

DOI: 10.7251/VJRS1302131J

UDK 619:615.076.9

Milanka Jezdimirović,¹ Nevenka Aleksić,¹ Mirjana Milovanović,¹ Dragica Stojanović,² Nemanja Jezdimirović³

UTICAJ PRODUŽENE PERORALNE PRIMENE EUGENOLA NA HEMATOLOŠKE I NEKE BIOHEMIJSKE PARAMETRE KRVI KOD PACOVA

Kratak sadržaj

Ispitivano je moguće hematotoksično, hepatotoksično i nefrotoksično dejstvo eugenola kod pacova posle dvonedeljne i četvoronedeljne kontinuirane p.o. primene. Ogled je izveden na 72 mužjaka pacova soja Wistar podeljenih u šest grupa. Četiri grupe tretirane su različitim dozama eugenola (10 mg/kg tm/dan, 50 mg/kg tm/dan, 200 mg/kg tm/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 apsolutna, netretirana kontrola. Eugenol i vehikulum aplikovani su gastričnom sondom, svakodnevno tokom četiri nedelje u količini od 1 ml/100 g telesne mase pacova. Krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom anestetisanih pacova 14. i 28. dana ogleđa u cilju određivanja hematoloških i biohemijskih parametara krvi: hematokrit, broj eritrocita, leukocita i trombocita, leukocitna formula, koncentracija hemoglobina, MCV, MCH, koncentracija proteina, albumina, uree, kreatinina, kao i aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i kreatin-kinaze (CK).

Rezultati su pokazali da eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tm/dan ne ispoljava hematotoksično, hepatotoksično niti nefrotoksično dejstvo. Eugenol davan tokom četiri nedelje ne utiče značajno na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, zapreminu eritrocita, broj leukocita i leukocitnu formulu. Primenjivan tokom dve nedelje, prouzrokuje značajno povećanje mase hemoglobina po eritrocitu. Ovaj efekat je nespecifičan i ne zavisi niti doze, niti od dužine tretmana. Doze eugenola od 10 i 200 mg/kg/dan primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokuju značajno smanjenje broja trombocita, dok najviša ispitivana doza (400 mg/kg/dan) prouzrokuje značajno povećanje, u poređenju sa brojem trombocita kod pacova tretiranih dozom od 10 i 200 mg/kg/dan. Promene broja trombocita izazvane eugenolom kvalitativno su različite i ne zavise od doze, niti od dužine tretmana. Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno

¹ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.

² Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu.

³ Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.

na proteinemiju, albuminemiju, koncentraciju uree i kreatinina, kao i aktivnost ALP u serumu pacova.

Tri ispitivane doze eugenola (10, 50 i 200 mg/kg/dan) značajno smanjuju, dok najviša doza povećava aktivnost ALT. Eugenol aplikovan tokom četiri nedelje u dozi od 200 i 400 mg/kg prouzrokuje statistički značajno smanjenje aktivnosti CK.

Кljučне речи: eugenol, hematotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, pacov.

Milanka Jezdimirović,¹ Nevenka Aleksić,¹ Mirjana Milovanović,¹ Dragica Stojanović,² Nemanja Jezdimirović³

EFFECT OF EXTENDED ORAL ADMINISTRATION OF EUGENOL ON HEMATOLOGICAL AND SOME BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS IN RATS

Abstract

The possible haematotoxic, hepatotoxic and nephrotoxic effects of eugenol in rats after two-week and the four-week continuous use were tested. The experiment was conducted on 72 male Wistar rats divided into six equal groups. Four were treated with different doses of eugenol (10 mg/kg bw/day, 50 mg/kg/d, 200 mg/kg bw/d and 400 mg/kg bw/d), the control group received the vehikulum (0.5% methyl cellulose, 20% propylene glycol and water), and the sixth group was the absolute, untreated control. Eugenol and the vehikulum were administered with a gastric probe, on a daily basis, for four weeks at a rate of 1 ml/100 g body weight of rats. Blood was collected by cardiac puncture of the anesthetised rats on days 14 and 28 in order to assess the haematological and biochemical blood parameters: haematocrit, red blood cell count, white blood cell and platelet counts, leukocyte formula, hemoglobin, MCV, MCH, total protein concentration, albumin, urea, creatinine, and the activity of the alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and creatine kinase (CK).

