

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Mr Vesna M. Davidović

UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA
(*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. *ET* KIT.) NA
HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE
AKUTNE FAZE I FUNKCIJE NEUTROFILNIH
GRANULOCITA PACOVA

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

MSc Vesna M. Davidović

INFLUENCE OF HELLEBORES INGREDIENTS
(*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. *ET* KIT.) ON
HEMATOLOGICAL PARAMETERS, ACUTE PHASE
PROTEINS AND NEUTROPHIL GRANULOCYTES
FUNCTIONS IN RATS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

KOMISIJA

Mentor:

Dr Miodrag Lazarević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Članovi komisije:

Dr Nenad Milić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Mirjana Joksimović Todorović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Svetlana Grdović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Datum odbrane:

POSVĚCŮJEM SVOJOU VOLJENOU MAJCI

UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. ET KIT.) NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA

Apstrakt

U okviru ove doktorske disertacije je ispitivan uticaj sastojaka petroletarskog (PEK), hloroformskog (HEK), metanolnog (MEK) i vodenog ekstrakta (EK) rizoma i korena *Helleborus odorus* Waldst. et Kit. na hematološke parametre, odgovor akutne faze (brzinu sedimentacije i koncentraciju proteina akutne faze) i funkcije neutrofilnih granulocita (stepen fagocitoze i intenzitet oksidativnog praska) kod Wistar pacova. Kontrolnoj grupi je intramuskularno (IM) aplikovan sterilan fiziološki rastvor u količini od 2,5 ml/kg TM. Ogledne grupe su IM tretirane različitim ekstraktima kukureka u dozama od 50, 100 ili 200 mg/kg TM, a krv za analizu je uzimana posle 24h. Osim toga, ispitivan je i uticaj vodenog i metanolnog ekstrakta aplikovanih 24h nakon trokratnog tretmana pacova deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM, na uočene efekte. Ogled je izveden na ukupno 147 pacova podeljenih u 21 grupu od po 7 jedinki.

Aplikovanje različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM) metanolnog i vodenog ekstrakta je dovelo do značajnog povećanja broja ukupnih leukocita, broja i procenta neutrofilnih granulocita, srazmernog primenjenoj dozi. Ove promene su bile izražene i kada se ekstrakti primenjuju 24h nakon aplikacije deksametazona. Aplikovanje ovih ekstrakata je imalo za posledicu smanjenje broja i procenta limfocita i povećanje neutrofilno/limfocitnog indeksa u svim oglednim grupama. Srednje vrednosti navedenih parametra su se neznatno menjale posle aplikovanja petroletarskog i hloroformskog ekstrakta. Ispitivani ekstrakti nisu uticali na broj i procenat monocita, ali je povećanje broja ovih krvnih elemenata registrovano kod primene MEK i EK nakon tretmana pacova deksametazonom. Upotrebljeni ekstrakti nisu ispoljili hemolitičku aktivnost, koncentracija hemoglobina je bila značajno povećana, a broj trombocita smanjen.

Značajno bržu sedimentaciju u svim posmatranim intervalima su imali eritrociti pacova oglednih grupa kojima su aplikovani pojedinačni ekstrakti kukureka ili u kombinaciji sa deksametazonom, a najizraženiji efekat su ispoljili metanolni i vodeni ekstrakt. Statistički značajno smanjenje koncentracije albumina i povećanje koncentracija fibrinogena je utvrđeno nakon pojedinačnog aplikovanja MEK i EK ili u kombinaciji sa deksametazonom. Tretman oglednih grupa petroletarskim i hloroformskim ekstraktom nije uticao na koncentraciju albumina, a ispoljio je negativan efekat na koncentraciju fibrinogena. Aplikovanje MEK i EK je dovelo do značajnog povećanja koncentracije haptoglobina, a sa povećanjem aplikovane doze, povećavala se i vrednost ovog parametra. Razlika u prosečnoj vrednosti koncentracije haptoglobina kod pacova kojima je trokratno aplikovan deksametazon nije bila signifikantna u odnosu na grupe koje su dodatno tretirane navedenim ekstraktima. Upotrebljeni metanolni i vodeni ekstrakt su doveli do značajnog povećanja stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita. Akutna zapaljenska reakcija se razvija 24h posle pojedinačnog aplikovanja različitih doza metanolnog i

vodenog ekstrakta ili u kombinaciji sa deksametazonom, ali ne i nakon tretmana petrolearskim i hloroformskim ekstraktom.

Ključne reči: akutna zapaljenska reakcija, funkcije neutrofilnih granulocita, hematološki parametri, kukurek, pacovi.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Fiziologija

UDK broj: 599.323.4:616.15

INFLUENCE OF HELLEBORES INGREDIENTS (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. *ET* KIT.) ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS, ACUTE PHASE PROTEINS AND NEUTROPHIL GRANULOCYTES FUNCTIONS IN RATS

Abstract

Within the framework of this PhD thesis, we investigated effects that ingredients of petroleum ether (PHE), chloroform (CHE), methanol (MHE) and aqueous extract of rhizome and root of *Helleborus odorus* Waldst. *et* Kit. (HE) might have on hematological parameter values, acute phase response (sedimentation rate and concentration of acute phase proteins) and neutrophil granulocytes functions (intensity of phagocytosis and oxidative burst) in Wistar rats. Sterile saline, in the amount of 2,5 ml/kg BW, was applied intramuscularly (IM) to the animals in a control group. The experimental groups were treated intramuscularly with different Hellebores extracts in a doses of 50, 100 or 200 mg/kg BW and blood was collected following 24 hrs. We have also investigated the influence of methanol and aqueous extracts injected 24 hrs after triple treatments of rats with dexamethasone in a dose of 1 mg/kg BW on the parameters enlisted above. The experiment was conducted on the total of 147 rats divided in 21 groups consisting of 7 animals each.

Application of different MHE and HE doses (50, 100 or 200 mg/kg BW) resulted in significant increase of total leukocyte count, number and percent of neutrophil granulocytes and this effect was dose dependent. These effects were also evident 24 hrs following dexamethasone treatment. In all experimental groups, lymphocyte count and percent of lymphocytes was decreased while neutrophil/lymphocyte index was increased. Other two extracts (PHE and CHE) did not exert significant effects on the above mentioned parameters. Hellebores extracts didn't influence monocyte number and percent, but increase in their number was registered after treatment with MHE and HE following dexamethasone injections. Thrombocyte count was decreased. Applied extracts didn't exert hemolytic activity and hemoglobin concentration was significantly increased.

Sedimentation rate in all observed intervals was significantly increased in all groups treated with Hellebores extracts alone or in combinations with dexamethasone. Methanol and aqueous extract exerted were the most effective. Statistically significant decrease in albumin concentration and elevation of fibrinogen concentration was registered after single application of MHE and HE alone or in combination with dexamethasone. Treatment of experimental groups with petroleum ether and chloroform extract didn't elevate albumin concentration, and exerted negative influence on the fibrinogen concentration. Application of MHE and HE resulted in significant haptoglobin concentration increase and this effect was dose dependent. Differences in haptoglobin mean values following triple treatment with dexamethasone didn't significantly differ when compared to the values recorded in groups additionally treated with Hellebores extracts. Intensity of phagocytosis and oxidative burst by neutrophils were significantly increased with MHE and HE. Acute inflammatory reaction developed 24 hrs following application of different MHE and HE doses alone, or in combination with dexamethasone, but not and after treatment with PHE and CHE.

Key words: acute inflammatory reaction, Hellebores, hematological parameters, neutrophil granulocytes functions, rats.

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific area: Physiology

UDC: 599.323.4:616.15

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. FITOTERAPIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI	3
2.2. TOKSIČNOST BILJNIH VRSTA	7
2.3. TAKSONOMSKI POLOŽAJ VRSTE <i>H. ODORUS</i> WALDST. ET KIT.	9
2.4. RASPROSTRANJENOST, PODELA I KARAKTERISTIKE BILJAKA RODA <i>HELLEBORUS</i> L.	9
2.5. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE VRSTE <i>H.ODORUS</i> W. ET K.	13
2.6. SASTOJCI BILJAKA RODA <i>HELLEBORUS</i> L. (PRIMARNI I SEKUNDARNI METABOLITI)	14
2.6.1. Sekundarni metaboliti u vrstama roda <i>Helleborus</i> L.	14
2.6.1.1. Heterozidi (glukozidi, glikozidi)	15
2.6.1.1.a. Kardiotonični (kardioaktivni, kardiačni) heterozidi iz podzemnih organa <i>Helleborus</i> L.	15
2.6.1.1.b. Kardiotonični (bufadienolidni), flavonoidni i fenolni heterozidi iz nadzemnih organa <i>Helleborus</i> L.	27
2.6.1.2. Saponozidi (triterpenski monodezmozidni i bidezmozidni, steroidni spirostanski i furostanski) i ekdisteroidi	29
2.6.1.3. Alkaloidi	37
2.6.2. Primarni metaboliti u vrstama roda <i>Helleborus</i> L.	38
2.6.2.1. Ugljeni hidrati (glucidi)	38
2.6.2.2. Lipidne materije (ukupne masne kiseline i neosapunjive masne materije)	40
2.6.2.3. Aminokiseline i peptidi	42
2.7. MEDICINSKO-ISTORIJSKO GLEDIŠTE PRIMENE KUKUREKA	43
2.7.1. Primena kukureka u narodnoj tradicionalnoj medicini i etnoveterinarskoj medicini	45
2.7.2. Primena kukureka u konvencionalnoj medicini	51
2.8. BIOAKTIVNA SVOJSTVA I PRAVCI DELOVANJA EKSTRAKTA RIZOMA I KORENA KUKUREKA	56
2.8.1. Proinflamatorno i imunostimulativno delovanje	57
2.8.2. Antibakterijsko delovanje i pojava oksidativnog (respiratornog) praska	65
2.8.3. Uticaj na koncentraciju proteina akutne faze i status elektrolita krvnog seruma	69
2.8.4. Antitumorska (antikancerogena) aktivnost	72
2.8.5. Analgetsko, antiinflamatorno i supresivno delovanje na T limfocite	79
2.8.6. Repelentno i insekticidno delovanje	85
2.9. DELOVANJE GLUKOKORTIKOSTEROIDA (DEKSAMETAZONA)	87
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	93
4. MATERIJAL I METODE RADA	95
4.1. MATERIJAL	95
4.1.1. Izbor materijala	95
4.1.2. Priprema ekstrakata rizoma i korena <i>H. odorus</i> W. et K. (Postupak ekstrakcije pomoću rastvarača rastuće polarnosti)	96

4.1.3. Uzimanje uzoraka krvi	98
4.2. METODE	98
4.2.1. Određivanje vrednosti hematoloških parametara	98
4.2.2. Određivanje koncentracije proteina akutne faze - albumina, fibrinogena i haptoglobina u krvnoj plazmi	99
4.2.3. Određivanje funkcija neutrofilnih granulocita (stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska) u punoj krvi	100
4.2.4. Statistička obrada rezultata	102
5. REZULTATI	103
5.1. REZULTATI HEMATOLOŠKIH ISPITIVANJA	104
5.1.1. Osnovni hematološki parametri i parametri akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikovanja fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80	104
5.1.2. Broj ukupnih leukocita (Le)	106
5.1.3. Broj neutrofilnih granulocita (Gr)	111
5.1.4. Procenat neutrofilnih granulocita (Gr %)	116
5.1.5. Broj limfocita (Lym)	121
5.1.6. Procenat limfocita (Lym %)	126
5.1.7. Neutrofilno/limfocitni indeks (Ne/Lym indeks)	130
5.1.8. Broj monocita (Mo)	135
5.1.9. Procenat monocita (Mo %)	139
5.1.10. Broj eritrocita (Er)	142
5.1.11. Broj trombocita (Tr)	146
5.1.12. Koncentracija hemoglobina (Hb g/L)	151
5.1.13. Hematokritska vrednost (Hct %)	155
5.2. REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA AKUTNE ZAPALJENSKE REAKCIJE	159
5.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita u krvi (SE)	159
5.2.2. Koncentracija albumina u krvnoj plazmi (Alb g/L)	176
5.2.3. Koncentracija fibrinogena u krvnoj plazmi (Fb g/L)	180
5.2.4. Koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi (Hap g/L)	185
5.3. REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIJA NEUTROFILNIH GRANULOCITA	189
5.3.1. Stepenn fagocitoze neutrofilnih granulocita (%)	189
5.3.2. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%)	191
6. DISKUSIJA	193
6.1. HEMATOLOŠKA ISPITIVANJA	194
6.1.1. Osnovni hematološki parametri i parametri akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikovanja fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80	194
6.1.2. Broj ukupnih leukocita (Le)	197
6.1.3. Broj neutrofilnih granulocita (Gr)	201

