekat eugenola kod pacova posle dvonedeljne i četvoronedeljne kontinuirane p.o. primene. Ogled je izveden na 72 mužjaka pacova soja vistar podeljenih u šest grupa. Četiri grupe tretirane su različitim dozama eugenola (10 mg/kg tm/dan, 50 mg/kg/dan, 200 mg/kg/dan i 400 mg/kg tm/dan), peta kontrolna grupa dobijala je vehikulum (0,5 % metil-celuloza, 20 % propilen-glikol i voda), a šesta je bila netretirana, apsolutno kontrolna. Eugenol i vehikulum aplikovani su gastričnom sondom u volumenu od 1 ml/100 g telesne mase pacova. Krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom 14. i 28. dana oglada u cilju određivanja hematoloških parametara (hematokrit, broj eritrocita, prosečna vrednost zapremine eritrocita (MCV), koncentracija hemoglobina, prosečna vrednost koncentracije hemoglobina (MCH), broj leukocita, leukocitna formula i broj trombocita).

Rezultati su pokazali da eugenol primenjivan 14 i 28 dana u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tm/dan nema hemolitičku aktivnost. Takođe, primenjivan tokom četiri nedelje ne utiče značajno na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, zapreminu eritrocita, broj leukocita i leukocitnu formulu. Eugenol primenjivan tokom dve nedelje prouzrokuje značajno povećanje mase hemoglobina po eritrocitu u odnosu na kontrolu. Ovaj efekat je nespecifičan i ne zavisi od doze, ni od dužine tretmana. Doze eugenola od 10 i 200 mg/kg/dan primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokuju statistički značajno smanjenje broja trombocita u odnosu na apsolutno kontrolnu grupu, dok najviša ispitivana doza (400 mg/kg) izaziva značajno povećanje broja trombocita u poređenju sa dozama od 10 i 200 mg/kg/dan. Promene

* Rad primljen za štampu 23. 02. 2012. godine

** Dr sc. med. vet. Milanka Jezdimirović, redovni profesor, dr sc. med. vet. Nevenka Aleksić, redovni profesor, dr sc. med. vet. Mirjana Milovanović, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr. sc. med. vet. Dragica Stojanović, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad; Nemanja Jezdimirović, dr vet. med., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; Dragan Đurđević, dr vet. med., Institut za eksperimentalnu medicinu, VMA, Beograd; Jasna Kureljušić, dr vet. med. Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

broja trombocita izazvane eugenolom kvalitativno su različite i ne zavise niti od doze niti od dužine tretmana.

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne ispoljava značajan uticaj na broj limfocita, monocita i granulocita.

Ključne reči: eugenol, hematotoksičnost, eritrociti, leukociti, pacov

Uvod / Introduction

U EU je od 2006. godine zabranjena primena antibakterijskih lekova kod životinja čije se meso koristi u ishrani ljudi sa ciljem da se preveniraju bakterijske infekcije i stimuliše rast. U skladu sa time, a u cilju dobijanja proizvoda sa oznakom organski proizvedene hrane, u Srbiji je donet Zakon o organskoj proizvodnji i organskim proizvodima (Sl. glasnik RS broj 30/10) i Pravilnik o kontroli i sertifikaciji u organskoj proizvodnji i metodama organske proizvodnje (Sl. glasnik RS broj 48/11), koji zabranjuju upotrebu antibiotika, kokcidiostatika, biostimulatora, hormona ili bilo kojih drugih materija kojima se stimuliše rast ili proizvodnja. Zbog toga je potrebno da se do sada korišćeni konvencionalni sintetski lekovi zamene fitofarmacima i/ili homeopatskim proizvodima.

Imajući u vidu da je strateški cilj naše zemlje proizvodnja organske hrane animalnog porekla, koja favorizuje prevenciju u odnosu na lečenje, primena alternativne terapije biljnim preparatima zauzima značajno mesto u sprovođenju zdravstvenog nadzora životinja. Iz tih razloga, poslednjih nekoliko godina intenzivno se istražuje efikasnost i bezbednost primene ekstrakta biljaka (karanfilić, cimet, slačica, origano, majčina dušica, ruzmarin), esencijalnih ulja, bioaktivnih molekula i sintetskih aktivnih komponenti kod životinja čije se meso koristi u ishrani ljudi, a naročito kod živine i svinja. Cilj je dobijanje fitofarmaka i dodataka krmnim smešama koji će da povećaju opštu otpornost životinja i spreče nastajanje bakterijskih, parazitskih, gljivičnih i virusnih bolesti, ali i da poboljšaju proizvodne performanse i kvalitet mesa i mleka (Lee i sar., 2004; Hernandez i sar., 2004; Zhang i sar., 2005; Lückstädt, 2005; Lević i sar., 2007; Pramod i sar., 2010).