The results showed that, having been applied for two and four weeks at doses of 10, 50, 200 and 400 mg/kg bw/day, eugenol did not show any haematotoxic, hepatotoxic or nephrotoxic effects. Eugenol administered for four weeks does not significantly affect the number of erythrocytes, haemoglobin concentration, haematocrit, red blood

cell volume, leukocyte count and leukocyte formula. Applied for two weeks it caused a significant increase in the mass of haemoglobin in erythrocytes. This effect is not specific and does not depend on the dose or the treatment duration. Eugenol in doses of 10 and 200 mg/kg/day applied for four weeks caused a significant reduction in the number of platelets, whilst the highest dose tested (400 mg/kg/day) caused a significant increase in comparison to the number of platelets in rats treated with 10 and 200 mg/kg/day. Changes in the number of platelets induced by eugenol qualitatively different and are not related to dose or length of treatment.

Eugenol applied for two and four weeks does not significantly affect proteinaemia, albuminaemia, serum urea and creatinine concentrations, and serum ALP activity in rats. Three assessed doses of eugenol (10, 50 and 200 mg/kg/d) significantly decreased, whereas the highest dose increased the ALT activity. However, eugenol applied for four weeks at a dose of 200 and 400 mg/kg/d caused a statistically significant decrease in CK activity.

Key words: eugenol, haematotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, rat.

UVOD

Iako se začinske i lekovite biljke (žalfija, karanfilić, majčina dušica, ruzmarin, cimet, origano, slačica, đumbir, pelen i dr.), njihovi ekstrakti i aktivne komponente već decenijama koriste u medicinske i nutritivne svrhe, kao zooaditivi ili pesticidi, još uvek su nedovoljna saznanja o njihovim mogućim neželjenim i toksičnim dejstvima na pojedine sisteme organa kod životinja i ljudi.

Esencijalno ulje karanfilića, origana, mirođije, bosiljka, ruzmarina, cimeta, lovora dr. sadrži tri (eugenol, 4-alilfenol, eugenil-acetat), od ukupno sedam poznatih bioaktivnih hidroksi-alil-benzenskih jedinjenja (Nijsseni sar., 2004; EPSA, 2006). Esencijalno ulje karanfilića (*Caryophylli aetheroleum*) sadrži čak od 80% do

90% eugenola, koji ima brojna farmakološka dejstva (EMEA, 1998).

Nedovoljna su saznanja o toksikološkom profilu eugenola i njegovom afinitetu prema organima posle dugotrajne p.o. primene kod laboratorijskih životinja. Procena stepena njegove toksičnosti i sistemske podnošljivosti posle primene rastućih doza u pretkliničkom ispitivanju ima za cilj da definiše najmanju dozu koja je bezbedna za primenu i ne prouzrokuje neželjene efekte (No Observed Adverse Effect Level – NOAEL), kao i najmanju dozu koja prouzrokuje značajane neželjene (Lowest Observed Adverse Effect Level – LOAEL) ili toksične efekte (Spoo, 2004). Rezultati ovakvih ispitivanja predstavljaju polaznu osnovu za procenu rizika primene eugenola kod ciljnih vrsta životinja.

MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivanje uticaja eugenola na hematološke i neke biohemijske parametre krvi izvedeno je na 72 pacova soja Wistar, starosti oko tri meseca i prosečne telesne mase od 227 g. Životinje su podeljene u šest jednakih grupa. Četiri grupe pacova dobijale su gastričnom sondom eugenol u dozi od 10, 50, 200 i 400 mg/kg svakodnevno tokom četiri nedelje, peta je tretirana vehikulomom (0,5% metil-celuloza, 20% propilen-glikol i voda), a šesta je bila apsolutna kontrola (netretirana). Volumen rastvora odgovarajuće koncentracije eugenola i vehikuluma aplikovani su u količini od 1 ml/ 100 g telesne mase pacova tokom četiri nedelje.