6.1.4. Procenat neutrofilnih granulocita (Gr %)	204
6.1.5. Broj limfocita (Lym)	207
6.1.6. Procenat limfocita (Lym %)	210
6.1.7. Neutrofilno/limfocitni indeks (Ne/Lym indeks)	212
6.1.8. Broj monocita (Mo)	214
6.1.9. Procenat monocita (Mo %)	216
6.1.10. Broj eritrocita (Er)	218
6.1.11. Broj trombocita (Tr)	222
6.1.12. Koncentracija hemoglobina (Hb g/L)	224
6.1.13. Hematokritska vrednost (Hct %)	226
6.2. PARAMETRI AKUTNE ZAPALJENSKE REAKCIJE	229
6.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita u krvi (SE)	229
6.2.2. Koncentracija albumina u krvnoj plazmi (Alb g/L)	236
6.2.3. Koncentracija fibrinogena u krvnoj plazmi (Fb g/L)	238
6.2.4. Koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi (Hap g/L)	242
6.3. FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA	244
6.3.1. Step en fagocitoze neutrofilnih granulocita (%)	244
6.3.2. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%)	246
7. ZAKLJUČCI	249
8. LITERATURA	251
9. PRILOZI	282
10. BIOGRAFIJA AUTORA	322
11. IZJAVE	323

Spisak korišćenih skraćenica:

FR – Fiziološki rastvor

DM – Deksametazon

PEK – Petroletarski ekstrakt podzemnih organa *H. odorus* W. et K.

HEK – Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *H. odorus* W. et K.

MEK – Metanolni ekstrakt podzemnih organa *H. odorus* W. et K.

EK – Vodeni ekstrakt podzemnih organa *H. odorus* W. et K.

Le – Leukociti

Gr – Neutrofilni granulociti

Lym – Limfociti

Ne/Lym indeks – Neutrofilno/limfocitni indeks

Mo – Monociti

Er – Eritrociti

Tr – Trombociti

Hb – Hemoglobin

Hct – Hematokritska vrednost

SE – Brzina sedimentacije eritrocita

Alb – Albumini

Fb – Fibrinogen

Hap – Haptoglobin

1. UVOD

Konvencionalna veterinarska medicina i etnoveterinarska medicina i pored svoje različitosti, moraju da deluju udruženo u ostvarivanju zajedničkog cilja, a to je očuvanje zdravlja i dobrobit životinja. Fitoterapija, kao oblik konvencionalne i tradicionalne veterinarske medicine, je jedan od najstarijih i najšire primenjivanih sistema terapije. Podrazumeva postavljanje tačne dijagnoze bolesti, dobro poznavanje farmakološke aktivnosti biljnih sastojaka i primenu prirodnih lekovitih sirovina i narodnih lekova pripremljenih od biljaka, u lečenju kao i u sprečavanju nastanka bolesti životinja. U zdravstvenoj zaštiti životinja, upotreba lekovitog i drugog bilja u preventivne svrhe, kao potporne (adjuvantne) terapije ili kao potpune terapije ima ogroman potencijal, bilo da se radi o pojedinačnim ili o kombinovanim biljnim lekovitim sredstvima koja deluju sinergistički. Njihova primena je indikovana u profilaktičke svrhe i u cilju lečenja blažih oblika bolesti, hroničnih bolesti i rekurentnih infekcija, kao i u organskoj stočarskoj proizvodnji. Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, 2002) koja se zalaže za upotrebu efikasnih i bezbednih lekova, fitoterapiju smatra korisnim, lako raspoloživim izvorom i osnovom primarne zdravstvene zaštite i preporučuje upotrebu lekovitog i drugog bilja u veterinarskoj medicini.

Najveća pažnja u zdravstvenoj zaštiti životinja se pridaje prevenciji bolesti koja se zasniva, pored ostalog, na odgajivanju životinja u skladu sa njihovim zahtevima i potrebama, tako da se postigne maksimalna otpornost prema bolestima i zaštita od infekcija. U veterinarskoj medicini su opisani slučajevi hroničnih bolesti i rekurentnih infekcija koje nisu dovoljno etiopatogenetski razjašnjene, a pretpostavlja se da nastaju usled insuficijencije imunskog sistema ili su posledica neadekvatnog odgovora organizma na neke antigene ili stimuluse iz okoline (stresne reakcije). Efekti korišćenja biljnih preparata usmereni su, uglavnom, na stimulisanje pojedinih funkcija organizma i potenciranje njegovih odbrambenih sposobnosti. Primena biljnih ekstrakata i preparata, u cilju jačanja aktivnosti imunskog sistema i podsticanja funkcije efektorskih odbrambenih ćelija, dobila je na značaju poslednjih godina, jer je u zemljama Evropske Unije, od početka 2006. godine, zabranjeno korišćenje svih antibiotika u krmnim smešama, kao profilaktičkih supstanci i kao stimulatora rasta. U biljnom svetu još uvek postoje brojne, nedovoljno ili sasvim neispitane vrste, a naučna saznanja o aktivnim

sastojcima, mehanizmima delovanja i primeni pojedinih biljnih preparata u veterinarskoj medicini su nepotpuna, a često i kontradiktorna. Danas se ulažu veliki istraživački naponi i intenziviraju fitohemijska, fiziološka, fitofarmakološka i toksikoloških ispitivanja, u cilju identifikovanja i izolovanja lekovitih materija, utvrđivanja doza i načina njihovog delovanja u organizmu, definisanja terapijskih indikacija pojedinih biljaka i njihovih ekstrakata, što je omogućilo da se fitoterapija direktno uključi u konvencionalnu terapiju.

Lekovita i toksična svojstva biljaka potiču od sekundarnih metabolita koji su u organizmu biohemijski ili fiziološki aktivni. U fitoterapiji se pojam "toksične ili otrovne biljke" može uslovno upotrebiti, jer mnoge od njih se koriste kao lekovite u tradicionalnoj i konvencionalnoj veterinarskoj medicini, ponekad i kao protivotrovi. Ovoj kategoriji pripada preko 20 biljnih vrsta roda *Helleborus* L. (*Ranunculaceae*), čije poznavanje i upotreba u tradicionalnoj narodnoj i etnoveterinarskoj medicini, datira još iz doba starih civilizacija. Intenzivnim proučavanjima poslednjih 70 godina, detaljno je utvrđen njihov hemijski sastav, dok je u manjem obimu ispitivano delovanje na živi organizam. Zahvaljujući savremenim metodama, danas se paralelno sa izolacijom i karakterizacijom pojedinih sastojaka, ispituje i farmakološko i kliničko delovanje ukupnog ekstrakta, kao i pojedinih frakcija. Dok sa jedne strane postoji saglasnost oko hemijske strukture brojnih vrsta kukureka, sa druge strane, još uvek nisu ujednačena mišljenja oko njihovog delovanja.

Ekstrakt kukureka se primenjuje kod različitih indikacija, a zavisno od uslova, ispoljava višestruke bioaktivne efekte i može da deluje u više pravaca: imunomodulatorno (stimulatorno ili supresivno), proinflatorno ili antiinflatorno, prooksidativno ili antioksidativno, antimikrobno, antineoplastično, insekticidno, utiče na metabolizam, koncentraciju proteina akutne faze i status elektrolita krvnog seruma, pri čemu su mehanizmi delovanja u većini slučajeva nedovoljno precizno ispitani i opisani ili su nepoznati. Imajući u vidu ove podatke, kao i široku rasprostranjenost *Helleborus odoratus* W. et K. u našoj zemlji, smatrali smo da je od značaja, da se doprinese rasvetljavanju njegove *in vivo* aktivnosti, ispitivanjem uticaja sastojaka ekstrakata njegovih podzemnih organa, dobijenih ekstrakcijom pomoću rastvarača rastuće polarnosti, na hematološke parametre, proteine akutne faze i funkcije neutrofilnih granulocita Wistar pacova, u eksperimentalnim uslovima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. FITOTERAPIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI

U veterinarskoj medicini, u cilju prevencije i lečenja bolesti, primenjuju se različiti oblici terapije: tradicionalna, narodna ili etnoveterinarska medicina, alopatska ili konvencionalna, homeopatska, alternativna i fitoterapija kao oblik tradicionalne i konvencionalne medicine. Etnoveterinarska medicina (etnoveterinarska praksa) se definiše kao način raspoznavanja, primene i integrisanja u celinu različitih lokalnih saznanja o bolestima životinja i njihovoj kontroli, povezanih veština i običajnih postupaka poniklih iz naroda, u cilju nege, očuvanja zdravlja i dobrobiti radnih i proizvodnih životinja (Martin i sar., 2001). Sistematsko proučavanje etnoveterinarske medicine je važno iz 3 razloga: 1. generiše korisne informacije potrebne za razvoj metoda lečenja životinja prilagođenih lokalnom okruženju; 2. može da bude ključni veterinarski resurs i da doda nove korisne lekove u farmakopeje; 3. doprinosi očuvanju biodiverziteta (Tabuti i sar., 2003). Etnoveterinarska medicina obezbeđuje jeftine i lako dostupne alternative za alopatske lekove i može se smatrati održivom veterinarskom medicinom (Benítez i sar., 2012), pri čemu prevencija i lečenje bolesti biljkama (fitoterapija) zauzima značajno mesto u brojnim narodnim običajima i načinima lečenja životinja (Mathias, 2004).

Fitoterapija se zasniva na tradicionalnoj upotrebi dostupnih lekovitih i drugih biljaka u narodu na osnovu viševjekovne empirije, bez obzira na to da li su lekovita svojstva određene biljke naučno potvrđena (Kuštrak, 2005). Sve do kraja 18. veka se nedovoljno znalo o hemijskom sastavu biljaka, pa su biljni organi u profilaksi i terapiji velikog broja bolesti ljudi i životinja, različite etiologije, upotrebljavani sa više ili manje uspeha, na osnovu instinkta, opažanja i iskustva. Međutim, savremenim naučnim istraživanjima, veliki broj ali ne i sve biljne droge koje se koriste u tradicionalnoj medicini, su ispitane hemijski, farmakološki i toksikološki. Tačno je definisan sadržaj lekovitih materija, klinički su dokazana lekovita svojstva i potvrđeno aktivno lekovito delovanje i terapijska efikasnost, a time i ispravnost korišćenja u narodnoj medicini (Kišgeci, 2002). To znači da etnobotanička istraživanja, ne samo da omogućavaju proveru bogate baštine empirijskog znanja stečenog kroz tradicionalnu upotrebu biljaka,

koje se najčešće prenosilo usmeno i bilo predodređeno da se izgubi tokom godina, već i izdvajanje novih aktivnih principa iz biljaka koje su ranije korišćene samo u tradicionalnoj narodnoj i etnoveterinarskoj medicini (Lentini, 2000). Od najstarijih vremena pa do kraja 19. veka, fitoterapija je bila nezamenljivi i gotovo jedini vid lečenja, a pred završetak prošlog stoleća, četiri petine ljudske populacije u svetu je koristilo fitoterapiju i druge oblike narodne medicine u cilju lečenja, ublažavanja simptoma i sprečavanja nastanka bolesti ljudi i životinja (Abelson, 1990; Alcorn, 1995).

