

**UTICAJ EKSTRAKTA PODZEMNIH ORGANA *HELLEBORUS ODORUS W. ET K.* NA CRVENU KRVNU SLIKU
WISTAR PACOVA***

***INFLUENCE OF HELLEBORUS ODORUS W. ET K. UNDERGROUND
PARTS EXTRACTS ON RED BLOOD PICTURES OF WISTAR RATS***

**Vesna Davidović, M. Lazarević, Mirjana Joksimović-Todorović,
Z. Maksimović, M. Jovanović, N. Miljas****

U ovom radu su prikazani rezultati ispitivanja vrednosti parametara crvene krvne slike pacova soja Wistar, nakon intramuskularne aplikacije ekstrakta rizoma i korena Helleborus odorus W. et K. Ogljed je izveden u eksperimentalnim uslovima na 49 pacova soja Wistar, podeljenih u 7 grupa sa po 7 jedinki (jedna kontrolna i šest oglednih grupa). Kontrolnoj grupi pacova je intramuskularno aplikovan fiziološki rastvor (0,25 ml/100 g t.m.). U cilju određivanja dužine trajanja efekata ekstrakta, pacovima je aplikovan tečni ekstrakt podzemnih organa kukureka u koncentraciji od 10 mg/100 g t.m., a krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom nakon 24h, 48h i 72h. Ispitivan je i uticaj ekstrakta izlaganog povišenoj temperaturi na uočene efekte, 24h posle aplikacije inaktivisanog (56°C 30 min) ili denaturisanog ekstrakta (100°C 5 min), kao i efekat dijalizata ekstrakta. Dobijeni rezultati hematoloških analiza su ukazali na slabu hemolitičku aktivnost ekstrakta. Kod svih oglednih grupa, prosečan broj eritrocita bio je smanjen, ali se održao u granicama referentnih vrednosti. Zabeležene koncentracije hemoglobina i hematokrita u krvi pacova kontrolne i oglednih grupa bile su niže u odnosu na fiziološke vrednosti, pri čemu korišćeni ekstrakt nije značajno uticao na ispitivane parametre.

Ključne reči: kukurek, crvena krvna loza, pacovi

* Rad primljen za štampu 29. 04. 2010. godine

** Mr sci. med. vet. Vesna Davidović, asistent, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Mirjana Joksimović-Todorović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Univerzitet u Beogradu; dr sc. pharm. Zoran Maksimović, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Milan Jovanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; mr sci. med. vet. Niko Miljas, Veterinarska stanica Trebinje, R. Srpska, BiH

Uvod / Introduction

Etnoveterinarska ili narodna veterinarska medicina obuhvata integrisanje i primenu različitih lokalnih saznanja, veština i postupaka u cilju nege, očuvanja zdravlja i dobrobiti radnih i proizvodnih životinja (Köhler-Rollefson i Bräunig, 1998). Fitoterapija, kao vid tradicionalne medicine, podrazumeva sprečavanje nastanka i lečenje blažih oblika bolesti ljudi i životinja prirodnim lekovitim sirovinama i biljnim pripravcima. Viševjekovna upotreba lekovitih i drugih biljaka samo na osnovu empirijskih podataka, danas je potvrđena brojnim hemijskim, farmakološkim i toksikološkim ispitivanjima. To je omogućilo da se fitoterapija direktno uključi i u konvencionalnu terapiju. U fitoterapiji se primenjuju cele lekovite i druge biljke, njihovi delovi – droge sa strukturom odn. organizovane droge (osušeni i usitnjeni nadzemni i podzemni organi biljke) i droge bez strukture odnosno nećelijske droge (mlečni sok, etarsko ulje, vosak, sluz, balzam), kao i različiti sastojci i pripravci. Primenom pojedinih biljaka koje sadrže farmakološki aktivne sastojke (heterozide, alkalioide, tanine, saponozide) i pojedine nutritivne elemente (eterična ulja, vitamine, minerale, antioksidanse) može se uticati na jačanje odbrambenih sposobnosti organizma, na metaboličke procese i na uspešnije odstranjivanje štetnih materija iz organizma.