Brojni su rezultati koji ukazuju na antimikrobno dejstvo aktivnih komponenti esencijalnih ulja: eugenola iz karanfilića, timola iz majčine dušice i origana, karvakrola iz origana, vanilina iz vanile, alicina iz belog luka, cinam-aldehida iz kore cimeta i alil-izotiocijanata iz slačice (Ratajac, 2005; Si i sar., 2006, 2006a; Chaieb i sar., 2007; Seed i Tariq, 2008; Gong i sar., 2008). Eugenol, izoeugenol, karvakrol i timol, dati pojedinačno ili u kombinaciji sa organskim kiselinama i njihovim solima, koriste se kao alternativa sintetskim antibakterijskim promoterima rasta kod živine i svinja jer pozitivno utiču na proizvodne performanse (Si i sar., 2006, 2006 a; Lević i sar., 2007; de Lange i sar., 2010).

U zemljama EU promet i primena biljnih dodataka hrani za životinje odobravaju se za određenu vrstu životinje, precizira se način njihove primene, a

dozvola za promet se izdaje na deset godina (EC No 1831/2003). Prema ovoj regulativi koja sadrži listu odobrenih dodataka, eugenol i izoeugenol svrstani su u kategoriju aditiva koji utiču na ukus ili boju hrane, odnosno povećavaju njenu palatabilnost.

Efikasnost i bezbednost biljnih preparata kod ciljnih vrsta životinja često su nedovoljno klinički ispitane jer prema zakonskim propisima oni mogu da se označe kao tradicionalni biljni lekovi ili dijetetski suplementi za čiji promet nije potrebna dozvola agencije za lekove (WHO, 1996, 1999; Calixto, 2000; SI glasnik RS, 2010). S obzirom na to da eugenol, sintetska aktivna komponenta etarskog ulja karanfilića (*Caryophylli aetheroleum*), ima brojna farmakološka, mikrobiološka i nutritivna dejstva koja omogućavaju njegovu široku primenu u veterinarskoj i humanoj medicini, ispitivanje njegovog uticaja na hematološke parametre ima za cilj da ustanovi bezbednost po zdravlje, odnosno utvrdi mogući hematotoksičan efekat posle produžene peroralne primene. Iako je ova vrsta ispitivanja primarna za utvrđivanje bezbednosti, u literaturi je malo podataka, i to kontroverzних. Negativan uticaj eugenola na hematološke parametre je prvi znak njegove loše sistemske podnošljivosti, koja ograničava dužinu primene i korišćenje većeg raspona doza.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanje uticaja eugenola na hematološke parametre izvedeno je na 72 pacova muškog pola soja vistar, starosti oko tri meseca i prosečne telesne mase $227,02 \pm 26,37$ g. Period adaptacije životinja pre uvođenja u eksperiment trajao je sedam dana. Ogled je izveden na šest grupa pacova, po 12 jedinki u svakoj. Četiri grupe dobijale su eugenol u različitim dozama, peta je tretirana vehikulumom (kontrolna grupa – K), a šesta je bila netretirana, apsolutno kontrolna (AK). Pacovi su boravili u kavezima od pleksiglasa (po šest životinja u svakom), u vivarijumu sa prirodnom svetlošću, temperaturom od 18°C do 24°C i relativnom vlagom vazduha 50% – 70%. Hrana i voda bile su im na raspolaganju bez ograničenja. Tokom celog ogleda sa životinjama je postupano u skladu sa etičkim principima Pravilnika o radu sa životinjama Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (2008).

Prva grupa pacova dobijala je eugenol u dozi od 10 mg/kg telesne mase, druga u dozi od 50 mg/kg tm, treća eugenol u dozi od 200 mg/kg tm i četvrta grupa u dozi od 400 mg/kg, peroralno, svakodnevno, tokom četiri nedelje. Etanolni 50% rastvor eugenola (Essentico, Kula) razblaživan je metil-celulozom (sa udelom mase od 0,5%), propilen-glikolom (20%) i vodom do rastvora koji u volumenu od 100 ml sadrži 1 g, 5 g, 20 g i 40 g eugenola. Odgovarajući rastvor eugenola i vehikuluma aplikovani su gastričnom sondom u zapremini od 1 ml/100 g telesne mase pacova. Kontrolna grupa pacova dobijala je 1 ml/100 g telesne mase vehikulum sastavljen iz metil-celuloze, etanola, propilen-glikola i prečišćene

vode (0,5%, 10%, 20% i prečišćena voda do 100%). Apsolutna kontrolna grupa pacova nije tretirana. Dalji postupak (smeštaj, ishrana, pregledi) sa pacovima svih grupa bio je identičan.

Od svih pacova uzimano je po 1 ml krvi punkcijom srca 14. i 28. dana oglada. Uzorci krvi za hematološka ispitivanja sakupljani su u epruvete sa dodatkom EDTA (etilen-diamino-tetra-sirćetna kiselina). Određivani su hematološki parametri – broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, prosečna vrednost zapremine eritrocita (MCV), prosečna vrednost koncentracije hemoglobina (MCH), broj leukocita, leukocitna formula i broj trombocita. Korišćen je aparat Arcus (automatski digitalni analizator 18 hematoloških parametara proizvođača Diatron, Austrija).