Od svih pacova, prethodno anestetisanih etrom, uzimano je po 2 ml krvi punkcijom srca 14. i 28. dana ogleđa. Uzorci krvi za hematološka ispitivanja sakupljani su u epruvete sa dodatkom EDTA. Parametri krvi (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, leukociti, leukocitna formula i trombociti) određivani su aparatom Arcus (automatski digitalni analaj-

zer 18 hematoloških parametara proizvođača Diatron, Austrija). Biohemijski parametri krvi (ALT, ALP, CK, proteini, albumini, urea i kreatin) određivani su u serumu, spektrofotometrijskom metodom (poluautomatski analajzer Basic proizvođača Secomam, Francuska).

Statistička obrada podataka urađena je primenom Excell 2007 (MS Office 2007).

REZULTATI I DISKUSIJA

Uticaj eugenola na broj eritrocita

Broj eritrocita kod kontrolnih grupa pacova (AK, K) i grupa tretiranih eugenolom ustanovljen dve i četiri nedelje od početka eksperimenta nije se značajno razlikovao (tabele 1. i 2). Sve testirane doze eugenola prouzrokovale su neznatno povećanje broja eritrocita, kako posle dvonedeljne, tako i posle četvonedeljne primene. Posle četiri nedelje tretmana, najniža doza eugenola prouzrokovala je najveće povećanje broja eritrocita, a nešto manje najviša doza. Povećanje broj eritrocita nije zavisilo od veličine doze, niti od dužine tretmana.

Tabela 1. Vrednosti hematoloških parametara kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$)	4,05 \pm 0,23	4,29 \pm 0,16	4,41 \pm 0,28	4,23 \pm 0,44	3,90 \pm 0,48	4,31 \pm 0,31
Koncentracija hemoglobina (g/l)	74,00 \pm 5,00	74,33 \pm 6,01	81,33 \pm 5,48	75,20 \pm 8,51	74,60 \pm 8,95	81,25 \pm 6,49
MCH (pg)	18,35 \pm 0,25	17,30 \pm 0,78	18,50 \pm 0,29	17,74 \pm 0,40	19,24 \pm 0,28*	18,82 \pm 0,22
MCV (fl/l)	61,65 \pm 0,45	58,63 \pm 1,74	58,85 \pm 0,93	57,82 \pm 1,04	59,48 \pm 0,45	58,78 \pm 0,85
Broj trombocita ($\times 10^9/l$)	325,00 \pm 5,00	583,67 \pm 77,57	354,25 \pm 31,28	419,60 \pm 68,97	357,60 \pm 47,76	468,67 \pm 72,36
Broj leukocita ($\times 10^9/l$)	8,00 \pm 1,90	7,97 \pm 1,65	6,25 \pm 0,60	6,44 \pm 0,77	7,32 \pm 0,52	5,80 \pm 0,00
Limfociti ($\times 10^9/l$)	6,90 \pm 2,40	6,57 \pm 1,20	5,50 \pm 0,50	6,28 \pm 0,59,	5,90 \pm 0,36	6,13 \pm 0,88

Monociti ($\times 10^9/l$)	0,85 \pm 0,35	1,07 \pm 0,34	0,60 \pm 0,09	0,50 \pm 0,50	0,50 \pm 0,17	1,13 \pm 0,19
Granulociti ($\times 10^9/l$)	0,200 \pm 0,10	0,200 \pm 0,10	0,225 \pm 0,06	0,120 \pm 0,05	0,350 \pm 0,03	0,383 \pm 0,08

* $P < 0,05$ значајност разлика у поређењу са контролним групама и групом третираном еугенолом у дози од 50 mg/kg/dan

Табела 2. Вредности хематолошких параметара код контролних пасова и пасова третираних еугенолом током 28 дана