Stimulacija funkcija imunskog sistema primenom biljnih preparata važna je, posebno zbog činjenice da je u svim zemljama Evropske unije, od početka 2006. godine, zabranjeno korišćenje antibiotika u krmnim smešama kao profilaktičkih supstanci i kao stimulatora rasta. Zakonom o organskoj proizvodnji Republike Srbije (2002) zabranjena je upotreba antibiotika, kokcidiostatika, biostimulatora, hormona ili bilo kojih drugih materija kojima se stimuliše rast ili proizvodnja da bi neki proizvod imao oznaku organski proizvedene hrane. Istovremeno se fitoterapeutičima (ekstraktima biljaka, esencijama) i homeopatskim proizvodima (biljnim, životinjskim i mineralnim supstancama) daje prednost nad sintetičko-hemijskim veterinarskim preparatima u zdravstvenoj zaštiti životinja, ukoliko obezbede da njihovi terapijski efekti budu pozitivni (Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje, 2002). Postoje i toksične biljke koje se u tradicionalnoj i konvencionalnoj medicini koriste kao lekovite, u cilju podsticanja nespecifičnih i specifičnih odbrambenih mehanizama organizma, čime se povećava otpornost na bolesti i jedinke se na taj način štite od infekcija. U našoj zemlji, naročito u brdsko-planinskim krajevima, raste više vrsta kukureka (*Helleborus odoratus* Waldst. et Kit., *Helleborus niger* L., *Helleborus multifidus* Vis., *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *Helleborus serbicus* Adamović i dr.) koje pripadaju redu narkotičnih i otrovnih biljaka. Sveži delovi ovih biljaka se ne smeju koristiti jer može doći do neželjenih efekata kao što su: nesvestica, povraćanje, dijareja, grčevi i ukočenost, pa i smrt, kod životinja ili ljudi. U etnoveterinarskoj medicini se upotrebljava biljna droga *Helleborus* sp. (*Ranunculaceae*), koja predstavlja osušen rizom (podzemno stablo) gusto obrastao kratkim, tankim korenjem mrke boje (*Hellebori rhizoma et radix*). Nespecifična nadražajna terapija primenjivana je

je u našem narodu (Tucakov, 1996), kao i u rumunskoj i makedonskoj tradicionalnoj medicini (Bogdan i sar., 1990; Tosevski i sar., 2004) transkutanom implantacijom rizoma kukureka. Postupak zatravljivanja životinja ili uvlačenja spreža sprovodi se postavljanjem dobro opranog i osušenog rizoma u ranu napravljenu debelom iglom (šilom) kroz uho ovaca i svinja, đerdan goveda i kožu grudi kod konja. Na mestu implantacije pojavljuju se crvenilo i otok, koji traju nedelju dana, pri čemu je opšte stanje životinja dobro. Ovoj prirodnoj metodi lečenja, se podvrgavaju nedovoljno razvijena grla kod kojih je uočeno odsustvo apetita, kao i životinje obbolele od hroničnih bolesti u cilju akutiziranja procesa radi bržeg ozdravljenja. Bogdan i sar. (1990) su ispitivali ovaj vid nespecifične nadražajne terapije kod većeg broja različitih domaćih životinja. Analizom diferencijalne krvne slike, ovi autori su utvrdili izraženu leukocitozu i neutrofiliju kod svih tretiranih životinja koja je trajala više od 6 dana (izuzev kod ovaca). U istraživanjima Davidović i sar. (2006, 2008, 2009, 2010) utvrđeno je da subkutana, intraperitonealna i intramuskularna aplikacija različitih doza ekstrakta podzemnih organa *Helleborus odoratus* W. et K. pacovima soja Wistar ima za posledicu značajno povećanje ukupnog broja leukocita i neurofilnih granulocita i aktivaciju brzih, nespecifičnih odbrambenih mehanizama. Koren i rizom velikog broja biljnih vrsta roda *Helleborus* sp. se koriste u lečenju pneumonije i bronhitisa kod goveda (Raimondo i Lentini, 1990; Passalacqua i sar., 2006), infektivnih bolesti svinja i ovaca (Guarrera, 1990) i protiv zubobolje (Leporatti i Pavesi, 1989). Utvrđeno je da prečišćeni ekstrakt *Helleborus* L. deluje imunostimulatorno i proinflamatorno (Kerek, 1997) i da modifikuje imunski odgovor u stanjima primarne ili sekundarne imunodeficijencije (Bolte i sar., 2001).