Rezultati su statistički obrađeni primenom mera varijacije. Za testiranje statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti ispitivanih parametara između grupa pacova primenjena je analiza varijance i Tukey test. Statistička obrada podataka urađena je primenom Excell 2007 (MS Office 2007, Microsoft Corporation).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Uticaj eugenola na broj eritrocita kod pacova /

The influence of eugenol on erythrocyte count in rats

Prosečan broj eritrocita kod kontrolnih grupa pacova (AK, K) i grupa tretiranih eugenolom (10, 50, 200 i 400 mg/kg/dan) ustanovljen dve i četiri nedelje posle početka eksperimenta nije se statistički značajno razlikovao (tabele 1 i 2). Sve testirane doze eugenola prouzrokovale su neznatno povećanje broja eritrocita, kako posle dvonedeljne tako i posle četvonedeljne primene, u odnosu na kontrole. Slična, neznatna, razlika u broju eritrocita zapažena je između 14. i 28. dana ispitivanja u svakoj grupi tretiranoj eugenolom (tabele 1 i 2). Prosečan broj eritrocita kod grupa pacova tretiranih eugenolom ustanovljen 14. dana oglada kretao se od $3,90 \times 10^{12}/l$ (200 mg/kg/dan) do $4,41 \times 10^{12}/l$ (10 mg/kg/dan). Posle četiri nedelje tretmana najniža doza eugenola prouzrokovala je najveće povećanje broja eritrocita, $4,61 \times 10^{12}/l$, a nešto manje, $4,58 \times 10^{12}/l$, najviša ispitivana doza. Prosečno neznatno povećanje broja eritrocita nije zavisilo od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

Prosečan broj eritrocita kod kontrolnih grupa pacova ustanovljen 14. i 28. dana kretao se od $3,90 \times 10^{12}$ do $4,05 \times 10^{12}/l$ i u saglasnosti je sa rezultatima nekih drugih autora ($4,44 \times 10^{12}$ do $5,10 \times 10^{12}/l$) (Widman, 1980; Dacie i Lewis, 1991; Eastham i Slade, 1993; Ikpi i Nku, 2008; Antai i sar., 2009), ali je niži od referentnih vrednosti ($5,4 \times 10^{12}$ do $8,5 \times 10^{12}/l$) za pacove soja vistar (Jain, 1993; Pritchett i Corning, 2004; Liberati i sar., 2004).

Dobijeni rezultat ispitivanja uticaja eugenola na prosečan broj eritrocita u našem ogledu u saglasnosti je sa literaturnim podacima koji pokazuju da eugenol primenjivan u hrani u koncentraciji od 0,1% do 1,0% tokom četiri meseca

Table 1. Hematološki parametri kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana /
Table 1. Haematological parameters in control rats and those treated with eugenol for 14 days

Tretman / Treatment	AK / Absolute control	K / Control	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita / RBC count (x10 ¹² /l)	4,05±0,23	4,29±0,16	4,41±0,28	4,23±0,44	3,90±0,48	4,31±0,31
Koncentracija hemoglobina / Hb concentration (g/l)	74,00±5,00	74,33±6,01	81,33±5,48	75,20±8,51	74,60±8,95	81,25±6,49
MCH (pg)	18,35±0,25	17,30±0,78	18,50±0,29	17,74±0,40	19,24±0,28*	18,82±0,22
MCV (fl/l)	61,65±0,45	58,63±1,74	58,85±0,93	57,82±1,04	59,48±0,45	58,78±0,85
PCV (%)	25,0±1,6	25,2±1,7	26,0±1,8	24,5±2,7	23,2±2,9	25,4±2,0
Broj trombocita / Platelet count (x10 ⁹ /l)	325,00±5,00	583,67±77,57	354,25±31,28	419,60±68,97	357,60±47,76	468,67±72,36

**p<0,05 značajnost u poređenju sa kontrolnim grupama i grupom tretiranom eugenolom u dozi od 50 mg/kg/dan /
**p<0,05 significance in relation to control groups and the group treated with eugenol in a dose of 50 mg/kg/day

Table 2. Hematološki parametri kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 28 dana /
Table 2. Haematological parameters in control rats and those treated with eugenol for 28 days

Tretman / Treatment	AK / Absolute control	K / Control	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita / RBC count (x10 ¹² /l)	3,90±0,16	3,90±0,20	4,61±0,20	4,25±0,17	4,35±0,28	4,58±0,17
Koncentracija hemoglobina / Hb concentration (g/l)	73,00±2,48	74,25±2,25	86,25±6,36	74,80±6,93	74,67±6,98	83,90±3,41
MCH (pg)	19,10±0,58	18,78±0,50	18,53±0,60	18,76±0,32	19,98±0,59	19,17±0,37
MCV (fl/l)	63,05±1,38	63,45±2,00	61,70±2,03	60,54±1,04	60,93±1,57	59,07±0,50
PCV (%)	29,30±0,60	30,12±2,5	28,92±0,9	30,91±2,81	27,42±2,20	26,5±1,4
Broj trombocita / Platelet count (x10 ⁹ /l)	555,75±15,2	515,26±47,6	394,75±36,49**	485,60±30,11	403,00±21,0**	528,60±18,79** A