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$)	3,90 \pm 0,16	3,90 \pm 0,20	4,61 \pm 0,20	4,25 \pm 0,17	4,35 \pm 0,28	4,58 \pm 0,17
Koncentracija hemoglobina (g/l)	73,00 \pm 2,48	74,25 \pm 2,25	86,25 \pm 6,36	74,80 \pm 6,93	74,67 \pm 6,98	83,90 \pm 3,41
MCH (pg)	19,10 \pm 0,58	18,78 \pm 0,50	18,53 \pm 0,60	18,76 \pm 0,32	19,98 \pm 0,59	19,17 \pm 0,37
MCV (fl/l)	63,05 \pm 1,38	63,45 \pm 2,00	61,70 \pm 2,03	60,54 \pm 1,04	60,93 \pm 1,57	59,07 \pm 0,50
Broj trombocita ($\times 10^9/l$)	555,75 \pm 15,2	515,26 \pm 47,6	394,75 \pm 36,49**	485,60 \pm 30,11	403,00 \pm 21,0**	528,60 \pm 18,79** ^a
Broj leukocita ($\times 10^9/l$)	8,15 \pm 0,39	7,15 \pm 0,77	6,95 \pm 0,39	7,86 \pm 0,46	7,98 \pm 0,34	8,36 \pm 0,45
Limfociti ($\times 10^9/l$)	7,30 \pm 0,76	6,20 \pm 0,86	6,10 \pm 0,25	6,24 \pm 0,48	6,38 \pm 0,26	6,63 \pm 0,44
Granulociti ($\times 10^9/l$)	0,400 \pm 0,11	0,350 \pm 0,09	0,275 \pm 0,08	0,320 \pm 0,03	0,550 \pm 0,07	0,390 \pm 0,08

** $P < 0,01$ значајност у односу на АК групу, ^A $P < 0,01$ у поређењу са групом третираном еугенолом у дози од 10 и 200 mg/kg/dan

Добijени резултат испитивања утицаја еугенoла на број еритроцита у нашем огледу у сагласности је са подацима који показују да еугенoл примeњиван у храни у концентрацији од 0,1% до 1,0% током чeтири мeсeца код пасова не мeња број еритроцита и друге хематолошке параметре, и нема хемолитичку активност (Hagan и сар., 1967). Новiji резултати добijени испитивањeм утицаја водeног екстракта кaранфилица (еугeнол у дози од 300 и 700 mg/kg) на број еритроцита код пасова показују да тромeсeчна примe-

на у дози од 300 mg/kg/dan не утичe на вредност овог параметра, док доза од 700 mg/kg изазива значајно пролазно повећање броја еритроцита које нестaje већ друге недeлје по прекиду третмана (Аgbaje и сар., 2009).

Утицај еугенoла на концентрацију хемоглобина у крви

Еугeнол примeњиван током две и чeтири недeлје незначатно повећава концентрацију хемоглобина. Најизражeнији пораст забeлeжeн 14. и 28. дана оглeда биo

је у групи пачова третираној најнижом дозом еугенола, а нешто мањи у групи третираној највишом дозом. Повећање није зависило од величине дозе еугенола, нити од дужине третмана (табеле 1. и 2).

Наши резултати испитивања утицаја еугенола на концентрацију хемоглобина код пачова после четворонеделjnог третмана слични су са налазима добијеним после примене у храни у дози >1000 mg/kg/dan током 133 дана (Hagan и сар., 1967), и дозата од 1400 до 4000 mg/kg хране током месец дана (Hagan и сар., 1965, 1967). Ови резултати укажују на то да еугенол не мења значајно концентрацију хемоглобина. Међутим, наши резултати нису у сагласности са налазима Агбaje и сар. (2009) који су утврдили да тромесечна п.о. примене екстракта каранфилица (*Syzygium aromaticum*) у дози од 300 и 700 mg/kg/dan проузрокује значајно повећање концентрације хемоглобина.