Prirodne lekovite sirovine ili droge (franc. *drogue*, eng. *drug*, nemač. *droge*) po poreklu mogu biti: vegetabilne (biljne), animalne (životinjske) (Quave i sar., 2010; Benítez, 2011; Souto i sar., 2011-a,b) i mineralne (Gakuya i sar., 2011). Biljne droge u užem smislu reči su osušeni, ređe sveži biljni organi koji sadrže hemijska jedinjenja koja su u organizmu biohemijski ili fiziološki aktivna i imaju lekovita svojstva, a u širem smislu reči predstavljaju biljne proizvode koji se dobijaju jednostavnim postupcima i procesima prerade biljaka, odn. njihovih odgovarajućih organa (Tasić i sar., 2004). U zdravstvenoj zaštiti životinja se primenjuju cele lekovite i druge biljke, njihovi delovi – droge sa strukturom s. organizovane droge (nadzemni i podzemni organi biljke) i droge bez strukture s. nećelijske droge (mlečni sok, etarsko ulje, vosak, sluz, balzam), sastojci i pripravci (Grdović i Mačukanović-Jocić, 2006). Najčešće se upotrebljavaju dekokti i infuzi za peroralno unošenje i svež, neprerađen ili prokuvan biljni materijal za direktno aplikovanje kod spoljašnje upotrebe, a pripremaju se i složeni lekoviti preparati (ekstrakti - vodeni, alkoholni, vodeno-alkoholni i uljani, tinkture, macerati, rastvori, kupke, kreme i masti) (Blanco i sar., 1999; Scherrer i sar., 2005; Benítez i sar., 2012). U veterinarskoj medicini, primena nekih oblika biljaka je donekle ograničena sa jedne strane zbog odsustva saradnje od strane pacijenta, a sa druge strane, oblici namenjeni isključivo životinjama trenutno nisu dostupni. Taksonomski srodne biljke uglavnom proizvode hemijski slične, ali ne i iste metabolite, zbog čega su im i farmakološki efekti približni, ali ne mogu zamenjivati jedna drugu u prevenciji i lečenju bolesti ljudi i životinja. Mehanizmi delovanja aktivnih principa velikog broja biljaka na organizam životinja nisu još uvek u potpunosti određeni. U nekim slučajevima, bolji terapijski efekat, jače i šire delovanje pokazuje ekstrakt koji sadrži aktivne i prateće materije u obliku biološkog kompleksa, nego čista izolovana supstanca, jer izdvajanjem aktivnih komponenti dolazi do gubitka drugih sastojaka, koji

mogu delovati sinergistički, čime se smanjuje njihova efikasnost (Murray, 1995). Kod drugih biljaka, delujuće materije važne za terapijsko delovanje, često se nalaze samo u jednom delu biljke ili su u tom delu u najvećoj koncentraciji, pa se u fitoterapiji koristi taj deo (Tasić i sar., 2004). Primena biljaka koje pored farmakološki aktivnih sastojaka sadrže i pojedine nutritivne elemente, značajna je u terapiji hroničnih bolesti životinja, koje često nastaju kao posledica nutritivnog deficita (Đorđević i sar., 2006).

Proteklih decenija, uobičajena praksa u stočarskoj proizvodnji je bila upotreba antibiotika i hemoterapeutika u subterapijskim dozama, kao faktora ili promotera rasta, koji uništavaju veliki broj patogena, a podstiču rast korisne mikroflore. Dobijeni efekat je sprečavanje proizvodnje bakterijskih toksina uz istovremeno smanjenje potrošnje hrane i stepen imunološkog stresa, jer se više hranljivih sastojaka usmerava za rast i proizvodnju (Adams, 1999). Međutim, zbog brojnih štetnih efekata po zdravlje životinja (Stojanović i sar., 2006) i ljudi usled konzumiranja proizvoda koja sadrži rezidue antibiotika (Rico, 1984), propisima Evropske Unije iz 1998. godine su odobrena samo četiri antibiotika (*avilamicin*, *monenzin-Na*, *salinomycin-Na* i *flavofosfolipol*) za stimulaciju rasta kod životinja (Ćupić i sar., 2004), a početkom 2006. godine je zabranjeno korišćenje svih antibiotika u krmnim smešama, kao profilaktičkih supstanci i kao stimulatora rasta. Poslednjih godina, napori istraživača su usmereni ka iznalaženju prirodnih supstanci (probiotika, prebiotika i biljnih ekstrakata), koje će stimulisanjem pojedinih funkcija i povećanjem odbrambene sposobnosti organizma, imati pozitivan efekat na zdravlje životinja i predstavljati potencijalne promotere rasta (Bampidis i sar., 2005; Perić i sar., 2009; Gerzilov i sar., 2011) u uslovima intenzivne stočarske proizvodnje. Različiti imunoaktivni biljni polisaharidi mogu da aktiviraju neutrofile i makrofage i da pojačaju sekreciju proinflamatornih medijatora kao što su citokini, eikosanoidi i enzimi (Schepetkin i Quinn, 2006). Sa druge strane, neki imunosupresivni fitopreparati se upotrebljavaju u cilju smanjenja ili sprečavanja neželjenih aktivnosti imunskog sistema (alergijskih reakcija i autoimunih bolesti). Takođe se sve više insistira na upotrebi lekovitog i drugog bilja sa antimikrobnim i imunostimulativnim delovanjem u lečenju blažih i/ili hroničnih infektivnih oboljenja ili kao dopunske terapije konvencionalnim lekovima, koji se zahvaljujući dejstvu aktivnih biljnih sastojaka mogu onda upotrebiti u nižim, a time i bezbednijim dozama (Mellor, 2000; Ćupić i sar., 2004). Prednost biljnih preparata koji sadrže aktivne sastojke sa antimikrobnim delovanjem

(Sultana i Afolayan, 2011; Bagla i sar., 2012) je što ne dovode do pojave rezistencije patogenih mikroorganizama, nema rezidua u hrani, u potpunosti su netoksični i mogu da se koriste u više različitih indikacija (Savković i sar., 2006).

Lekovito delovanje biljaka je moguće usmeriti u određenom pravcu, odnosno pojačati ili ublažiti njihovo delovanje kombinovanjem određenih svojstava pojedinih biljaka i njihovih pripravaka. Takođe, primena više biljaka u jednom preparatu može smanjiti toksične efekte pojedinih biljaka. Neke od biljnih komponenti pružaju antioksidativnu zaštitu organizmu (Čakar i sar., 2011; Apetrei i sar., 2011-b; Gasparetto i sar., 2012), deluju antineoplastično i inhibiraju rast tumorskih ćelija (Jesse i sar., 2009; Gao i sar., 2011). Uočen je pozitivan efekat velikog broja biljnih vrsta, koje se u etnoveterinarskoj medicini primenjuju pojedinačno ili kombinovano, pri čemu pojedini aktivni principi mogu imati višestruke lekovite efekte. Uspešno se koriste u tretmanu egzoparazitoza i endoparazitoza (Passalacqua i sar., 2006; Àngels Bonet i Vallès, 2007; Jarić i sar., 2007; Lans i sar., 2007-a) i u prevenciji i lečenju oboljenja jednog ili više organskih sistema: digestivnog trakta (Viegi i sar., 2003; Lans i sar., 2007-a,b; Jarić i sar., 2007; Gasparetto i sar., 2012), povreda i rana kože i sluzokože (Ebrahimzadeh i sar., 2006; Àngels Bonet i Vallès, 2007; Benítez i sar., 2012), nervnog i mišićnoskeletnog (Scherrer i sar., 2005), genitourinarnog (Dilshad i sar., 2008; Lans i sar., 2009) i respiratornog sistema, kao i metaboličkih poremećaja i oboljenja očiju (Lans i sar., 2007-b; Benítez i sar., 2012). Određena biljna vrsta može da se koristi za lečenje većeg broja bolesti, dok se u terapiji pojedinih bolesti daju različite biljne mešavine.

Danas postoji povećano interesovanje za primenu biljaka u etnoveterinarskoj medicini, posebno u ruralnim oblastima Španije (Blanco i sar., 1999; Akerreta i sar., 2010; Àngels Bonet i Vallès, 2007; Gonzáles i sar., 2011; Benítez i sar., 2012) i Italije (Uncini Manganelli i sar., 2001; Scherrer i sar., 2005; Passalacqua i sar., 2006; Leonti i sar., 2009). Fitoterapija se u prevenciji i lečenju bolesti životinja praktikuje i širom sveta: u Africi (Opiro i sar., 2010), Americi (Martínez i Luján, 2011) i Aziji (Gaur i sar., 2010; Phondani i sar., 2010; Ghorbani i sar., 2011). Zbog rasta upotrebe lekovitog i drugog bilja u zvaničnoj i tradicionalnoj medicini, Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, 1991) je objavila "Smernice za procenu biljnih lekova" čiji je glavni cilj bio da pomogne u uspostavljanju odgovarajućih regulatornih kriterijuma i

procedura za procenu kvaliteta, sigurnosti i efikasnosti biljnih lekova. Vodeći princip smernica je, da dugotrajna istorijska upotreba biljaka u tradicionalnoj narodnoj i etnoveterinarskoj medicini bez ispoljene štete, predstavlja pretpostavku bezbednosti, osim ako protivreči savremenom naučnom istraživanju. WHO (2002) posebnu pažnju posvećuje biljnim lekovima (izrađeno i potvrđeno preko 40 WHO-monografija biljnih droga), podstiče istraživanja u toj oblasti i preporučuje upotrebu lekovitog i drugog bilja u veterinarskoj medicini. U Evropskoj Uniji je 1989. godine formirano naučno savetodavno veće za lečenje biljem (ESCOP – European Scientific Cooperative for Phytotherapy), koje se bavi izradom monografija pojedinih droga – opisuje terapijsku korist i neželjena dejstva, daje preporučene doze i druga uputstva (Blumenthal, 1997). Pravilnikom o metodama organske stočarske proizvodnje (2002), daje se prednost fitoterapeutcima (ekstraktima biljaka, esencijama) i homeopatskim proizvodima (biljnim, životinjskim i mineralnim supstancama) nad sintetičko-hemijskim veterinarskim preparatima u zdravstvenoj zaštiti životinja, ukoliko obezbede da njihovi terapijski efekti budu pozitivni.

Koncept racionalne fitoterapije koja se sprovodi u Nemačkoj, propagira se i u našoj zemlji (Tasić i sar., 2004). Zasniva se na upotrebi fitoterapeutika (prema EU-i Herbal medicinal products, Herbal remedies ili Phytomedicines) sa tačno definisanim sadržajem lekovitih materija, čije delovanje zavisi od upotrebljene doze, efikasnost od sastava, a terapijski efekat je potvrđen eksperimentalnim i kliničkim testovima (Kuštrak, 2005).

2.2. TOKSIČNOST BILJNIH VRSTA

Veliki broj biljnih vrsta (više od 1000) sadrži komponente koje ometaju metabolizam, odnosno imaju direktan ili indirektan toksični efekat. Međutim, samo mala grupa ovih biljaka dovodi do jakog trovanja nakon unošenja ograničene količine biljnog materijala, dok većina uzrokuje trovanja samo pod određenim okolnostima (Frohne i Pfänder, 2005).