**p<0,01 značajnost u odnosu na apsolutnu kontrolnu grupu, ^Ap<0,01 u poređenju sa grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 i 200 mg/kg/dan /
**p<0,01 significance in relation to the absolute control group, ^Ap<0,01 compared with the group treated with eugenol in doses of 10 and 200 mg/kg/day

kod pacova ne menja broj eritrocita i druge hematološke parametre, odnosno nema hemolitičku aktivnost (Hagan i sar., 1967). Noviji rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja vodenog ekstrakta karanfilića (eugenol u dozi od 300 i 700 mg/kg) na broj eritrocita kod pacova pokazuju da tromesečna primena u dozi od 300 mg/kg/dan ne utiče na vrednost ovog parametra, dok doza od 700 mg/kg izaziva značajno ($p < 0,05$) prolazno povećanje broja eritrocita koje nestaje već druge nedelje po prekidu tretmana (Agbaje i sar., 2009).

*Uticaj eugenola na koncentraciju hemoglobina u krvi /
The influence of eugenol on blood haemoglobin concentration in rats*

Eugenol primenjivan 14 i 28 dana u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tm neznatno povećava prosečnu koncentraciju hemoglobina kod pacova u poređenju sa apsolutnom kontrolom i kontrolom tretiranom vehikulumom. Najizraženije povećanje prosečne koncentracije hemoglobina zabeleženo 14. i 28. dana oglada bilo je u grupi pacova tretiranoj najnižom dozom eugenola (14. dan 81,33 g/l i 28. dan 86,25 g/l), a nešto manje u grupi tretiranoj najvišom dozom (81,25 g/l i 83,90 g/l), u poređenju sa obema kontrolama. Povećanje nije zavisilo od veličine primenjene doze eugenola, niti od dužine tretmana (tabele 1 i 2).

Najniža koncentracija hemoglobina ustanovljena je kod pacova apsolutne kontrolne grupe, kako 14. (74,00 g/l, tabela 1), tako i 28. dana oglada (73,00 g/l, tabela 2). Prosečne koncentracije hemoglobina kod pacova obe kontrolne grupe bile su ispod fizioloških vrednosti za soj Wistar (143 ± 10 g/l) (Liberati i sar., 2004; Ipki i Nku, 2008).

Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na koncentraciju hemoglobina kod pacova posle četvonedeljnog tretmana slični su sa nalazima dobijenim posle njegove primene u hrani u dozi većoj od 1000 mg/kg/dan, tokom 133 dana (Hagan i sar., 1967), i dozama od 1400 do 4000 mg/kg hrane tokom mesec dana (Hagan i sar., 1965, 1967). Dobijeni rezultati ukazuju na to da eugenol ne menja značajno koncentraciju hemoglobina. Međutim, naši rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima dobijenim posle tromesečne p.o. primene vodenog ekstrakta karanfilića (*Syzygium aromaticum*), odnosno eugenola u dozi od 300 i 700 mg/kg, kojima je ustanovljeno da obe doze eugenola prouzrokuju statistički značajno povećanje koncentracije hemoglobina (Agbaje i sar., 2009). Očigledno je da višenedeljna kontinuirana primena eugenola preko gastrične sonde kod pacova prouzrokuje značajno dozno-zavisno povećanje koncentracije hemoglobina u krvi, što nije slučaj kada se daje u hrani (Hagan i sar., 1967). Ovo može da se pripíše boljoj apsorpciji, odnosno biološkoj raspoloživosti eugenola iz vodenog ekstrakta karanfilića, kako u odnosu na uljno-etanolnu emulziju sa dodatkom metil-celuloze primenjenu u našem eksperimentu, tako i u poređenju sa eugenolom iz hrane. Međutim, postoje podaci koji ukazuju na dobru iskoristljivost eugenola posle mešanja sa hranom kod brojlerskih pilića. Dokazano je, takođe, da vodeni ekstrakt iz lišća afričkog bosiljka (*Ocimum gratissimum*), koji sadrži

eugenol, izaziva supresiju hematopoeze (Jimoh i sar., 2008). Ekstrakt aplikovan pacovima svakodnevno tokom četiri nedelje u dozi od 0,2 do 1,6 g/kg tm izazvao je signifikantno smanjenje hematokrita, broja eritrocita i leukocita i pad koncentracija hemoglobina. Autori su izneli pretpostavku da su nastali efekti posledica delovanja saponina prisutnih u listovima bosiljka, zbog čega predlažu da se on, uprkos svojim lekovitim svojstvima, ne koristi kontinuirano duže vreme.