Hellebori rhizoma et radix sadrži bufadienolidne heterozide (Karrer, 1943; Wissner i Kating, 1974; Petričić i sar., 1977; Watanabe i sar., 2003), triterpenske i steroidne saponozide (Ribár i sar., 1986; Liedke i sar., 1997; Rosselli i sar., 2009), masne materije i masne kiseline (Argay i sar., 1996), ekdisteroide (Colombo i Tomé, 1993), alkaloidne (Slavík, 1987) i ugljene hidrate (Živanov-Stakić i Mladenović, 1971). Saponozidi imaju jako nadražajno dejstvo, podstiču kontrakcije buraga i ubrzavaju motilitet creva i uterusa, pa se kukurek u narodnoj medicini koristi kao purgativ, kao lokalno kontraceptivno sredstvo i za izazivanje abortusa. Iz pojedinih vrsta kukureka izolovane su različite aglikonske komponente steroidnih saponozida (sapogenini), površinski aktivnih jedinjenja koja smanjuju napon na dodirnoj površini dve faze koje se ne mešaju. Na ovoj osobini se zasnivaju biološka i farmakološka delovanja saponozida, koji se vezuju za sterole ćelijskih membrana i povećavaju njihovu permeabilnost, što se kod eritrocita manifestuje hemolizom i gubitkom hemoglobina. Petričić i sar. (1971) su uporednim ispitivanjem hemolitičkog delovanja saponozida iz podzemnih delova većeg broja vrsta roda *Helleborus* L., u *in vitro* uslovima, utvrdili veliku razliku ne samo između pojedinih vrsta, već i u okviru iste vrste sa različitih staništa. Pri tome, hemolitičko delovanje nije bilo u korelaciji sa količinom različitih saponozida, već je zavisilo od njihove strukture i moglo se višestruko povećati dodavanjem enzimskog sistema

koji sadrži β -glikozidazu. Najintenzivniju hemolizu, čak i u velikom razređenju, izazivaju saponini sa razgranatim ugljenohidratnim lancem od 4 do 5 monosaharida.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ogledne životinje. Ogled je izveden u eksperimentalnim uslovima na 49 pacova soja Wistar, oba pola, starosti dva meseca, telesne mase 200 ± 10 g. Formirano je 7 grupa sa po 7 jedinki (jedna kontrolna i šest oglednih grupa). Kontrolnoj grupi pacova (Grupa I) je intramuskularno aplikovan fiziološki rastvor u količini od 0,25 ml/100 g t.m., što je odgovaralo zapremini aplikovanog ekstrakta. U cilju određivanja dužine trajanja efekta ekstrakta rizoma i korena kukureka (EK) na crvenu krvnu sliku, pacovima je intramuskularno aplikovan (IM) u zadnji ekstremitet tečni EK u koncentraciji od 10 mg/100 g t.m., a krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom nakon 24h (Grupa II), 48h (Grupa III) i 72h (Grupa IV). Ispitivan je i uticaj delovanja povišene temperature na uočene efekte ekstrakta, 24h posle IM aplikacije inaktivisanog (56°C 30 min) (Grupa V) ili denaturisanog ekstrakta (100°C 5 min) (Grupa VI). Efekat dijalizata ekstrakta rizoma i korena kukureka na vrednosti parametara crvene krvne loze, ispitan je 24h posle njegove IM aplikacije (Grupa VII).

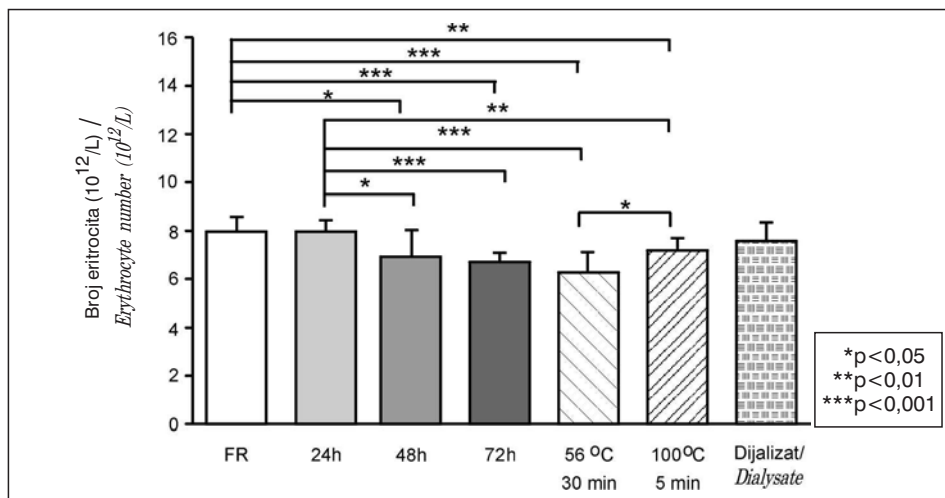
Postupak ekstrakcije. Osušen rizom sa korenjem *H. odoratus* W. et K., prethodno usitnjen do konzistencije grubog praška, ekstrahovan je u aparatu za kontinuiranu ekstrakciju prema Soxhlet-u rastvaračima rastuće polarnosti: petroleom, hloroformom i metanolom. Ekstrahovani biljni materijal je potom dva puta ekstrahovan vodom, a kao krajnji proizvod dobijen je suvi ekstrakt žuto-okere boje koji je rastvaran u fiziološkom rastvoru do potrebne koncentracije. Dijalizat EK je dobijen nakon trostepene dijalize u celofanskoj vrećici (cutt off 12 kDa).