Paracelsus (1493-1541) u svom delu "Third Defence" ističe: "Šta je to što nije otrov? Sve stvari su otrov i ništa nije bez otrova. Doza samo čini da stvar nije otrov" (Deichmann i sar., 1986). Dobro poznati princip "Dosis sola facit venenum" ("Doza

određuje lekovitost ali i otrovnost") je podjednako važan za otrovne kao i za lekovite biljke, jer ukazuje da stepen toksičnosti određene biljne vrste zavisi od doze unete u organizam. Kukurek predstavlja i lek i otrov za srce, jer sadrži bufadienolidne heterozide, koji u malim, terapijskim dozama deluju tonično na srce (kardiotonika) slično digitalisu, ali zbog male terapijske širine, mogu da deluju kao kardiotoksici, što ovu biljnu vrstu svrstava u grupu otrovnih biljaka (Mulet, 1991). Toksičnost biljaka zavisi i od stepena zrelosti odnosno fenofaze (listanje, cvetanje, plodonošenje), od biljnog organa (akumulacija toksičnih materija odvija se u listu, plodu, semenu ili podzemnim organima) i da li je upotrebljena sveža ili osušena (kukurek je podjednako otrovan bez obzira na stanje i zbog toga mogu nastati trovanja kada je prisutan u senu) (Spoerke i Smolinske, 1990). Sadržaj aktivnih komponenata (heterozida, saponozida, alkaloida), a time i toksičnost, u pojedinim biljnim vrstama može biti podložan kvalitativnim i kvantitativnim promenama. Delimično je određen genetski (hemijske rase), a zavisi i od staništa, uslova životne sredine i sezone. Preduslovi za trovanje su: kontakt sa biljkom, dovoljno visoka doza toksičnih sastojaka da ispolji aktivnost u ili na telu i savladani odbrambeni mehanizmi i detoksikacioni procesi organizma. Stepent trovanja životinja zavisi od vrste životinje, uhranjenosti, zdravstvenog stanja, starosti i bremenitosti. Uočene su razlike u osetljivosti životinjskih vrsta na biljne toksične materije: najosetljiviji su konji, dok svinje znatno bolje podnose trovanje biljkama jer lako povraćaju; bakterije buraga preživara mogu u određenoj meri da detoksikuju biljni materijal. Mlade, slabo uhranjene i gravidne životinje oboljevaju češće i sa težom kliničkom formom bolesti (Frohne i Pfänder, 2005).

Divlje i domaće životinje, kao i kućni ljubimci, mogu se otrovati biljkama, ali slučajevi trovanja u prirodi su retki jer životinje instiktivno izbegavaju toksične biljke. Poznata su i opisana akutna trovanja životinja toksičnim biljkama koja izazivaju iznenadnu smrt, hronična trovanja koja se manifestuju posle dugog latentnog perioda i teratogeno delovanje biljaka koje dovodi do malformacija ili smrti fetusa (James i sar., 1994). Često se trovanja biljnim otrovima ne mogu ustanoviti, jer su simptomi nejasni i slični znacima neke druge bolesti, a istovremeno većina životinja ne uginu, već ozdravi pre nego što se postavi dijagnoza. U cilju postavljanja dijagnoze, potrebno je da se u organima za varenje utvrdi prisustvo delova biljke za koju se pretpostavlja da je uzrok trovanja ili toksičnih supstanci hemijskom analizom crevnog sadržaja, kao i da se

proceni hrana sa botaničkog stanovišta. Lečenje trovanja životinja se sastoji u peroralnom davanju adstringentnih i mucilaginoznih sredstava, a zatim se primenjuje simptomatska terapija.

Danas se vrše brojna ispitivanja toksičnih ili potencijalno toksičnih biljaka, koje se u etnoveterinarskoj praksi upotrebljavaju za lečenje domaćih životinja i kućnih ljubimaca ili kao dijetetski suplementi (Viegi i sar., 2003; Viegi i Vangelisti, 2011; Gonzáles i sar., 2011; Benítez i sar., 2012).

2.3. TAKSONOMSKI POLOŽAJ VRSTE *H. ODORUS* WALDST. ET KIT.

Prema aktuelnoj naučnoj sistematici biljnog sveta, taksonomski položaj vrste *Helleborus odorus* Waldst. et Kit. je: domen *Eukarya*, carstvo (regnum) *Plantae* s. *Vegetabilia* (više biljke *Cormobionta*), razdeo (phylum) semenice *Spermatophyta*, odeljak (divisio) skrivenosemenice *Magnoliophyta* s. *Angiospermae* (cvetnice *Anthophyta*), klasa (classis) dikotiledone biljke *Magnoliopsida* s. *Dicotyledones*, red (ordo) *Ranunculales* s. *Ranales*, familija (familia) ljutića *Ranunculaceae* A. L. Juss., subfamilija (subfamilia) *Ranunculoideae*, rod (genus) *Helleborus* L., subrod (subgenus) *Helleborastum* (Gajić, 1992; Werner i Ebel 1994; Ro i sar., 1997; Judd i sar., 1999).

Familija ljutića (*Ranunculaceae*) obuhvata 59 rodova i oko 1900 vrsta rasprostranjenih širom sveta, od kojih su mnoge zastupljene u Evropi (Evans, 1996), a na teritoriji Srbije samoniklo raste 19 rodova ove familije (Gajić, 1992).

2.4. RASPROSTRANJENOST, PODELA I KARAKTERISTIKE BILJAKA RODA *HELLEBORUS* L.

Poreklo naziva roda je nesigurno, a samo značenje reči nije tačno poznato. Ime roda verovatno potiče od grčkih reči *helein* (ελλειν), što znači odneti a prenosno razoriti ili ubiti, i *bora* (βορα), što znači livada ili stočna hrana, jer je otrovan. Po Pliniju Starijem (23-79), *Helleborus* je purgativno sredstvo za psa, pa je moguće da je naziv izveden i od grčkih reči *eileo* ili *eilo* (proterati) i *bora* (hrana). U antička vremena, imenom crni heleborus (ελλεβορος μελας) *Helleborus niger* L. (*Elleboros melas*, crna čemerika) i beli heleborus (ελλεβορος λευκος) *Veratrum album* L. (bela čemerika) su

nazivane biljke koje pripadaju različitim familijama (*Ranunculaceae* i *Liliaceae*), a predstavljale su važne lekovite sirovine (Simonović, 1959).

Rod *Helleborus* L. obuhvata 22 srodne vrste rasprostranjene u umerenim regionima severne hemisfere - Evropi, Maloj Aziji do Tibeta, Kavkazu, zapadnoj i centralnoj Aziji, koje su klasifikovane u 6 sekcija, na osnovu strukture biljaka, sposobnosti hibridizacije, morfologije polena i karakteristika semena (Mathew, 1989; Meiners i sar., 2011). Određen broj vrsta raste endemski samo u nekim regionima (*H. serbicus* Adamović u Srbiji, *H. croaticus* Mart. u severnoj Hrvatskoj, *H. caucasicus* A. Br. i *H. abchasicus* A. Br. na Kavkazu). Uzimajući u obzir strukturu ovog roda, Werner i Ebel (1994) su izvršili njegovu podelu na dva subroda: *Helleborus* koji se sastoji od tri sekcije (I *Griphopus*, II *Chenopus* i III *Helleborus*) i *Helleborastum* koga takođe čine tri sekcije (IV *Syncarpus*, V *Dicarpon* i VI *Helleborastum*). Prema morfološkoj osnovi, rod *Helleborus* L. je podeljen u dve grupe: *Caulescentes* (vrste koje prezimljavaju, imaju slabije razvijen rizom, brojne olistale stabljike, terminalnu cvast sa mnogo cvetova, bez prizemnih listova na dugoj dršci: sekcije I, II i IV) i *Scapigeri* s. *Acaulescentes* (sezonski zelene biljke, sa razvijenim rizomom, cvetnim slabo olistalim stabljikama sa jednim ili nekoliko cvetova, jednim ili nekoliko prizemnih listova koji prezimljavaju samo kod nekih vrsta: sekcije III, V i VI) (McLewin i Mathew, 1995; Meiners i sar., 2011). Sekcije sa vrstama, njihova distribucija, boja cveta i morfologija navedeni su u Prilogu disertacije (Prilog 1., 3. i 4.). Tutin (1964) je u Flori Evrope opisao 11 vrsta *Helleborus* L. sa većim brojem podvrsta, koje su Meiners i sar. (2011) označili kao vrste, a Simonović (1959) je zabeležio narodne nazive koji se koriste u našem i jezicima drugih evropskih naroda, za biljke ovog roda (Prilog 2.). Na prostoru bivše Jugoslavije nalazi se jedno od središta morfološke diferencijacije i taksonomske divergencije roda *Helleborus* L., a to potvrđuje i veliki polimorfizam i varijabilitet njegovih vrsta rasprostranjenih na ovom području. U Srbiji, naročito u brdsko-planinskim krajevima, zastupljen je veći broj bliskih vrsta: *H. odoratus* Waldst. et Kit., *H. multifidus* Vis., *H. serbicus* Adamović, *H. atrorubens* Waldst. et Kit., *H. purpurascens* Waldst. et Kit. (Gajić, 1992), koje se teško razlikuju zbog malih morfoloških varijacija. Sve cvetaju od kasne zime do ranog proleća, gorkog, oštrog i ljutog su ukusa (Lukić, 1993).

Gajić (1992) navodi da su biljke ovog roda samonikle, višegodišnje zeljaste, sa jako razvijenim rizomom (podzemno stablo) iz koga izbijaju brojni tanki, dugi, dobro

razgranati korenčići. Jedan ili više prizemnih listova sa dugačkim drškama su krupni, kožnati i vrlo otporni, prstenasto deljeni na veći broj režnjeva, po obodu jednostavno ili dvostruko testerasti, a u nekih vrsta prezimljavaju (*H. odorus* Waldst. et Kit., *H. multifidus* Vis., *H. niger* L.). Cvetna stabljika je visoka 30-60 cm, sa listovima sličnim prizemnim listovima. Prema obliku epidermalnih tvorevina trihoma (mehurasti, kijačasti, mešinasti, štapičasti i čekinjasti), koji je genetski određen i taksonomski specifičan, i njihovom ontogenetski i ekološki uslovljenom rasporedu i brojnosti na listovima, evropske vrste roda *Helleborus* L. su svrstane u pet trihomorfnih grupa: bulitrihni, klavetrihni, utrikulotrihni, bacilitrihni i setulitrihni tip (Martinis, 1974). Krupni, pravilni cvetovi su prečnika 3-7 cm, a cvetni omotač ima 5 listića koji su beli, žuto zeleni ili svetlo do tamno ljubičasti i formiraju krunicoliku čašicu. Krunični listići su preobraženi u cevasto levkaste nektarije sa drškom, mnogo kraće od listića perijanta. Cvetovi imaju mnogo prašnika žute boje i po 4-6 pri osnovi zadebljelih tučkova. Plod je spljošten, kljunasti mešak poprečno izbrazdan žilicama, sa mnogo crnosmeđeg, izduženog semena (Gajić, 1992). Analizom kariotipa u ćelijama korena pojedinih predstavnika u okviru roda, Zonneveld (2001) i Meiners i sar. (2011) su utvrdili da su sve ispitivane vrste, kao i interspecies hibridi, diploidne i imaju isti broj hromozoma ($2n=2x=32$), koji bi mogao da potiče od poliploidije, jer je kod familije *Ranunculaceae* najčešće broj hromozoma $n=8$ (Prilog 5.). Ovi autori su protočnom citometrijom odredili sadržaj jedarne DNA u ćelijama lišća i utvrdili da je veličina genoma bila u rasponu od 18,3 odn. 19 pg/2C u *H. argutifolius* Viv. do 33,2 odn. 35,7 pg/2C u *H. thibetanus* Franch. (u *H. odorus* W. et K. 28,6-30,2 pg/2C), pri čemu je genetska distanca između vrsta varirala između 0,034 i 0,330. Utvrđena veličina genoma podržava taksonomsku klasifikaciju vrsta u okviru roda, koju su predložili Mathew (1989) i Werner i Ebel (1994). Od genetske udaljenosti zavisi razvoj reproduktivnih barijera i realizacija interspecijske hibridizacije, odn. nastajanje hibrida ukrštanjem između različitih vrsta kukureka (Meiners i Winkelmann, 2012). U ukrasnoj hortikulturi je povećano interesovanje za masovnu proizvodnju ovih biljaka, pri čemu je efikasan sistem za njihovo umnožavanje od ključne važnosti. Metode generativnog razmnožavanja (iz semena) su ograničene, jer je stepen varijacije kod potomaka često previsok i period klijanja semena je nekoliko meseci posle setve, dok je vegetativno razmnožavanje (deljenjem rizoma) dugotrajno i ne daje uvek visoku stopu multiplikacije. Zbog toga se

danas ispituje mogućnost *in vitro* sistema kloniranja iz pupoljaka rizoma ili iz aksilarnih pupoljaka (Dhooghe i Van Labeke, 2007). Programi oplemenjivanja kukureka su usmereni na povećanje genetske varijacije, koja se postiže indukcijom poliploidije različitim antimitotičkim agentima (kolhicinom, orizalinom, trifluralinom), pri čemu uspeh poliploidizacije zavisi od genotipa i ravnoteže između stope dupliranja hromozoma i stope preživljavanja i umnožavanja izdanaka. Tretirane biljke dupliraju svoj diploidni broj somatskih hromozoma u tetraploidni $2n=4x=64$ (Prilog 6.), što rezultira brojnim molekularnim i fiziološkim promenama (Dhooghe i sar., 2009).