*Uticaj eugenola na prosečnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (MCH) /
The influence of eugenol on mean corpuscular haemoglobin (MCH)*

Posle dvonedeljne primene eugenol prouzrokuje značajno povećanje prosečne mase hemoglobina po eritocitu (MCH) kod pacova tretiranih dozom od 200 mg/kg/dan u odnosu na kontrolne i u odnosu na životinje tretirane dozom od 50 mg/kg/dan ($p < 0,05$) (tabela 1). Prosečna vrednost MCH u grupi tretiranoj dozom od 200 mg/kg/dan iznosila je 19,24 pg, dozom od 50 mg/kg/dan 17,74 pg, a u kontroli 17,30 pg. Međutim, posle četvoronedeljne primene (tabela 2) eugenol ni u jednoj dozi nije ispoljio ovaj efekat.

Činjenica da povećanje prosečne mase hemoglobina u eritrocitima ustanovljeno 14. dana oglada nije bilo dozno zavisno govori u prilog nespecifičnom hematopoetskom dejstvu eugenola.

*Uticaj eugenola na prosečnu zapreminu eritrocita (MCV) /
The influence of eugenol on mean corpuscular volume (MCV)*

Eugenol primenjivan 14 i 28 dana u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg telesne mase ne utiče značajno na prosečnu zapreminu eritrocita u poređenju sa apsolutnom netretiranom grupom, niti sa kontrolnom ($p > 0,05$) Najmanja zapremina eritrocita 14. dana (57,82 fl/l) ustanovljena je u grupi pacova tretiranoj eugenolom u dozi od 50 mg/kg, a 28. dana u dozi od 400 mg/kg (59,07 fl/l) (tabele 1 i 2).

Neznatno povećanje zapremine eritrocita uočeno je 28. dana oglada u svim grupama pacova (kontrolne i grupe tretirane eugenolom). Povećanje ne zavisi od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

*Uticaj eugenola na hematokrit /
The influence of eugenol on packed cell volume (PCV)*

Ispitivane doze eugenola primenjivane tokom dve i četiri nedelje ne menjaju vrednosti hematokrita u odnosu na apsolutnu kontrolnu grupu pacova (25,0% 14. dana i 29,3% 28. dana) (tabele 1 i 2). Najniža ispitivana doza eugenola (10 mg/kg) posle dvonedeljne primene prouzrokuje neznatno povećanje vrednosti hematokrita (26,0%), a 20 puta veća doza neznatno smanjenje (23,2%). Na kraju ispitivanja, vrednosti hematokrita bile su najmanje posle primene eugenola u dozi od 400 mg/kg/dan, a najveće posle doze od 50 mg/kg/dan.

Činjenica je da su u ovom ispitivanju i kod kontronih grupa pacova ustanovljene niže vrednosti hematokrita od referentnih, koje se kreću od 37% do 49% (Pritchett i Corning, 2004).

Poređenjem vrednosti broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita kod pacova, posle primene eugenola u svim ispitivanim dozama tokom dve i četiri nedelje, nije ustanovljen njegov negativan uticaj na hematopoezu, niti hemolitička aktivnost. Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja eugenola na hematokrit u ovom ogledu kontradiktorni su sa rezultatima Agbaje i saradnika (2009), koji su ustanovili da vodeni ekstrakt karanfilića (odgovara dozama eugenola od 300 i 700 mg/kg) primenjivan tokom dve nedelje dovodi do značajnog prolaznog povećanja hematokrita kod pacova.

Uticaj eugenola na broj trombocita /

The influence of eugenol on thrombocyte number

Eugenol primenjivan u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg/dan tokom 14 dana nema značajan uticaj na broj trombocita (tabela 1). Međutim, posle četvoronedeljne primene prouzrokuje značajne razlike ($p < 0,01$, tabela 2). Doze od 10 mg/kg/dan i 200 mg/kg/dan dovode do statistički značajnog smanjenja broja trombocita u odnosu na apsolutnu kontrolu ($555,75 \times 10^9/l$), dok najviša ispitivana doza (400 mg/kg) izaziva značajno povećanje ($528,60 \times 10^9/l$) u odnosu na vrednosti kod pacova tretiranih dozama od 10 mg/kg ($394,75 \times 10^9/l$) i 200 mg/kg ($403,00 \times 10^9/l$, $p < 0,01$).

Promene broja trombocita izazvane eugenolom posle četvoronedeljne p.o. primene bile su kvalitativno različite i nisu zavisile od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana. Takođe, broj trombocita kod kontrolnih grupa pacova i grupa tretiranih eugenolom u dozama od 10, 50 i 200 mg/kg/dan bio je ispod referentnih vrednosti 14. dana oglada. Prosečan broj trombocita ostao je ispod minimalnih referentnih vrednosti i posle četiri nedelje tretmana eugenolom u dozama od 10 i 200 mg/kg/dan. Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na broj trombocita kod pacova donekle su u saglasnosti sa rezultatima Agbaje i sar. (2009) koji su dokazali da eugenol primenjivan tokom tri meseca u dozi od 300 mg/kg/dan ne utiče na ove krvne elemente, dok doza od 700 mg/kg/dan prouzrokuje značajno povećanje njihovog broja. Ovaj efekat je prolaznog karaktera i nestaje posle dve nedelje od obustavljanja tretmana.