Утицај еугенола на просечну масу хемоглобина у еритроцитима

После двонеделjne примене, еугенол проузрокује значајно повећање просечне масе хемоглобина по еритроциту (MCH) код пачова третираних дозом од 200 mg/kg/dan у односу на контролне и у односу на животиње третиране дозом од 50 mg/kg/dan ($P < 0,05$) (табела 1). Међутим, еугенол после четворонеделjne примене ни у једној дози није испољио овај ефекат (табела 2). Ефекат је несPECИФИЧАН јер не показује дозну зависност.

Утицај еугенола на просечну запремину еритроцита

Еугенол применjиван током две и четири недеље не утиче значајно на запремину еритроцита (табеле 1. и 2). Незнатно повећање уочено је 28. дана огледа у свим групата третираним еугенолом. Повећање не зависи од дозе еугенола, нити од дужине третмана.

Утицај еугенола на хематокрит

Еугенол применjиван током две и четири недеље не мења вредност хематокрита (табеле 1. и 2). Најнижа испитивана доза (10 mg/kg) после двонеделjne примене проузрокује незнатно повећање вредности хематокрита, а 20 пута већа незнатно смањење. На крају испитивања, вредности хематокрита биле су најниже после примене еугенола у дози од 400 mg/kg/dan, а највеће после примене 50 mg/kg/dan.

Поређењем вредности броја еритроцита, концентрације хемоглобина и хематокрита код пачова после примене еугенола у испитиваним дозата током две и четири недеље није установљен његов негативан утицај на хематопоезу, нити хемолитичка активност. Добijени резултати испитивања утицаја еугенола на хематокрит у овом огледу контрадикторни су са резултатима Агбaje и сардника (2009), који су установили да водени екстракт каранфилица у дози од 300 и 700 mg/kg апликован током две недеље доводи до значајног пролазног повећања хематокрита код пачова.

Утицај еугенола на број тромбоцита

Еугенол применjиван током 14 дана нема значајаног утицај на број тромбо-

cita (tabela 1). Međutim, posle četvoro-nedeljne primene nastaju značajne kvantitativne razlike ($p < 0,01$, tabela 2), koje ne zavise od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

Naši rezultati donekle su u saglasnosti sa rezultatima Agbaje i sar. (2009), koji su dokazali da eugenol 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.

Uticaj eugenola na broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku

Sve ispitivane doze primenjivane tokom dve nedelje prouzrokuju neznatno smanjenje broja leukocita. Najviša doza eugenola prouzrokuje najizraženije smanjenje, a doza od 200 mg/kg/dan najmanje (tabela 1). Ustanovljena leukocitopenija ne bi mogla da se pripiše supresivnom hematopoeznom dejstvu eugenola, što se da zaključiti na osnovu činjenice da se broj leukocita povećavao kod svih grupa pacova tretiranih eugenolom posle 28. dana ispitivanja u odnosu na 14. dan (tabele 1. i 2). Eugenol je prouzrokovao neznatno dozno-zavisno povećanje broja leukocita u funkciji vremena. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima drugih istraživača i 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 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 (tabele 1. i 2). Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na diferencijalnu krvnu sliku u saglasnosti su sa nalazima Agbaje i sar. (2009).

Uticaj eugenola na proteinemiju i koncentraciju albumina u serumu

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče na koncentraciju proteina u serumu (tabele 3. i 4). Naši rezultati nisu u saglasnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju da eugenol primenjivan p.o. tokom tri meseca u dozi od 300 mg/kg/dan značajno ($P < 0,05$) smanjuje koncentraciju ukupnih proteina kod pacova (Agbaje i sar., 2009). Ovaj nalaz nije posledica toksičnog delovanja eugenola na hepatocite s obzirom na to da viša ispitivana doza (700 mg/kg/dan) nije uticala na koncentraciju proteina u serumu. Brojni su radovi koji ukazuju na to da eugenol i biljke koje ga sadrže imaju antioksidativno i hepatoprotektivno dejstvo i tako smanjuju uticaj lekova i drugih ksenobiotika na jetru (Pulla Reddy i Lokesh, 1996; Ubaid i sar., 2003; Chaieb i sar., 2007; Samson i sar., 2007; Sakr i sar., 2011; Venu Prasad i Khanum, 2012).