Sve biljne vrste roda *Helleborus* L. iritiraju sluzokože respiratornih i digestivnih organa i pripadaju redu narkotičnih i otrovnih biljaka (Kušan, 1956) koje imaju toksično delovanje prema životinjama (Johnson i Routledge, 1971; Holliman i Milton, 1990; Steyn i Van Heerden, 1998). Trovanje može biti uzrokovano kombinacijom aktivnih principa steroidnih saponina, protoanemonina i bufadienolida. Uprkos činjenici da su sve vrste kukureka visoko toksične i imaju nizak terapijski indeks, a da se otrovnost ne umanjuje kuvanjem ili sušenjem biljke, osim *H. bocconei* Ten. koja gubi toksičnost nakon sušenja (Passalacqua i sar., 2006), retki su slučajevi trovanja domaćih životinja. Životinje ih ne jedu na pašnjacima i u senu, zbog neprijatnog mirisa sličnog tatuli, a ukoliko ih i unesu prognoza je uglavnom povoljna, jer je uneta količina obično mala zbog veoma gorkog ukusa i često se spontano javlja povraćanje (Frohne i Pfänder, 2005). Istovremeno, zahvaljujući karakterističnim organoleptičkim osobinama, biljke roda *Helleborus* L. su zaštićene od uništavanja ispašom, ne samo domaćih, već i divljih životinja.

O kukureku su zabeležene brojne antičke i biblijske legende i mitovi (www.bastabalkana.com/2010/05/kukurek-biljka-antickog-pedigrea), a našao je mesto i u lokalnim magijskim obredima i bajalicama (Milićević, 1894; Čajkanović, 1985; Đurić, 1985; Lentini, 2000; Kovačević i Jančić, 2003; Passalacqua i sar., 2006). U Prilogu 7. iznete su samo neke od njih.

2.5. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE VRSTE *H. ODORUS* W. ET K.

H. odorus Waldst. et Kit. je višegodišnja zeljasta biljka, koja ima jak rizom crnosmeđe do crne boje, obrastao tankim, vlaknastim korenjem. Jedan prizemni list sa dugačkom drškom je zimzelen, jak i kožast, kratko dlakav, sa istaknutim nervima na naličju. Prstasto je deljen na 7-11 jajasto-lancetastih režnjeva širokih 3-6 cm, po obodu jedanput ili dvaput sitno testerasto usečenih. Stabljika je uspravna, u donjem delu gola, bez listova, u gornjem delu razgranata i sa listovima, iste dužine ili nešto duža od prizemnih listova (visine do 60 cm). Listovi stabljike su slični prizemnim listovima, ali su na kratkim drškama, sitni su, imaju kratke i uske testeraste režnjeve (Šilić 1988; Gajić, 1992; Jančić, 2002). Brojne jednoćelijske, negranate, čekinjaste epidermalne tvorevine, trihomi setulitrihnog tipa, difuzno su raspoređene po donjoj površini lisnih režnjeva, a u manjem broju i po rubovima i u brazdana iznad lisnih nerava, nemaju sposobnost upijanja vode i pripadaju mehaničkim tipovima trihoma (Martinis, 1974). Cvetovi su aktinomorfni, dvopolni, mirisni, prečnika 5-7 cm, svetložutozelene boje, ima ih 2-3, a pojavljuju se već u drugoj polovini zime i vrlo rano u proleće, često i ispod snega (cveta od februara do marta). Cvetni omotač (perijant) ima 5 listića koji su široko jajasti, skoro okrugli sa tupim vrhom i obodima koji se preklapaju. Kruničnih listića je oko 10 i preobraženi su u trouglaste, levkaste nektarije. Žuti prašnici su brojni, a tučkova je 3-6 i imaju dvostruko duži stubić i žigove skoro horizontalno razvedene. Plod je višesemeni, poprečno nabran mešak, sa dugačkim kljunom, koji se u zreloom stanju otvara na trbušnom šavu. Sadrži sjajno crnosmeđe seme (4-5 mm dugačko i 1-2 mm široko), sa jasno izraženim pupkom (Šilić 1988; Gajić, 1992; Jančić, 2002).

Stanište *H. odorus* W. et K. su žbunaste formacije, šikare, rubovi šuma, šumske čistine, krčevine, šumske zajednice cera, kitnjaka i graba, kao i lišćarsko-četinarske šume bukve, jele i smrče, naročito u brdskim i planinskim krajevima. Vrlo retko se sreće po livadama, travnim fitocenzama i bujadištima. Pogoduje mu humusno zemljište kisele do vrlo slabo kisele reakcije (Šilić 1988, Sarić 1989, Jančić 2002). Ubraja se u submezijijske florne elemente (Kojić i Janjić, 1991). Rasprostranjen je u oblasti jugoistočne i centralne Evrope, od severne Italije i južnog Tirola preko Balkanskog poluostrva (Srbija, Bosna i Hercegovina, Albanija) na istok do južne

Rumunije, a na sever do južne Mađarske (Gajić, 1992), u jugozapadnoj Aziji i na Kavkazu (Šilić, 1988).

Prema Flori Evrope (Tutin, 1964) vrsta *H. odorus* W. et K. ima dve podvrste i to: *H. odorus* ssp. *odorus* W. et K. i *H. odorus* ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. Na varijabilnost vrste, ukazuju 4 forme koje se mogu razlikovati na osnovu izgleda reznjeva prizemnih listova i staništa na kome se nalaze: *H. odorus* var. *latifolius* (u okolini Gornjeg Milanovca), *H. odorus* var. *multisectus*, *H. odorus* var. *odorus*, *H. odorus* var. *laceratus* (Oplenac, Košutnjak) (Gajić, 1992). Prema filogenetskom stablu, koje su predložili Werner i Ebel (1994), *H. odorus* Waldst. et Kit. pripada najnovijoj sekciji *Helleborastum*, koja je još u procesu razvoja.

2.6. SASTOJCI BILJAKA RODA *HELLEBORUS* L. (PRIMARNI I SEKUNDARNI METABOLITI)

Početakom 19. veka veći broj istraživača je započeo ispitivanje hemijske strukture i uloge aktivnih principa različitih biljnih vrsta. Prvi detaljan rad o hemijskom sastavu biljaka roda *Helleborus* L., u smislu identifikacije, izolacije, karakterizacije i biološke aktivnosti određenih sastojaka objavili su Husemann i Marmé (1865). Savremene metode analitike organskih jedinjenja omogućile su izolovanje i detaljna istraživanja strukture, biogeneze i uloge brojnih sastojaka kukureka (primarnih i sekundarnih metabolita u ćelijama), ali je još uvek nedovoljno ispitano njihovo delovanje na živi organizam.

2.6.1. Sekundarni metaboliti u vrstama roda *Helleborus* L.

Sekundarni metaboliti su specifični, biološki aktivni sastojci biljaka koji imaju terapijsku primenu. Nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma, koji predstavlja direktan nastavak primarnih metaboličkih procesa, povezan sa katabolizmom i/ili transformacijom molekula šećera, aminokiselina ili masnih kiselina.

2.6.1.1. Heterozidi (glukozidi, glikozidi)

Heterozidi su sekundarni metaboliti široko rasprostranjeni u biljnim organima. Akumuliraju se bez određene pravilnosti, a zahvaljujući hidrosolubilnosti, nalaze se u ćelijskim vakuolama rastvoreni u ćelijskom soku.

Ova jedinjenja imaju raznovrsnu hemijsku strukturu, u čijoj su osnovi kompleksi šećera (glikona) i organskih, nešećernih jedinjenja (aglikona), čija se povezanost ostvaruje etarskom, glukozidnom vezom. Šećeri su najčešće vezani samo za jedno mesto na aglikonu (monozid), a ređi su heterozidi sa dva lanca šećera (biozidi) ili sa više od tri niza. Izolovani heterozidi su čvrsta jedinjenja, kristalne ili amorfne strukture i gorkog ukusa. Zbog šećernog dela molekula rastvorljivi su u polarnim rastvaračima (vodi i alkoholu). Aglikoni su uglavnom kristalne strukture, najčešće su neisparljivi, optički aktivni, lipofilni i rastvaraju se u nepolarnim organskim rastvaračima (acetonu, hloroformu, etru, petroletru). Razgradnja kompleksne strukture heterozida postiže se hidrolizom glukozidne veze pod uticajem enzima (glukozidaza, hidrolaza), kiselina, baza ili zagrevanjem.

Glikon je odgovoran za rastvorljivost, resorpciju, distribuciju i dostupnost aglikona tkivima u kojima bi trebalo da ispolji svoju aktivnost, kao i za dužinu i intenzitet delovanja i brzinu eliminacije iz organizma životinja i ljudi. Aktivnost i terapijska primena heterozida su povezani sa hemijskom strukturom aglikonske komponente. Na osnovu hemijske prirode aglikonske komponente izvršena je podela heterozida i droga koje ih sadrže na: kardiotionične, flavonoidne, fenolne, kumarinske, lignanske, hinonske, cijanogene, sumporne (glukozinolate) i monoterpenske (iridoidne).

2.6.1.1.a. Kardiotionični (kardioaktivni, kardiačni) heterozidi iz podzemnih organa *Helleborus L.*

Kardiotionični heterozidi se vezuju za različita tkiva i organe (nervno i mišićno tkivo, a posebno za srčani mišić), pri čemu njihova raspodela zavisi od količine krvi koja protiče kroz pojedine organe. Zbog visoko specifičnog i snažnog delovanja na miokard, ova jedinjenja se primenjuju u terapiji srčane insuficijencije, a dobijaju se jedino ekstrakcijom i izolacijom iz droga nekoliko biljnih familija koje ih sadrže, među

kojima su i *Ranunculaceae* (*Adonis*, *Helleborus*) (Kovačević, 2004). Kardiotionični heterozidi se nalaze u ćelijskom soku parenhimskog tkiva različitih biljnih organa u koncentraciji maksimalno do 1%. Pripadaju grupi steroidnih jedinjenja sa 23 ili 24 ugljenikova atoma, jer su im aglikoni (genini ili glikoli) jedinjenja steroidne prirode, čiju osnovu predstavlja tetraciklični, pregnanski skelet (ciklopentanoperhidrofenantren) izgrađen od četiri kondenzovana karbociklična prstena. Za osnovni skelet na atomu C₁₇ vezan je nezasićeni laktonski prsten, a u zavisnosti od vrste laktone razlikuju se 2 vrste aglikona, odn. heterozida. To su:

- ❖ kardenolidni tip aglikona (C₂₃) odn. kardenolidni heterozidi (petočlani 20(22) nezasićeni γ-lakton (butenolid) β-orijentacije)

- ❖ bufadienolidni tip aglikona (C₂₄) odn. bufadienolidni heterozidi (šestočlani 20(22) dvostruko nezasićeni δ-lakton (pentadienolid s. kumalin) β-orijentacije) (Deepak i sar., 1996).