Određivanje vrednosti parametara crvene krvne slike. Vrednosti hematoloških parametara: broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita (HCT) određivani su pomoću automatskog hematološkog analizatora Arcus Diatron®, GmbH Wien, Austria. Testiranje značajnosti ustanovljenih razlika između srednjih vrednosti ispitivanih hematoloških parametara izvršeno je Studentovim-t testom.

Rezultati istraživanja i diskusija / *Results and Discussion*

Tokom ogleda, najveći prosečan broj eritrocita utvrđen je kod kontrolne grupe pacova ($7,93 \pm 0,50 \times 10^{12}/\text{L}$). Kod svih oglednih grupa kojima je aplikovan EK došlo je do smanjenja broja eritrocita u odnosu na kontrolnu grupu, a razlika nije bila statistički značajna samo 24h posle aplikacije EK i dijalizata EK (između kojih takođe nije utvrđena statistička značajnost). Ispitivanjem uticaja EK na promenu broja eritrocita u određenom vremenskom periodu, utvrđen je najveći broj eritrocita 24h posle aplikacije EK ($7,92 \pm 0,50 \times 10^{12}/\text{L}$) što je značajno

više u odnosu na ove vrednosti posle 48h ($6,91 \pm 1,08 \times 10^{12}/L$) i posle 72h ($6,67 \pm 0,38 \times 10^{12}/L$). Prosečna vrednost broja eritrocita u krvi pacova II grupe 24h posle tretmana EK bila je značajno veća u odnosu na ove vrednosti kod jedinki kojima je aplikovan denaturisan ($7,09 \pm 0,44 \times 10^{12}/L$) ili inaktivisan ekstrakt ($6,24 \pm 0,69 \times 10^{12}/L$) (grafikon 1).

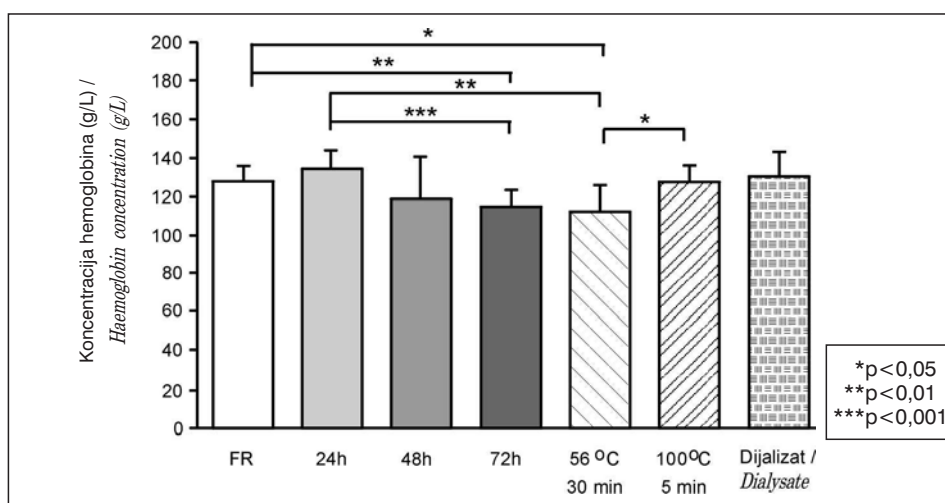


Grafikon 1. Broj eritrocita ($10^{12}/L$) kod pacova tokom ogleda /
Graph 1. Number of erythrocytes ($10^{12}/L$) in rats during experiment