Tabela 3. Vrednosti biohemijskih parametara krvi kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Ukupni proteini (g/l)	67,40±1,12	68,00±1,16	66,83±1,08	67,17±0,79	69,67±1,99	71,67±3,32
Albumini (g/l)	11,8±0,73	11,8±0,53	13,50±0,34	12,50±0,34	12,67±0,84	10,83±0,65
Urea (g/l)	8,78±0,33	8,14±0,29	8,58±0,19	8,42±0,47	8,37±0,39	8,08±0,32
Kreatinin (g/l)	20,40±3,08	21,20±2,15	16,00±2,54	17,83±3,02	22,33±6,51	22,33±3,50
Alanin aminotranferaza ALT (u/l)	61,20±4,55	75,60±4,81	54,50±2,81*	64,50±1,78	61,50±1,15	71,17±6,27
Alkalna fosfataza ALP (u/l)	184,00±12,2	225,60±20,03	223,67±12,47	238,50±9,27	250,50±15,26	221,50±14,33
Kreatin kinaza CK (u/l)	1424,00±104,2	2296,80±590,9	1159,17±167,2	1229,50±319,5	968,83±318,2	911,67±279,97

* $P < 0,05$ značajnost razlike između kontrolne grupe i grupe tretirane eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan

Tabela 4. Vrednosti biohemijskih parametara krvi kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 28 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Ukupni proteini (g/l)	67,20±1,83	69,60±2,23	67,33±1,09	67,83±2,07	68,17±2,07	68,67±2,27
Albumini (g/l)	11,80±0,58	11,80±0,66	13,00±0,58	12,17±0,40	12,33±0,49	11,92±0,29
Urea (g/l)	11,80±0,58	11,80±0,66	13,00±0,58	12,17±0,40	12,33±0,49	11,92±0,29
Kreatinin (g/l)	27,40±2,38	20,40±2,87	17,50±2,76	18,33±3,23	14,67±2,95	20,92±2,11
Alanin aminotranferaza ALT (u/l)	64,40±4,09	74,20±3,44	58,00±2,39*-	66,50±1,84	62,17±1,58*	74,50±2,78*+
Alkalna fosfataza ALP (u/l)	191,60±8,93	231,80±19,01	242,67±8,60	210,33±7,50	245,17±15,14	230,58±10,07
Kreatin kinaza CK (u/l)	1442,40±78,9	2051,20±376,7	1220,33±157,7	1231,50±99,3	999,00±305,8*-	454,04±131,1*-

* značajno smanjenje aktivnosti ALT u poređenju sa K i grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan, $P < 0,05$,

*+ značajno povećanje aktivnosti ALT u poređenju sa grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan i dozom od 400 mg/kg/dan, kao i između grupa tretiranih sa dve više doze eugenola (200 i 400 mg/kg/dan), $P < 0,05$,

*- značajno smanjenje aktivnosti CK u odnosu na (K) grupu i grupe tretirane eugenolom u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan, $P < 0,05$.

Rezultati ispitivanja nižih (10 i 50 mg/kg/dan) i viših doza eugenola (200 i 400 mg/kg) pokazuju da on ne utiče na koncentraciju albumina u serumu pacova. Naši rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima Agbaje i sar. (2009) koji su ustanovili da više doze povećavaju koncentraciju albumina u serumu, ali tek posle tromesečne primene.