Nerazgranati niz od 1-4 monosaharida vezuje se preko hidroksilne grupe na položaju C3, a retko preko više hidroksilnih grupa aglikona. Kardiotionični heterozidi su nestabilni zbog nezasićene laktonske strukture i labilno vezane glukoze na terminalnoj poziciji u okviru oligosaharida, pri čemu lako dolazi do glukolize (primarni heterozidi prelaze u sekundarne). Specifično i snažno dejstvo na srčani mišić ostvaruju zahvaljujući laktonu u položaju 17β i hidroksilnoj grupi na poziciji C14 (Daniel i sar., 2003).

Najveći nedostatak kardiotioničnih heterozida je mala terapijska širina, odn. blizina terapijske i toksične doze, a kumulativni efekat pojedinih heterozida povećava opasnost od trovanja biljkama koje ih sadrže. *Hellebori rhizoma et radix* sadrži smešu steroidnih bufadienolidnih heterozida helebrina i heleboreina, izuzetne aktivnosti i male terapijske širine.

Grupa kardenolidnih droga naziva se i digitalisova ili digitaloidna, jer je najtipičniji predstavnik purpurni digitalis čije su kapi prve primenjene 1785. godine u terapiji srčanih smetnji (Daniel i sar., 2003). Bufadienolidni heterozidi predstavljaju grupu kardioaktivnih supstanci prisutnih u biljnom i životinjskom svetu. Naziv im je izveden iz naziva tropskih žaba roda *Bufo* sp. kod kojih je iz otrovnog sekreta potkožnih žlezda izolovana kompleksna mešavina steroidnih jedinjenja (bufalin, bufatalin i bufatoksin) kardiotionične aktivnost i strukture slične bufadienolidnim heterozidima.

Poslednjih godina, opisano je više od 250 supstanci iz grupe bufadienolida, koje se međusobno razlikuju na osnovu broja, vrste i položaja supstituenata. Glavni izvori ovih heterozida su određene biljne vrste koje pripadaju familijama *Crassulaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae*, *Melanthaceae*, *Ranunculaceae*, *Santalaceae*, *Leguminosae* i *Sterculiaceae* i neke životinjske familije koje uključuju žabe (*Bufo* sp., *Bufo*idae), zmije (*Rhabdophis* sp., *Colubridae*), svice (*Photinus* sp., *Lampyridae*) i sisare (*Mammaliae*) (Krenn i Kopp, 1998; Steyn i Van Heerden, 1998; Gao i sar., 2011).

Biotransformacijom bufadienolida na suspenziji kultura biljnih ćelija (Zhao i sar., 2007; Zhang i sar., 2011) ili mikrobiološkom transformacijom (Ye i Guo, 2008; Ma i sar., 2008; Ning i sar., 2010) vrše se strukturne modifikacije ovih prirodnih proizvoda i doprinosi povećanju raznovrsnosti ove klase jedinjenja. U okviru familije *Ranunculaceae*, *Helleborus* L. je jedini rod poznat po sadržaju ovih komponenti. Novija istraživanja ukazuju na prisustvo biološki aktivnih supstanci sličnih ili identičnih biljnim kardiotoničnim steroidima u tkivima i telesnim tečnostima pacova (Kashin i sar., 2008; Puschett i sar., 2010), pasa (Bagrov i sar., 1996), svinja i čoveka (Bagrov i sar., 2002; Schoner, 2002), kao i u nadbubrežnim žlezdama i hipotalamusu goveda (Li i sar., 1998; Schneider i sar., 1998). Dok je za biljne bufadienolide prekursor pregnenolon (u biosintetskom putu učestvuju: sirćetna kiselina→mevalonska kiselina→izopentenil pirofosfat→skvalen→skvalen2,3oksid→lanosterol→holesterol→pregnenolon→bufadienolidi) (Hanson, 2003), za sintezu bufadienolida sisara nije potrebno cepanje bočnog lanca holesterola (Dmitrieva i sar., 2000). Bufadienolidi poseduju širok dijapazon bioaktivnog delovanja, koji uključuje uticaj na performanse srčane muskulature, krvni pritisak i kardiovaskularni sistem (Doris i Bagrov, 1998; Dmitrieva i Doris, 2002), bubrežnu ekskreciju natrijuma (Eliades i sar., 1991), dvofazni efekat na produkciju NO (Bhuiyan i Dasgupta, 2003), aktivnost nervnog sistema (Van der Walt i sar., 1997), imunoregulatorno (Terness i sar., 2001-a,b; Shimizu i sar., 2004), antimikrobno (Tempone i sar., 2008; Puglisi i sar., 2009), antioksidativno (Čakar i sar., 2011) i antineoplastično delovanje (Daniel i sar., 2003; Watanabe i sar., 2003; Gao i sar., 2011; Qi i sar., 2011). Ovi heterozidi predstavljaju značajnu bioregulatornu vezu između kardiovaskularnog, nervnog i imunskog sistema, a njihova biološka svojstva značajno mogu da doprinesu održavanju homeostaze.

Heleborin i heleborein. Dilparić-Knežević (1977) navodi da je prva ispitivanja hemijskog sastava različitih *Helleborus* vrsta izveo Vauquelin koji je 1808. godine iz alkoholnog ekstrakta *H. hiemalis* L. (*Eranthis hiemalis* Salisb.) izolovao smolastu supstancu koju je nazvao heleborin, a da je Bastik četrdeset pet godina kasnije (1853) iz *H. niger* L. izdvojio heleborin u kristalnoj formi. Isti autor ističe da je Marmé sredinom XIX veka (1864) iz rizoma i korena *H. niger* L. uspeo da pored heleborina, rastvorljivog u alkoholu i hloroformu, izoluje i novu supstancu heleborein, koji je bio lako rastvorljiv u vodi, teško u alkoholu i nerastvorljiv u etru. Sušenjem i uparavanjem vodenog rastvora dobijena je transparentna žućkasta masa slična smoli. Godinu dana kasnije, Husemann i Marmé (1865) su objavili rezultate hemijskih analiza obe supstance izolovane iz podzemnih organa *H. niger* L., *H. viridis* L. i *H. foetidus* L. koje ukazuju na njihovu glikozidnu prirodu. Heleborin ($C_{36}H_{42}O_6$) su hidrolizom razložili na aglikon heleborezin ($C_{30}H_{38}O_4$) i jedan molekul glukoze, a heleborein ($C_{26}H_{44}O_{15}$) na aglikon heleboretin ($C_{14}H_{20}O_3$) i dva molekula glukoze. Utvrdili su da heleborin ispoljava narkotično i hemolitičko delovanje i pretpostavili da je po sastavu saponin, dok je heleborein ispoljio kardiotonično delovanje slično delovanju digitalisa. Usled narkotičnog delovanja heleborina, kukurek se u starom veku, naročito kod starih Grka, koristio kao lek protiv mentalnih oboljenja. Kod odraslih mačaka, 300 mg heleboreina unetog peroralno dovelo je do smrtonosne intoksikacije, dok je mnogo manja doza aplikovana subkutano izazvala uginuće usled srčane paralize. Thaeter (1897) je smatrao da je heleborein glavni sastojak droge *Hellebori radix* i dobio ga je u kristalnoj formi ($C_{37}H_{56}O_{18}$), a potom hidrolizovao na amorfni genin heleboretin ($C_{19}H_{30}O_5$), dva molekula glukoze i tri molekula sirćetne kiseline koja je razgradni produkt. Sieburg (1913) je kao produkte hidrolize heleboreina [$(C_{21}H_{34}O_{10})$ ili $(C_{21}H_{34}O_{10})_3$] dobio dva amorfna genina (kiselih heleboretin saponifikacijom od labilnog laktona i neutralni heleboretin $C_{15}H_{24}O_3$), glukoze, L-arabinozu i sirćetnu kiselinu. Za razliku od prethodno navedenih autora, on smatra da je heleborein saponin. Ovo mišljenje su delimično potvrdili Kofler i Steidl (1934) koji su hemolitičko delovanje *Hellebori radix* pripisali heleboreinu i na osnovu hemijskih osobina i fiziološkog delovanja svrstali ga između heterozida digitalisa i saponina. Zimmermann-Meinzingen i Čičovački (1938) su ukazali da su doza i terapijsko delovanje glikozida izolovanih iz *H. niger* L. slični glikozidima strofantidina, ali da je njihov efekat na vagus često izraženiji i zbog toga su

posebno korisni u terapiji tahikardije i aritmije. Čučković (1939) je iz ekstrakta podzemnih organa *H. atrorubens* W. et K., nakon kristalizacije heleborina, izolovala heleborein za koji smatra da je saponinski glukozid.

Keller i Schöbel (1928) su izolovali heleborin iz *Helleborus niger* L. i *H. viridis* L. u dve frakcije ($C_{28}H_{36}O_6$, tačke topljenja $269\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $C_{27}H_{36}O_6$, tačke topljenja $270\text{ }^{\circ}\text{C}$) ali nisu pokušavali da ga hidrolizuju, a Čučković (1939) ga dobija iz *H. atrorubens* W. et K. i to iz rizoma u količini od 0,16%, a iz korena 0,13% i pretpostavlja da je identičan sa heleborinom izolovanim iz prethodno navedenih vrsta, kako po glavnim fizičko hemijskim svojstvima, tako i po fiziološkom delovanju. Berger (1960) navodi da samo saponinski heterozid heleborin predstavlja hemijski jedinstveno jedinjenje, dok heleborein nije hemijski definisano jedinjenje, već predstavlja smešu supstanci. Steinegger i Hänsel (1972) su utvrdili da rizom i koren *Helleborus niger* L. sadrže saponin heleborin koji deluje nadražajno, izaziva kijanje, povraćanje, dijareju i deluje hemolitički.