U svim ispitivanim grupama, prosečan broj eritrocita je bio u granicama referentnih vrednosti koje navode Pritchett i Corning (2004) ($5,4-8,5 \times 10^{12}/L$) i Moore (2000) ($7,25 \pm 0,93 \times 10^{12}/L$ kod mužjaka i $6,85 \pm 0,61 \times 10^{12}/L$ kod ženki). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Petričića i sar. (1971) koji navode da *H. odoratus* W. et K. ispoljava slabu hemolitičku aktivnost (HD u Ph Jug. Sap.jed./g droge), koja je niža u poređenju sa drugim biljkama roda *Helleborus* L. Međutim, značajno povećanje stepena hemolize u krvi pacova tokom određenog vremenskog perioda (48h i 72h posle aplikovanja EK) nije u saglasnosti sa rezultatima ovih autora koji su posmatrajući dinamiku hemolize u *in vitro* uslovima utvrdili da se hemoliza uglavnom odvija u prva 3h i da posle toga nema bitnih promena. Ristoska i sar. (2002) navode da se prosečan broj eritrocita u krvi nazimica smanjio 24h posle aplikovanja EK, ali da se održao u fiziološkim granicama. Rezultati Tosevskog i sar. (2004) dobijeni na prasadima u starosti 52 dana ukazuju na smanjenje broja eritrocita za 22% druge i treće nedelje nakon aplikacije EK, dok je kod prasadi u uzrastu od 35 dana broj eritrocita bio povećan prve i druge nedelje posle tretmana.

Koncentracija hemoglobina u krvi pacova kontrolne grupe bila je $127,71 \pm 8,12$ g/L. U II ogednoj grupi, 24h posle aplikacije EK ili aplikacije dijali-

zata EK (grupi VII) ove vrednosti su bile nešto veće ($134,29 \pm 9,20$ g/L odn. $129,29 \pm 13,00$ g/L) u odnosu na kontrolnu grupu. Ove razlike nisu bile statistički značajne. Ostale ogledne grupe su imale niže vrednosti koncentracije hemoglobina u odnosu na kontrolnu grupu, a statistički značajne razlike zabeležene su u odnosu na IV grupu 72h posle aplikacije EK ($114,71 \pm 7,06$ g/L) i u odnosu na V grupu tretiranu EK inaktivisanim 30 min na 56°C ($111,29 \pm 13,94$ g/L). Značajno veća koncentracija hemoglobina je zabeležena u VI grupi pacova posle aplikacije EK denaturisanog 5 min na 100°C ($126,57 \pm 7,85$ g/L) u odnosu V grupu koja je dobila inaktivisani EK ($p < 0,05$) (grafikon 2).

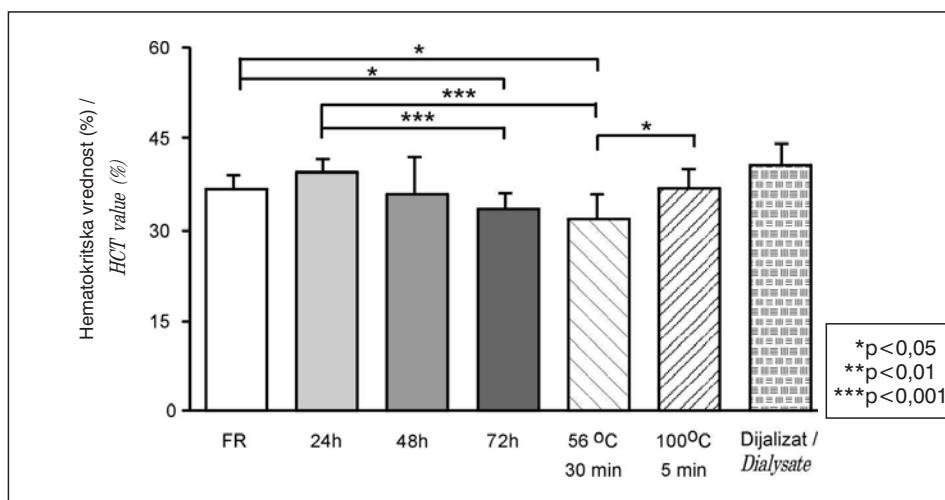


Grafikon 2. Koncentracija hemoglobina (g/L) kod pacova tokom ogleda /
Graph 2. Haemoglobin concentration (g/L) in rats during experiment