Uticaj eugenola na broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku /

The influence of eugenol on leukocyte number and differential leukocyte count

Eugenol primenjivan tokom 14 dana u svim ispitivanim dozama (10, 50, 200 i 400 mg/kg/dan) prouzrokuje neznatno smanjenje ukupnog broja leukocita u poređenju sa obema kontrolama. Najviša doza eugenola prouzrokuje najizraženije smanjenje broja leukocita ($5,80 \times 10^9/l$), a najmanje smanjenje ustanovljeno je posle primene doze od 200 mg/kg ($7,32 \times 10^9/l$) (tabela 3). Neznatna

Tabela 3. Uticaj eugenola na broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana /
 Table 3. The influence of eugenol on the number of leukocytes and differential blood count in control rats and those treated with eugenol for 14 days

Tretman/ Treatment	AK / Absolute control	K / Control	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj leukocita / WBC count (x10 ⁹ /l)	8,00±1,90	7,97±1,65	6,25±0,60	6,44±0,77	7,32±0,52	5,80±0,00
Limfociti / Lymphocytes (x10 ⁹ /l)	6,90±2,40	6,57±1,20	5,50±0,50	6,28±0,59,	5,90±0,36	6,13±0,88
Monociti / Monocytes (x10 ⁹ /l)	0,85±0,35	1,07±0,34	0,60±0,09	0,50±0,50	0,50±0,17	1,13±0,19
Granulociti / Granulocytes (x10 ⁹ /l)	0,200±0,10	0,330±0,12	0,225±0,06	0,120±0,05	0,350±0,03	0,383±0,08

Tabela 4. Uticaj eugenola na broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 28 dana /
 Table 4. The influence of eugenol on the number of leukocytes and differential blood count in control rats and those treated with eugenol for 28 days

Tretman/ Treatment	AK / Absolute control	K / Control	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj leukocita / WBC count (x10 ⁹ /l)	8,15±0,39	7,15±0,77	6,95±0,39	7,86±0,46	7,98±0,34	8,36±0,45
Limfociti / Lymphocytes (x10 ⁹ /l)	7,30±0,76	6,20±0,86	6,10±0,25	6,24±0,48	6,38±0,26	6,63±0,44
Monociti / Monocytes (x10 ⁹ /l)	0,90±0,08	0,80±0,17	0,78±0,06	0,60±0,09	0,93±0,15	1,00±0,11
Granulociti / Granulocytes (x10 ⁹ /l)	0,400±0,11	0,350±0,09	0,275±0,08	0,320±0,03	0,550±0,07	0,390±0,08

leukopenija uočena je posle dvonedeljnog tretmana pacova eugenolom, nezavisno od veličine primenjene doze. Ustanovljena leukopenija ne bi mogla da se pripíše supresivnom hematopoeznom dejstvu eugenola. Ova tvrdnja potkrepljena je činjenicom da se prosečan broj leukocita povećavao kod svih grupa pacova tretiranih eugenolom posle 28. dana ispitivanja u odnosu na 14. dan (tabele 3 i 4). Eugenol je prouzrokovao neznatno dozno-zavisno povećanje broja leukocita u funkciji vremena. Posle 28. dana oglada prosečan broj leukocita bio je najmanji u grupi pacova tretiranoj dozom od 10 mg/kg ($6,95 \times 10^9/l$), a najviši u grupi tretiranoj sa 400 mg/kg ($8,36 \times 10^9/l$). Razlike u broju leukocita između pojedinih grupa bile su bez statističke značajnosti do kraja ispitivanja ($p > 0,05$). Prosečne vrednosti ukupnog broja leukocita ustanovljene 14. i 28. dana oglada kod pacova tretiranih eugenolom, kao i kod kontrolnih grupa bile su u fiziološkim granicama.

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja eugenola na prosečan broj leukocita u našem ogledu u saglasnosti su sa literaturnim podacima koji pokazuju da eugenol primenjivan u hrani u koncentraciji od 0,1% do 1% tokom četiri meseca (Hagan i sar., 1967) i u vodi u dozi od 300 i 700 mg/kg/dan tokom tri meseca ne menja značajno broj leukocita kod pacova (Agbaje i sar., 2009). Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj limfocita, monocita i granulocita u poređenju sa obema kontrolama (tabele 3 i 4). Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na diferencijalnu krvnu sliku pacova u saglasnosti su sa nalazima Agbaje i saradnika (2009).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Eugenol primenjivan p.o. u dozi od 10, 50, 200 i 400 mg/kg/dan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, zapreminu eritrocita, broj leukocita i leukocitnu formulu kod pacova.