Uticaj eugenola na koncentraciju uree i kreatinina u serumu

Eugenol primenjivan u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tokom četiri nedelje ne utiče na koncentraciju uree u serumu pacova (tabele 3. i 4). Rezultati ispitivanja pokazuju da maksimalna doza eugenola (400 mg/kg/dan) ne remeti funkciju bubrega. Naši rezultati su donekle u saglasnosti sa nalazima Agbaje i sar. (2009), koji su ustanovili da ekstrakt karanfilića primenjivan tokom tri meseca u dozi od 700 mg/kg/dan prouzrokuje značajno povećanje koncentracije uree u krvi pacova, što je posledica nefrotoksičnog dejstva sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktu karanfilića, a ne samog eugenola (Agbaje i sar., 2009). Eugenol ne samo da nema nefrotoksičan efekat, već može da poboljša funkciju bubrega narušenu gentamicinom, ukoliko se primeni p.o. u dozi od 100 mg/kg/dan četiri dana pre i tokom terapije ovim antibiotikom (Said, 2011). Rezultati ispitivanja uticaja eugenola u dozi od 5 g/kg/dan tokom 14 dana kod pacova ukazuju na to da on značajno smanjuje koncentraciju uree u krvi i neznatno utiče na nivo kreatinina (Farhath i sar., 2012).

Sve ispitivane doze eugenola primenjivane tokom 14 i 28 dana nisu uticale na koncentraciju kreatinina u krvi pacova (tabele 3. i 4).

Uticaj eugenola na aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i kreatinkinaze (CK)

Značajno smanjenje ($P < 0,05$) aktivnosti ALT u serumu pacova ustanovljeno je posle dvonedeljne i četvoronedeljne primene eugenola u dozi od 10 mg/kg/dan (tabele 3. i 4), dok doza od 400 mg/kg/dan prouzrokuje značajno ($P < 0,05$) povećanje u odnosu na netretirane pacove i tretirane dozom od 10 mg/kg/dan (tabela 4). Aktivnost enzima ALT je osetljiv marker za procenu stepena oštećenja hepatocita. Povećanje aktivnosti ovog enzima u direktnoj je korelaciji sa stepenom oštećenja jetre (Adedapo i sar., 2004).

Naši rezultati ispitivanja mogućeg hepatotoksičnog dejstva eugenola ukazuju na to da najviša ispitivana doza ovog fenolnog jedinjenja, primenjivana tokom četiri nedelje, prouzrokuje neznatan stepen hipoksije i/ili oštećenje citoplazme hepatocita. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazom da vodeni ekstrakt karanfilića primenjivan tokom tri meseca u dozi od 700 mg/kg/dan prouzrokuje neznatno povećanje aktivnosti ALT (Agbaje i sar., 2009).

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče na aktivnost ALP u serumu pacova. Aktivnost ALP nije zavisila od doze eugenola niti od dužine

tretmana (tabele 3. i 4). Naši nalazi nisu u saglasnosti sa rezultatima Agbaje i sar. (2009), koji su dokazali značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima.

Eugenol primenjivan tokom dve nedelje ne utiče na aktivnost CK (tabela 3). Međutim, na kraju četvoronedelnog tretmana eugenolom u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan značajno je smanjena aktivnost enzima, a vrednost je niža u odnosu na one posle primene dve niže testirane doze i kontrole (tabela 4). Na osnovu ovih podataka, možemo da konstatujemo da eugenol ne samo da nema toksičan efekat na miokard i poprečno-prugaste mišiće, već ima izvestan protektivni efekat koji bi mogao da se pripíše njegovom antioksidativnom dejstvu (Cuvelier i sar., 1996; Fujisawa i sar., 2002). Poznato je da povećanje aktivnosti CK ukazuje na oštećenje poprečno-prugastih mišića i miokarda, odnosno na njihovo razaranje, mišićnu distrofiju, miozitis, infarkt miokarda i sl. (Rajaduraia i Stanely Mainzen Prince, 2007).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu da se izvedu sledeći zaključci:

Eugenol aplikovan 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.

Ispitivane doze eugenola primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokuju kvalitativno različite promene broja trombocita koje ne zavise od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj limfocita, monocita i granulocita.

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na proteinemiju, albuminemiju, koncentraciju uree i kreatinina u krvi.