Helebrin. Karrer (1943) je prvi iz većeg broja uzoraka podzemnih delova *Helleborus niger* L. sa različitih staništa (Švajcarska, Nemačka, Francuska, Austrija, Mađarska, Jugoslavija i Rumunija), ekstrakcijom prema *Soxhletu*, izolovao helebrin ($C_{36}H_{52}O_{15}$) kao jedinstvenu supstanciju glikozidnog karaktera (helebrigenin-glukoramnozid). Smatra se da je helebrin glavno kardiotonično jedinjenje roda *Helleborus* L. Helebrin je izdvojen u obliku bezbojnih nehigroskopskih kristala, koji se u vodi i etil alkoholu teško rastvaraju (oko 0,45 odn. 0,2%), nešto lakše u metil alkoholu (oko 0,6-0,7%), još lakše u razblaženom metil i etil alkoholu, a nerastvorljivi su u hloroformu i etru. Helebrin je fiziološki veoma aktivan: 1 gr helebrina sadrži 25×10^5 - 32×10^5 F.D. (Frosch-Dosis=žabljih doza), dok je efikasnost najjačeg kardioaktivnog glikozida konvalatoksina 30×10^5 - 35×10^5 F.D./g. Letalna doza helebrina za odrasle mačke pri intravenskoj aplikaciji je 0,1 mg/kg. Peroralno unošenje 1 mg helebrina mačke tolerišu bez simptoma, dok doza od 10 mg daje letalni ishod. Upoređujući ove vrednosti sa vrednostima za heleborein, ovaj autor je došao do zaključka da je helebrin 20-30 puta efikasniji od heleboreina (i.v. heleborein LD 1,9 mg/kg, helebrin LD 0,1 mg/kg; p.o. heleborein LD 300 mg, helebrin LD 10 mg). Schmutz (1949) je odredio strukturu ovog glikozida, tako što je pomoću strofantobiazije odvojio D-glukozu od biozida helebrina i tako dobio monozid desglukohelebrin koji je dalje hidrolizovao pomoću razređene

hlorovodonične kiseline u acetonu na L-ramnozu i visokoaktivni helebrigenin. Zatim je biološkom titracijom na mačkama uporedio njihovu toksičnost sa nekim poznatim kardiotioničnim heterozidima. Dobijeni rezultati su ukazali da je i.v. aplikovan helebrin (LD 0,1040±0,003 mg/kg) toksičniji od konvalozida (LD 0,2150±0,013 mg/kg) i strofantidina (LD 0,3250±0,023 mg/kg), ali manje toksičan od konvalotoksina (LD 0,0790±0,003 mg/kg), desglukohelebrina (LD 0,0869±0,003 mg/kg), helebrigenina (LD 0,0769±0,005 mg/kg) i njegovih derivata helebrigenol-monoacetata (LD 0,768±0,003 mg/kg) i helebrigenin-monoacetata (LD 0,0642±0,002 mg/kg) koji ima najintenzivnije dejstvo. Godinu dana kasnije, Chen i sar. (1950) su ponovili deo navedenog ogleada na mačkama i golubovima, kojim su ispitivali uticaj *Helleborus* L. glikozida i njihovih aglikona na srčanu aktivnost i potvrdili rezultate svog prethodnika. Sva jedinjenja, osim desglukohelebrina, izazvala su povraćanje kod eksperimentalnih životinja i uzrokovala kontrakcije glatkomišićnih organa. Baytop i Malkoc (1965) su hromatografijom na papiru dokazali prisustvo helebrina u podzemnim organima *H. orientalis* Lam. Petričić i sar. (1967) su opisali postupak za kvantitativno određivanje helebrina u rizomu i korenu *Helleborus atrorubens* W. et K., koji se zasniva na odvajanju helebrina pomoću tankoslojne hromatografije sa silikagelom G prema Stahlu sa sistemom rastvora hloroform–metanol–voda (10:2:0,15) i kolorimetrijskoj reakciji ovog glikozida sa Wasickyevim reagensom (p-dimetilaminobenzaldehidom u razređenoj sumpornoj kiselini). Pri tome nastaje ružičasto-ljubičasta boja koja se ponaša po Lambert-Berovom zakonu. Oni su predložili i jednostavan postupak izolacije helebrina kojim je iz 2 kg sirovine dobijeno 5,6 g čistog helebrina što ukazuje na relativno dobro iskorištenje.

Petričić i sar. (1968) su titracijom na golubu, uporedili biološke vrednosti bufadienolida tipa helebrigenina (helebrin i desglukohelebrin) sa hemijski sličnim kardenolidima tipa strofantidina (k-strofantozid, k-strofantin-β i cimarin). Helebrigenin i strofantidin imaju identičan steroidni deo molekula, a razlikuju se po ligandu na atomu C₁₇: helebrigenin ima dvostruko nezasićeni šestočlani laktonski prsten, a strofantidin ima α-β-nezasićeni petočlani laktonski prsten. Za ovo ispitivanje, helebrin je pripremljen iz podzemnih delova *Helleborus atrorubens* W. et K. prema prethodno objavljenom postupku, desglukohelebrin enzimskom hidrolizom iz helebrina po postupku Schmutza, a helebrigenin kiselom hidrolizom iz desglukohelebrina. Poređenjem dobijenih rezultata, utvrđeno je da je pri intravenskoj aplikaciji u

intervalima od po 5 minuta, najefikasniji desglukohelebrin (LD 0,157 mg/kg), da je helebrin (LD 0,176 mg/kg) toksičniji od k-strofantina- β (LD 0,222 mg/kg) i k-strofantozida (LD 0,260 mg/kg) i da je toksičnost helebrigenina i strofantidina slična (LD 0,514 mg/kg, odn. 0,526 mg/kg). Ponašanje helebrina i k-strofantozida pri produženoj intravenskoj aplikaciji je slično, tako da je odnos toksičnosti gotovo isti pri aplikaciji svakih 5 minuta kao i svakih 10, 20 ili 30 minuta (LD helebrina 0,176 mg/kg, 0,181 mg/kg, 0,173 mg/kg, 0,166 mg/kg vs LD k-strofantozida 0,260 mg/kg, 0,266 mg/kg, 0,260 mg/kg, 0,240 mg/kg). Pri intraperitonealnoj aplikaciji, efikasnost k-strofantozida je još slabija od helebrina nego pri intravenskoj aplikaciji (LD 50 0,550 mg/kg, odn. 0,320 mg/kg). To ukazuje na bolju resorpciju helebrina nego k-strofantozida, a pretpostavlja se i da je u digestivnom traktu došlo do brzog odvajanja glukoze kod oba heterozida, pri čemu su nastali sekundarni heterozidi između kojih je razlika jače izražena. Ovi autori smatraju da šećerna komponenta ima ulogu u toksičnosti heterozida. Desglukohelebrin koji ima jedan molekul šećera (ramnozu) dvostruko je toksičniji od cimarina (LD 0,317 mg/kg) koji takođe ima jedan molekul šećera (cimarozu). Ranije je utvrđeno da konvalotoksin sa ramnozom kao šećernim delom molekula ispoljava dvostruko jače delovanje u odnosu na cimirin, sa kojim ima istu aglukonsku komponentu (Kušević, 1962), a dvadesetak godina kasnije Shimada i sar. (1986) su potvrdili da L-ramnoza značajno povećava kardiotioničnu aktivnost aglikona. Ova ispitivanja nisu potvrdila rezultate Schmutza (1949) i Chena i sar. (1950) dobijene na mačkama da je helebrigenin toksičniji od helebrina. Dobijeni rezultati su naveli autore na zaključak da je neophodno nastaviti dalja istraživanja kako bi se sa sigurnošću utvrdio odnos helebrina prema k-strofantozidu i ispitala mogućnost da helebrin i njegovi desgluko-produkti uspešno zamene neke kardiotonike koji su u upotrebi (na pr. k-strofantozide i k-strofantine).

Uporednim određivanjem sadržaja helebrina u podzemnim delovima većeg broja samoniklih vrsta roda *Helleborus* L. sa područja bivše Jugoslavije, Petričić i sar. (1971-a) su najveću količinu helebrina utvrdili kod *H. odorus* W. et K. (0,55%), a samo kod *H. macranthus* Freyn. nisu dokazali njegovo prisustvo. Ostali uzorci prikupljeni sa različitih staništa su imali relativno visok procenat ovog glikozida: *H. atrorubens* W. et K. 0,35-0,54%, *H. multifidus* Vis. 0,30-0,47%, *H. dumetorium* W. et K. 0,44% i *H. istriacus* (Schiffn.) Borb. 0,54%. Desglukohelebrin nije dokazan ni u jednom

ispitivanom uzorku. Ovi autori su smatrali da je za terapiju značajan ne samo sadržaj helebrina u *Helleborus* sp. u prirodi, već i pogodnost za gajenje u kulturi onih vrsta koje ga sadrže u dovoljnoj količini. Utvrdili su da je vrsta *H. atrorubens* W. et K. preneti sa Zagrebačke gore na ogledno polje Žitnjaka (ravni deo okoline Zagreba), posle perioda adaptacije na nove uslove rasta i aklimatizacije od 3-4 godine, proizvela više helebrina u kulturi (0,45%) nego na prirodnom staništu (0,35%). Iz dobijenih rezultata je izveden zaključak da se biljne vrste prenete sa prirodnog staništa ne menjaju samo po izgledu, već i po sastavu, što može dovesti do stvaranja nove biljne vrste, odnosno podvrste. Tschesche (1972) je ispitivao proces biogeneze helebrina i utvrdio da cela biljka *H. atrorubens* W. et K. sadrži oko 2% ovog jedinjenja čiji je prekursor glukozid pregnenolon. Radioaktivni prekursor aplikovan je u biljku, a nastali helebrin je nakon 2 nedelje izolovan hromatografijom na koloni SiO₂ i identifikovan postupcima radiohromatografije i ko-kristalizacije. Veća količina radioaktivnog helebrina prisutna u lišću nego u korenu, ukazuje da se biosinteza verovatno odvija u lišću, a da je korenje glavno mesto akumulacije helebrina. Ozonoliza helebrina je potvrdila lokalizaciju ukupne radioaktivnosti u laktonskom prstenu, kao kod kardenolida.

Wissner i Kating (1974-a,b,c) su sprovedli botanička (morfološko-anatomska) i fitohemijska ispitivanja većeg broja evropskih i azijskih vrsta roda *Helleborus* L. Ovi autori (1974-a) su izvršili kultivaciju prikupljenog materijala na eksperimentalnim poljima, vegetativnom (iz rizoma) i generativnom (iz zrelog semena) reprodukcijom ovih biljaka i pratili njihov rast i razvoj. Povećanje prosečne mase podzemnih organa utvrđeno je već nakon godinu dana (160%) gajenja u kulturi, a posle 3 godine prirast mase korena i rizoma je bio povećan najmanje oko 600% (*H. odorus* W. et K. i *H. dumetorium* W. et K.) a najviše 1330% (*H. purpurascens* W. et K.). Po završetku kultivacije, između uzoraka nisu utvrđene morfološke razlike, osim kod *H. foetidus* L. koji nema rizom već lignificiran korenov sistem. U cilju fitohemijske karakterizacije, Wissner i Kating (1971, 1974-b) su vršili uporedna određivanja količine kardioaktivnih glikozida i saponozida u rizomu i korenu većeg broja samoniklih biljaka roda *Helleborus* L. Spektrofotometrijskom analizom su utvrdili da je helebrin glavni glikozid sledećih vrsta: *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *occidentalis* (Reuter) Schiffner, *H. odorus* W. et K., *H. multifidus* Vis., *H. dumetorum* W. et K., *H. dumetorum* ssp. *atrorubens* (W. et K.) Merxm. et Podl., *H. purpurascens* W. et K., *H. cyclophyllus* Boiss. i

H. bocconei ssp. *siculus* (Schiffner) Merxm. et Podl., koje ga sadrže u količini 0,30-1,5%, dok *H.orientalis* Lam. sadrži helebrin samo u tragovima (manje od 0,05%), ali i veliku količinu desglukohelebrina (0,5%), koja je mnogo veća nego kod drugih vrsta. Najviše nivoe helebrina imali su *H. odorus* W. et K. (0,5-1,2%) i *H. purpurascens* W. et K. (0,6-1,5%) različitog porekla. Odsustvo helebrina u *H. niger* L., *H. foetidus* L., *H. lividius* ssp. *corsicus* (Willd.) Tutin i *H. vesicarius* Auch., čini ove vrste pogodnim za fitoterapiju različitih inflamatornih stanja. Ovi autori (1974-c) su ustanovili da je količina helebrina različita kod istih vrsta sa različitih staništa (kod *H. odorus* W. et K. se kreće između 0,5 i 1,2%), kao i u okviru iste biljke (sadržaj helebrina u korenu i rizomu je najveći u periodu dozrevanja semena, a u toku zime opada za oko 50-65%). Ne može se sa sigurnošću tvrditi da li su za te razlike u biogenezi helebrina odgovorni geografski položaj, klimatski faktori, životna sredina, edafski faktori staništa (koncentracija vodonikovih jona i sadržaj kalcijuma u zemljištu), stadijum razvića ili genetski faktori. Coassini Lokar i sar. (1982) su takođe ispitivali uticaj nekih faktora (nadmorske visine, životne sredine, sezone, faze biološkog ciklusa) na proizvodnju aktivnih principa u podzemnim organima *H. odorus* W. et K. Utvrdili su da se tokom perioda aktivnosti količina helebrina i saponina povećava sa nadmorskom visinom i da je njihov sadržaj veći kod biljaka na strmim sunčanim padinama.