U odnosu na fiziološke vrednosti za koncentraciju hemoglobina u krvi pacova, koje iznose 143 ± 10 g/L (Moor, 2000), tokom ogleda su utvrđene niže vrednosti kod kontrolne i oglednih grupa pacova. Tosevski i sar. (2004) su utvrdili smanjenje koncentracije hemoglobina u proseku za 11% kod prasadi u starosti od 52 dana, četrnaestog i dvadeset prvog dana posle aplikacije EK. Rezultati dobijeni na pacovima nisu u saglasnosti sa rezultatima Tosevskog i sar. (2004), koji su kod prasadi uzrasta od 35 dana konstatovali hemoglobinemiju u okviru fizioloških granica pre i posle aplikovanja EK, kao ni sa rezultatima Ristoske i sar. (2002), koji su takođe utvrdili da je vrednost koncentracije hemoglobina ostala u granicama referentnih vrednosti posle aplikovanja EK nazimicama.

Najveća hematokritska vrednost je zabeležena u VII grupi pacova 24h posle aplikovanja dijalizata EK ($40,31 \pm 3,93\%$), a razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($36,89 \pm 2,19\%$) i II grupu 24h posle aplikovanja EK ($39,34 \pm 2,24\%$) nije bila statistički značajna. Praćenjem uticaja EK na HCT utvrđeno je da je samo u ogled-

noj grupi IV (72h posle primene EK) hematokriti bio $33,31 \pm 2,33\%$, što je značajno niža vrednost u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Nakon termičke obrade i primene EK, utvrđena je značajno niža HCT posle aplikacije inaktivisanog EK ($31,86 \pm 3,80\%$) u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), II grupu 24h posle aplikacije EK ($p < 0,001$) i VI grupu kojoj je aplikovan denaturisan EK ($p < 0,05$) (grafikon 3).



Grafikon 3. Hematokritska vrednost (%) kod pacova tokom oglada /
Graph 3. Haematocrit value (%) in rats during experiment

Hematokritske vrednosti u krvi pacova ispitivanih grupa bile su nešto niže od referentnih vrednosti 37-49%, koje navode Pritchett i Corning (2004). Rezultati dobijeni na pacovima 24h posle primene EK u skladu su sa ispitivanjem hematokritske vrednosti na nazimicama 24h posle aplikacije EK koje su sproveli Ristoska i sar. (2002), pri čemu su utvrdili da je ova vrednost ostala u granicama fiziološkog opsega.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata naših istraživanja može se zaključiti sledeće:

1. Intramuskularna aplikacija ekstrakta rizoma i korena *Helleborus odoratus* W. et K. ima za posledicu smanjenje broja eritrocita kod svih oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu pacova, ali su dobijene vrednosti bile u referentnim granicama za ovu životinjsku vrstu.

2. Tokom oglada su utvrđene niže vrednosti koncentracije hemoglobina i hematokrita kod svih ispitivanih grupa u odnosu na fiziološke vrednosti.

Korišćeni ekstrakt nije uticao značajno na vrednosti ovih parametara, osim kod IV grupe (72h posle aplikacije EK) i V grupe (inaktivisani EK), kod kojih su utvrđene značajno niže vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu i II grupu pacova 24h nakon primene EK.