Eugenol primenjivan tokom četiri nedelje ne utiče na aktivnost ALP. Sve tri niže doze statistički značajno smanjuju aktivnost ALT, dok je najviša doza povećava.

Eugenol davan tokom četiri nedelje u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan prouzrokuje značajno smanjenje aktivnosti CK.

LITERATURA

1. Adedapo A. A., Abatan M. O., Olorunsogo O. O. (2004): *Toxic effects of some plants in the genus Euphorbia on haematological and biochemical parameters of rats*. Veterinarski arhiv 74: 53–62.
2. Agbaje E. O., Adeneye A. A., Daramola A. O. (2009): *Biochemical and toxicological studies of aqueous extract of Syzigium aromaticum (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in rodents*. Afr J Trad Complement Altern Med 6: 241–54.
3. Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A., Rouabhia M., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2007): *The*

- chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae)*. Phytother Res 21: 501–6.
4. Cuvelier M., Richard H. and Berset C. (1996): *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary*. J AOACS, 73, 645–652.
 5. EMEA/MRL 406/98 Final. Committee for veterinary medicinal products *Cariophylli aetheroleum summary report*.
 6. EPSA (2006): *Consideration of eugenol and related hydroxyallylbenzene derivatives evaluated by JECEFA (65 th meeting) structurally related to ring-substituted phenolic substances evaluated by EFSA in FGE*. 22.
 7. Farhath S., Vijaya P., Vimal M. (2012): *Evaluation of toxicity in essential oils of geraniol, geranial acetate, gingerol and eugenol in rats*, Int J Phytomed 4: 465–8.
 8. Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. Sakagami H. (2002): *Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity*. Toxicology 177: 39–54.
 9. Hagan E. C., Hansen W. H., Fitzhugh O. G., Jenner P. M., Jones W. I., Taylor J. M., Long E. L., Nelson A. A., Brouwer J. B. (1967): *Food flavorings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity*. Food Cosmet Toxicol 5: 141–57.
 10. Hagan E. C., Jenner P. M., Jones W. H., Fitzhugh O. G., Long E. L., Brouwer J. G., Webb W. K. (1965): *Toxic properties of compounds related to safrole*. Toxicol Appl Pharmacol 7: 18–24.
 11. Nijssen B., van Inden-Visscher K., Donders J. *Volatile Compounds in Food*. 8.1, Zeist, Netherlands Central Instituut Vooz Voedingsonderzoek TNO.
http://www.voeding.tno.nl/Vcf/vcfno_vigate.cfm
 12. Pulla Reddy A. C. and Lokesh B. R. *Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats*. Toxicology 1996, 107: 39–45.
 13. Rajaduraia M. and Stanely Mainzen Prince P. (2007): *Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats*. Toxicology 230: 178–188.
 14. Said M. M. (2011): *The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney*. Fundam Clin Pharm, 25: 708–16.
 15. Sakr S. A., El-Abd S. A., Osman M., Kandil A. M., Helmy M. S. (2011): *Ameliorative effect of aqueous leave extract of Ocimum basilicum on Ccl₄-Induced hepatotoxicity and apoptosis in albino rats*. Journal of American Science, 7: 116–27.

16. Samson J., Sheeladevi R., Ravindran R. (2007): *Oxidative stress in brain and antioxidant activity of Ocimum sanctum in noise exposure*. Neurotoxicology, 28: 679-85.
17. Spoo W. (2004): *Concepts and toxicology*. In: Plumlee K. H. Clinical veterinary toxicology. Eds. K. H. Plumlee, Mosby 2-7.
18. Ubaid R. S., Anantrao K. M., Jaju J. B., Mateenuddin M. (2003): *Effect of Ocimum sanctum (OS) leaf extract on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats*. Indian J Physiol Pharmacol 47: 465-70.
19. Venu Prasad M. P. and Khanum F. (2012): *Antifatigue activity of ethanolic of Ocimum sanctum in rats*. Research Journal of Medicinal Plant 6, 37-46.