2. Ispitivane doze eugenola primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokovale su promene broja trombocita koje nisu zavisile od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana. Doze od 10 i 200 mg/kg značajno su smanjivale broj trombocita, a doza od 400 mg/kg značajno povećavala njihov broj.

3. Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje nije značajno uticao na prosečan broj limfocita, monocita i granulocita u poređenju sa kontrolnim grupama pacova.

ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT:

Istraživanje je obavljeno uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, projekata broj 46009 i 46002. /

Investigations were carried out with financial support from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, projects number 46009 and 46002.

Literatura / References

1. Agbaje EO, Adeneye AA, Daramola AO. Biochemical and toxicological studies of aqueous extract of *Syzigium aromaticum* (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in rodents. *Afr J Trad Complement Altern Med* 2009; 6(3): 241-54.
2. Antai AB, Ofem OE, Ikpi DE, Ukafia S, Agiang EA. Phytochemistry and some haematological changes following oral administration of ethanolic root extract of *Gonoloma latifolium* in rats. *Nigerian J Physiol Sci* 2009; 24(1): 79-83.
3. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(2): 179-89.
4. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. *Myrtaceae*). *Phytother Res* 2007; 21: 501-6.
5. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, 7th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh 1991; 37-61, 87-113-213, 535-44.
6. De Lange CFM, Pluske J, Gong J, Nyachoti CM. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest Sci* 2010; 134: 124-34.
7. Gong J, Yu H, Liu T, Li M, Si W, de Lange CFM, Dewey C. Characterization of ileal bacterial microbiota in newly-weaned pigs in response to feeding lincomycin, organic acids or herbal extract. *Livest Sci* 2008; 116: 318-22.
8. Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI, Taylor JM, Long EL, Nelson AA, Brouwer JB. Food flavorings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol* 1967; 5: 141-57.
9. Hagan EC, Jenner PM, Jones WH, Fitzhugh OG, Long EL, Brouwer JG, Webb WK. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicol Appl Pharmacol* 1965; 7: 18-24.
10. Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD. Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Sci* 2004; 83: 169-17.
11. Ikpi DE, Nku K. Effect of ethanolic extract of *Dennettia tripetala* fruit on haematological parameters in albino wistar rats. *Nigerian J Physiol Sci* 2008; 23(1-2): 13-7.
12. Jain CN. *Essentials of veterinary hematology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1993.
13. Jimoh ORJ, Olaore J, Olayaki LA, Olawepo A, Biliaminu SA. Effects of aqueous extract of *Ocimum gratissimum* on haematological parameters of Wistar rats. *Biokemistry* 2008; 20(1): 33-7.
14. Lee K, Everts H, Beynen A. Essential oils in broiler nutrition. *Int J Poul Sci* 2004, 3(12): 738-52.
15. Lević J, Sredanović S, Đuragić O, Jakić D, Lević Lj, Pavkov S. New feed additives based on phytogenics and acidifiers in animal nutrition. *Biotechnol Anim Husband* 2007; 23(5-6): 527-34.
16. Liberati AT, Sansone RS, Feustom HM. Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with normal controls. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 68-72.

17. List of the authorized additives in feedingstuffs published in application of 9b in Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs (situation as 15 July 2003).
18. Lückstädt C. Acid-phytobiotic blends, a sustainable alternative for feed safety, animal health and natural growth promotion in pig farming. *Feed Mix* 2005; 13(4): 25-7.
19. National Toxicology Program technical report on the carcinogenesis studies of eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed studies), TR 223, NTP publication No. 84-1779, http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr223.pdf (Accessed Febr 22, 2012)
20. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Sci* 2007; 86: 605-9.
21. Pramod K, Ansari SH, Ali J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Nat Prod Commun* 2010; 5(12): 1999-2006.
22. Pravilnik o kontroli i sertifikaciji u organskoj proizvodnji i metodama organske proizvodnje, Službeni glasnik RS br. 48/11
23. Pritchett KR, Corning BF. Biology and medicine of rats. In: Reuter JD, Suckow MA. (Ed.) *Laboratory animal medicine and management*. International Veterinary Information Service, Ithaca, NY, 2004.
24. Ratajac R. Ispitivanje efikasnosti eugenola u preveniranju i lečenju infekcija brojlara izazvanih sa *Salmonella enteritidis*. Specijalistički rad, Beograd, 2005.
25. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September on additives for use in animal, Official Journal of the EU, 18.10.2003, L 268/29-43.
26. Seed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. *Pak J Bot* 2008; 41: 2157-60.
27. Si W, Gong J, Chanas C, Cui S, Yu H, Caballero C, Friendship RM. *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol, and cinnamaldehyde towards *Salmonella typhimurium* DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 1282-91.
28. Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol* 2006a; 100: 296-305.
29. WHO-WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Vol. 1, Geneva, 1999.
30. WHO-Annex II. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines (WHO Technical Report Series No. 863), Geneva, 1996.
31. Widman FK. *Clinical interpretation of laboratory tests*. 9th Ed., American Association of Publishers, Washinton DC 1980; 293-5.
32. Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima. Sl. glasnik RS br. 30/2010.
33. Zakon o organskoj proizvodnji i organskim proizvodima, Sl. glasnik RS br. 30/2010.
34. Zhang KY, Yan F, Keen CA, Waldroup PW. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *Int J Poult Sci* 2005; 4(9): 612-9.