3. Ekstrakt podzemnih organa *H. odorus* W. et K. ispoljava slabu hemolitičku aktivnost.

Literatura / References

1. Argay G, Kálmán A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Ribár B. Crystal structure of stigmast-5-en-3 β -ol monohydrate, C₂₉H₅₂O₂. Zeitschrift für Kristallographie 1996; 211: 725-7.
2. Bogdan I, Nechifor A, Bacea I, Hruban E. Aus der rumänischen Volksmedizin: Unspezifische Reiztherapie durch transkutane implantation der Nieswurz (*Helleborus purpurascens*, Fam. *Ranunculaceae*) bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Dtsch Tierärztl Wschr 1990; 97, 12: 525-9.
3. Bolte S, Petrut H, Trif R. Imunostimularea cu extract de *Helleborus* spp. Lucrari stiintifice med vet, Timisoara 2001; 34: 79-86.
4. Colombo ML, Tomè F. Ecdysteroid Production in *Helleborus odorus* ssp. *laxus*: Response to Different Environments. Int J Pharmacogn 1993; 31, 4: 311-5.
5. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Hristov S, Relić R, Stanković B. Uticaj ekstrakta rizoma i korena kukureka (*Helleborus odorus* Waldst. et Kit.) na povećanje odbrambenih sposobnosti organizma. XVII Inovacije u stočarstvu, 16-17. novembar 2006. god., Beograd. Biotehnologija u stočarstvu 2006; 22: 773-80.
6. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Jovanović M. Primena *Helleborus* L. i drugog bilja u profilaksi i terapiji bolesti životinja. Lekovite sirovine 2008; 28: 63-9.
7. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Jovanović M. Uticaj ekstrakta kukureka (*H. odorus* W. et K.) na neke parametre krvne slike Wistar pacova. XI regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja. Clinica veterinaria Subotica, 19-21. jun 2009; 127-8.
8. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Jovanović M. Imunomodulatorno delovanje ekstrakta podzemnih organa kukureka (*Helleborus odorus* W. et K.) kod Wistar pacova. XV savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učesćem Čačak. Zbornik radova, 26-27. mart 2010; 15(17): 547-52.
9. Guarrera PM. Use tradizionali delle piante in alcune aree marchigiane. Informatore Botanico Italiano 1990; 22: 155-67.
10. Karrer W. Über Hellebrin, ein krystallisiertes Glykosid aus Radix Hellebori nigri, Helvetica Chimica Acta 1943; 26: 1353-67.
11. Kerek F. Offenlegungsschrift, Patentnummer: DE 196 00 301 A1, Bioregulatorischer Wirkstoff, Verfahren zu seiner Herstellung sowie dessen Verwendung, Deutsches Patentamt. München, Germany, 1997.
12. Köhler-Rollefson I, Bräunig J. Anthropological veterinary medicine: The need for indigenousizing the curriculum. Proceedings of the 9th AITVM Conference Harrare, Sep 14-18, 1998.

13. Leporatti ML, Pavesi A. Usi nuovi, rari o interessanti di piante officinali di alcune yone delle Calabria. *Webbia* 1989; 43: 269-89.
14. Liedtke S, Lorch E, Goedings P, Wichtl M. Isolierung von β -Ecdyson und Macranthosid I aus Wurzeln und Rhizomen von *Helleborus niger* subsp. *niger* (Ranunculaceae). *Pharmazie* 1997; 52: 964-5.
15. Moore MD. Chapter 189: Hematology of the Rat (*Rattus norvegicus*). In: Feldman FB et al., editors. Fifth edition Schalm's Veterinary Hematology. Copyright © 2000 Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
16. Passalacqua NG, De Fine G, Guarrera PM. Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region (Southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomed* 2006; 2: 52.
17. Petričić J, Tarle D, Abinun S. Hemolitička djelotvornost nekih vrsta roda *Helleborus*. *Acta Pharm Jug* 1971; 21: 71-8.
18. Petričić J, Tarle Đ, Knežević E. *Helleborus* chemotypes from Yugoslavia recognizable by hellebrin contents. *Acta Pharm Jug* 1977; 27: 127-9.
19. Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje, "Službeni list SRJ", br. 51/2002, Zakona o organskoj poljoprivredi. "Službeni list SRJ" 28/2000.
20. Pritchett KR, Corning BF. Biology and Medicine of Rats. In: Reuter JD and Suckow MA, editors. Laboratory Animal Medicine and Management. International Veterinary Information Service. Ithaca NY, 2004 (www.ivis.org).
21. Raimondo FM, Lentini F. Indagini etnobotaniche in Sicilia. I Le piante della flora locale nella tradizione popolare delle Madonie (Palermo). II *Naturalista Siciliano* 1990; 3-4: 77-99.
22. Ribár B, Kapor A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Argay G, Kálmán A. Structure of Spirosta-5,25(27)-diene-3 β ,11 α -diol. *Acta Cryst* 1986; C42: 1780-2.
23. Ristoska D, Ristoski T, Tosevski J, Ulčar I. Use of the *Helleborus odoratus* extract in early detection of pathological conditions in pig production. Proceedings of the 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology; Grugliasco (Turin) Italy, 2002: 215.
24. Rosselli S, Maggio A, Bruno M, Spadaro V, Formisano C, Irace C, Maffettone C, Mascolo N. Furostanol Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from *Helleborus bocconei* ssp. *intermedius*. *Phytotherapy Research* 2009; 23: 1243-9.
25. Slavik J, Bochoráková J, Slaviková L. Occurrence of magnoflorine and corytuberine in some wild or cultivated plants of Czechoslovakia. *Collection Czechoslovak Chem Commun* 1987; 52: 804-12.
26. Tosevski J, Ulčar I, Hajrulai-Musliu Z, Ristoska D, Lončarević A. Use of plant mitogenic compounds in veterinary practice. Proceedings of the 6th international Symposium in animal clinical pathology and therapy. *Clinica veterinaria Budva*, Jun 14-18 2004; 100-6.
27. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1996.
28. Watanabe K, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y. Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*. *J Nat Prod* 2003; 66: 236-41.
29. Wissner W, Kating H. Botanische und phytochemische untersuchungen an den Europäischen und Kleinasiatischen arten der gattung *Helleborus*, II. Vergleichende phytochemische Untersuchungen der Herzglykosid- und Saponin-Führung. *Planta Medica* 1974; 26: 228-49.

30. Živanov-Stakić D, Mladenović M. Identifikacija nekih ugljenih hidrata i steroida biljke *Helleborus odorus* hromatografijom na tankom sloju. Arh farm 1971; 4: 187-91.

ENGLISH

INFLUENCE OF EXTRACTS OF *HELLEBORUS ODORUS* W. ET K. UNDERGROUND PARTS ON RED BLOOD CELL COUNT OF WISTAR RATS

Vesna Davidović, M. Lazarević, Mirjana Joksimović-Todorović, Z. Maksimović, M. Jovanović, N. Miljas

This paper presents the results of investigations of parameter values of the red blood cell count in Wistar rats, after intramuscular application of rhizome and root extract of *Helleborus odorus* W. et K (HE). The trial was conducted in experimental conditions on 49 Wistar rats divided into 7 groups with 7 animals per unit (control and six experimental groups). The control group was treated by an intramuscular injection of sterile saline (0.25 ml/100 g BM). For the purpose of determining the duration of the HE effects, the animals were injected with a dose of 10 mg/100 g BM and blood was collected by cardiac taps after 24, 48 and 72 hrs. Moreover, we investigated the influence of elevated temperatures on the noted HE extract effects, 24 hrs after the application of the inactivated (56°C 30 min) or denatured (100°C 5 min) extract, as well as the influence of dialyzed HE. The obtained results of haematological analyses have pointed out the weak hemolyses activity of the extract. In all experimental groups, the erythrocyte count was decreased, but remained within reference values. Haemoglobin concentration and haematocrit values in the experimental and the control groups of rats were decreased in comparison to the physiological values, while the applied extract did not significantly affect the examined parameters.

Key words: *Helleborus* sp., red blood cell count parameters, rats

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *HELLEBORUS ODORUS* W. ET K. НА КРАСНУЮ КРОВЯНУЮ КАРТИНУ WISTAR КРЫС

Весна Давидович, М. Лазаревич, Миряна Йоксимович-Тодорович, З. Максимович, М. Йованович, Н. Миляс

В этой работе показаны результаты испытания стоимости параметров красной кровяной картины крыс штамма *Wistar*, после внутримышечной аппликации экстракта корня и корня *Helleborus odorus* W et K. Опыт выполнен в экспериментальных условиях на 49 крыс штамма *Wistar*, разделенных в 7 групп с по 7 единичных животных (контрольная и шесть опытных). Контрольной группе крыс внутримышечно апплицирован физиологический раствор (0,25 мл/100 г м.т.). С целью определения длины продолжительности эффектов экстракта, крысам апплицирован жидкий экстракт подземных органов чемерицы в концентрации от 10 мг/100 г м.т., а кровь образчикована кардиальной пункцией после 24 ч, 48 ч. и 72 ч. Испы-

тывано и влияние экстракта подвергнутого повышенной температуре на замеченные эффекты, 24 ч. после аппликации инактивационного (56°C 30 мин) или денатурированного экстракта (100°C 5 мин), словно и эффект диализата экстракта. Полученные результаты гематологических анализов указали на слабую гемолитическую активность экстракта. У всех опытных групп, среднее число эритроцитов было уменьшено, но поддержался в границах референтных стоимостей. Записаны концентрации гемоглобина и гематокрита в крови крыс контрольной и опытных групп были ниже в отношении физиологической стоимости, при чём использованный экстракт не значительно влиял на испытываемые параметры.

Ключевые слова: чемерица, красная кровяная лоза, крысы