ENGLISH

EFFECT OF EUGENOL ON HEMATOLOGICAL PRAMETERS IN RATS

**Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Mirjana Milovanović, Dragica Stojanović,
N. Jezdimirović, D. Đurđević, Jasna Kureljušić**

Investigations covered the possible hematotoxic effect of eugenol in rats following two-week and four-week continuous p.o. application. An experiment was conducted on 72 male Wistar rats divided into six groups. Four groups were treated with different doses of eugenol (10 mg/kg bm/day, 50 mg/kg/day, 200 mg/kg/day and 400 mg/kg bm/day), the control group was administered a vehiculum (0,5 % methylcellulose, 20 % propylene glycol and water), and the sixth group was the absolute untreated control. Eugenol and the vehiculum were administered using a gastric probe in a volume of 1 ml/100 g body mass of rat. Blood was sampled using cardiac puncture on days 14 and 28 of the experiment in order to determine hematological parameters (hematocrit, number of erythrocytes, MCV, haemoglobin concentration, MCH, number of leukocytes, leukocyte formula, and number of thrombocytes).

The results have shown that eugenol administered over 14 and 28 days in doses of 10, 50, 200 i 400 mg/kg bm/day has no hemolytic activity. Furthermore, administered over four weeks, it does not significantly affect the number of erythrocytes, haemoglobin concentration, hematocrit, erythrocyte volume, number of leukocytes, and the leukocyte formula. Applied over two weeks, eugenol causes a significant increase in the mass of haemoglobin per erythrocyte, in comparison with controls. This effect is non-specific and does not depend on the dose or on the duration of treatment. The eugenol doses of 10 and 200 mg/kg/day administered over a period of four weeks result in a statistically significant reduction in the number of thrombocytes in comparison with the absolute control, while the highest investigated dose (400 mg/kg) causes a significant increase in comparison with the numbers for rats treated with a dose of 10 and 200 mg/kg/day. The changes in thrombocyte number caused by eugenol are qualitatively different and depend neither on the dose nor on the duration of treatment.

Eugenol applied over two or four weeks does not exhibit a significant influence on the number of lymphocytes, monocytes or granulocytes.

Key words: eugenol, haematotoxicity, erythrocytes, leukocytes, rat

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭУГЕНОЛА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫС

**Миланка Ездимирович, Невенка Алексич, Миряна Милованович,
Драгица Стоянович, Н. Ездимирович, Д. Джурджевич, Јасна Курелюшич**

Испытыван возможный гематологический эффект эугенола у крыс после двухнеделтного и четырёхнедельного непрерывного p.o. применения. Опыт сделан на 72 самца крыс штамма Wistar, разделенных в шесть групп. Четыре группы третированные с различными дозами эугенола (10 мг/кг мт/день, 50 мг/кг/

день, 200 мг/кг/день и 400 мг/кг мт/день), контрольная группа получала вехикулум (0,5% метил-целлюлоза, 20% пропилен-гликол и вода), а шестая была абсолютный, нетретированный, контроль. Эугенол и вехикулум апплицированы гастрическим зондом в объёме от 1 мл/100 г массы тела крыс. Кровь образчиков кардиальной пункцией 14 и 28 дней опыта с целью определения гематологических параметров (гематокрит, число эритроцитов, МЦВ, концентрация гемоглобина, МЦХ, число лейкоцитов, лейкоцитная формула и число тромбоцитов).

Результаты показали, что эугенол применялся в течение 14 и 28 дней в дозах от 10, 50, 200 и 400 мг/кг мт/день не имеет гемолитическую активность. Также, применялся в течение четыре недели не влияет значительно на число эритроцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, ёмкость эритроцитов, число лейкоцитов и лейкоцитную формулу. Эугенол применялся в течение две недели вызывает значительное увеличение массы гемоглобина по эритроциту в отношении контроля. Этот эффект неспецифический и не зависит от дозы, ни от длины лечения. Дозы эугенола от 10 и 200 мг/кг/день применялись в течение четыре недели вызывают статистически значительное уменьшение числа тромбоцитов в отношении абсолютного контроля, пока самая большая испытываемая доза (400 мг/кг) вызывает значительное увеличение в сравнении с числом у крыс, третированных дозой от 10 и 200 мг/кг/день. Изменения числа тромбоцитов, вызванные эугенолом качественно различались и не зависят ни от дозы, ни от длины лечения.

Эугенол применялся в течение двух и четырёх недель не проявляет значительное влияние на число лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

Ключевые слова: эугенол, гематотоксичность, эритроциты, лейкоциты, крыса