Na osnovu istraživanja drugih autora i rezultata do kojih je sam došao, Petričić (1974) iznosi podatak da podzemni delovi većeg broja ispitivanih vrsta roda *Helleborus* L. sadrže 0,30-0,55% kardiotioničnog glikozida helebrina (osim *H. macranthus* Freyn.) i da je to količina koja ovu biljnu vrstu svrstava u značajan izvor za ekstrakciju helebrina i ekonomski opravdava njeno iskorišćavanje i za potrebe farmaceutske industrije. Cioaca i Cucu (1974) su uporedili metod Petričića i sar. (1967) sa tehnikom Wissnera i Katinga (1971) i predložili postupak kvantitativne determinacije helebrina u podzemnim organima *H. purpurascens* W. et K. Dilparić-Knežević (1977) je utvrdila da se sadržaj helebrina u rizomu i korenu većeg broja vrsta roda *Helleborus* L. kreće od 0,24-0,54%, dok kod *H. macranthus* Freyn. helebrin nije utvrđen, a da je količina helebrina od 0,24-0,38% izmerena u uzorcima *H. odorus* W. et K. prikupljenim sa različitih staništa i u različitim vremenskim periodima. Vrste roda *Helleborus* L. sa područja bivše Jugoslavije Petričić i sar. (1977) i Dilparić-Knežević (1977) su prema količini helebrina u podzemnim organima biljke grupisali u dva hemotipa: hemotip sa visokom količinom

helebrina (0,24-0,54%) predstavljaju vrste *H. odorus* W. et K., *H. croaticus* Martinis, *H. istriacus* Schiffn., *H. multifidus* Vis., *H. atrorubens* W. et K. i *H. dumetorum* W. et K., dok hemotip sa malom količinom helebrina (u tragovima ili ispod 0,05%) što ih čini pogodnim za fitoterapiju, predstavljaju vrste *H. niger* L. i *H. macranthus* Freyn. koje je botanički teško razlikovati. U većini ispitivanih vrsta, desglukohelebrin je prisutan u tragovima, a nije dokazan u *H. niger* L. i nekim uzorcima vrsta *H. macranthus* Freyn. i *H. multifidus* Vis., dok helebrigenin nije dokazan ni u jednoj vrsti. Utvrđene razlike u odnosu na sadržaj pojedinih sastojaka su vrlo važne, jer ukazuju da i bliske botaničke vrste nemaju istu sposobnost da sintetišu konstituente koji su karakteristični za određeni rod. Colombo i sar. (1990) su hromatografskom i spektroskopskom analizom dokazali prisustvo helebrina (helebrigenin-glukoramnozida) u etil acetatnim ekstraktima i desglukohelebrina (helebrigenin ramnozida) i bufa-20,22-dienolide-3,5,14-trihidroksi-19-okso-(3 β ,5 β) helebrigenina u hloroformskim ekstraktima svežih podzemnih delova *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *viridis* i *H. odorus* W. et K. ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. Muhr i sar. (1995) su primenom 2D NMR spektroskopije ispitivali strukturu helebrina izolovanog iz metanolnog ekstrakta korena *H. purpurascens* W. et K. i hemijski je determinisali kao 3- β -O-(β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranozil) helebrigenin. Kvalitativnom sistematskom analizom i TLC skriningom etanolnog ekstrakta droge *Hellebori (serbici) radix et rhizoma* Maksimović (1998) je dokazao da ispitivana droga sadrži helebrin (0,39%) i dezglukohelebrin, dok su Bassarello i sar. (2008) izolovali helebrigenin i desglukohelebrin iz metanolnog ekstrakta podzemnih organa *H. caucasicus* A. Br. i objasnili strukturu ovih jedinjenja 1D i 2D NMR spektroskopskom analizom

Kolesnikov i Tropp (1952) su iz podzemnih organa kavkazske i gruzijske endemske vrste *H. caucasicus* A. Br., izolovali kristalni glikozid rastvorljiv u acetonu i teško rastvorljiv u hloroformu, tačke topljenja 234 °C, jakog delovanja na srčanu akciju i nazvali ga korelborin K. Nekoliko godina kasnije, Resnitschenko i sar. (1961) su u podzemnim organima *H. caucasicus* A. Br. dokazali bufadienolid korelborin K, a zatim su iz korena i rizoma *H. purpurascens* W. et K. sakupljenog na Karpatima izdvojili kristalni kardiotonični heterozid korelborin P, teško rastvorljiv u acetonu i nerastvorljiv u hloroformu, tačke topljenja 283 °C. Šikl i sar. (1961) su izolovali i izvršili karakterizaciju srčanih glikozida korelborina P i desglukohelebrina iz podzemnih

organa *Helleborus purpurascens* W. et K. koji je karakterističan za oblast Slovačke. Zatim su na osnovu tačke topljenja, uporedne hromatografije na papiru (sistem butanol/voda 1:1), bojene reakcije sa 84% H₂SO₄ i IR spektra, dokazali da je izolovani biozid korelborin P identičan helebrinu, a monozid desglukohelebrin korelborinu K. Dobijeni glikozidi su ispoljili visoku biološku aktivnost. Zoz (1956) navodi da je postupkom biološke titracije utvrđeno da minimalna letalna doza korelborina za mačke iznosi 0,084-0,088 mg/kg, a za žabe 0,0003-0,0004 mg/g (biološka aktivnost 1g korelborina K je 11500 KED, a korelborina P 11363 KED). Toksičnije delovanje je ispoljio korelborin K koji je sličan digitoksinu, dok je manje toksični korelborin P bliži strofantinu. Ангарская i sar. (1953) su ukazali na kumulativna svojstva korelborina K i njegovo mesto između digitoksina i strofantina.

Heleborogenon. Primenom postupka za izolovanje helebrina, Petričić i sar. (1972) su dokazali i opisali bufadienolidnu supstancu steroidnog karaktera sa kardiotoničnim delovanjem i nazvali je heleborogenon (14-hidroksi-3-keto-bufa-1,4,20,22-tetraenolid), najpre iz podzemnih delova *H. atrorubens* W. et K., a kasnije i u ostalim ispitivanim vrstama roda *Helleborus* L. (*H. odorus* W. et K., *H. multifidus* Vis., *H. istriacus* (Schiffn.) Borb. i *H. macranhtus* Freyn.). Izolovana supstanca (C₂₄H₂₈O₄) je slabo polarna (lako se odvaja od helebrina i saponina kao nepolarnija supstanca) i dobro kristališe iz metanola, etanola ili acetona, a dobijeni kristali imaju tačku topljenja 250-262 °C. Ovo jedinjenje poseduje steroidno jezgro sa dvostruko nezasićenim šestočlanim laktonskim prstenom na C₁₇ i kiseonikom na C₃ koji je vezan u keto obliku, a ne u obliku hidroksida u kome je u glikozidima H-atom zamenjen šećerom. Ispitivanjem toksičnosti na golubovima (metodom po Milesu i Perryju) dokazano je da je heleborogenon slične toksičnosti kao i digitoksin (LD heleborogenona iznosi 0,496 mg/kg, a digitoksina 0,503 mg/kg). Interesantno je da prilikom intravenskog aplikovanja heleborogenona, golubovi nisu pokazali karakteristično povraćanje, koje se javlja pri aplikovanju kardiotonika. Dilparić-Knežević (1977) je utvrdila da sve ispitivane vrste, osim *H. niger* L., sadrže heleborogenon: relativno velika količina (0,3 do 0,4%) nađena je u podzemnim organima *H. atrorubens* W. et K., *H. multifidus* Vis., *H. istriacus* (Schiffn.) Borb. i *H. croaticus* Martinis, dok se u većini uzoraka *H. macranhtus* Freyn. količina kretala od 0,2 do 0,3%. U ispitivanim uzorcima rizoma i korena *H. odorus* W. et K. heleborogenon je zastupljen uglavnom samo u tragovima,

osim u dva uzorka gde se količina kretala od 0,20-0,30%. Istu supstancu (14-hidroksi-3-okso-1,4,20,22-bufatetranolid) izolovali su i Wissner (1973) iz osušenog rizoma i korena *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *occidentalis* (Reuter) Schiffner i *H. dumetorium* ssp. *atrorubens* (W. et K.) Merxm. et Podl. i Colombo i sar. (1990) iz hloroformskog ekstrakta svežih podzemnih organa *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *viridis* i *H. odorus* W. et K. ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. Wissner (1973) nije detektovao prisustvo heleborogena u ostalim evropskim i maloazijskim vrstama roda *Helleborus* L.

Glukohelebrin. Wissner i Kating (1974-b,c) su izolovali bufadienolid triozyd glukohlebrin iz korena i rizoma *H. dumetorium* W. et K., koji kao i helebrin i desglukohlebrin ima aglikon helebrigenin, a u odnosu na helebrin sadži jedan molekul D-glukoze više i ima nižu tačku topljenja (195-198 °C vs 283-284 °C). Uzgajanjem *H. odorus* W. et K. i *H. viridis* L. na istom staništu utvrdili su da se odnos helebrina i glukohlebrina pomera u korist glukohlebrina.

5 α -bufalon, ramnozid, tigenkaozid A, tigenkaozid B. Iz rizoma i korena *H. odorus* W. et K. izdvojena je nova kardiotonična supstanca, bufadienolid 5 α -bufalon (14-hidroksi-3-okso-5 α ,14 β -bufa-20,22-dienolid) (Hauser i sar., 1972). Watanabe i sar. (2003) su iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam. hromatografskim metodama (hromatografijom na koloni i HPLC) izolovali dva poznata glikozidna bufadienolida i novi bufadienolid ramnozid (5 β ,14 β ,16 β -trihidroksi-19-okso-3 β -[(α -L-ramnopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid), determinisali im strukturu spektroskopskom analizom i procenili njihovu citotoksičnu aktivnost na kulturama tumorskih i normalnih humanih ćelija. Iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. thibetanus* Franch. Yang i sar. (2010) su izolovali, spektroskopskom analizom odredili strukturu i analizirali citotoksično delovanje dva nova bufadienolida, tigenkaozida A (14 β ,16 β -dihidroksi-3 β -[(β -D-glukopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid) i tigenkaozida B (14 β ,16 β -dihidroksi-3 β -[(β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glukopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid), kao i dva poznata bufadienolida (helebrigenina i 5 β ,14 β -dihidroksi-19-okso-3 β -[(α -L-ramnopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolida).

2.6.1.1.b. Kardiotonični (bufadienolidni), flavonoidni i fenolni heterozidi iz nadzemnih organa *Helleborus* L.

Novi glikozidi su izolovani i iz nadzemnih delova biljaka roda *Helleborus* L.: iz lišća različitih vrsta *Helleborus* L. Hill i van Heyningen (1951) su izolovali kristalni glikozid ranunkulin (β -D-glukopiranozid) i njegov izomer izoranunkulin (4-(β -D-glukopiranoziloksi)-2-penten-5-olid); iz cvetova *H. foetidus* L. Tschesche i sar. (1972) su izdvojili i odredili strukturu laktonskih glikozida ranunkozida i ranunkulozida; iz osušene stabljike, listova i cvetova *H. niger* L. Martinek (1973, 1974-a) je izolovao i hidrolizovao nepoznat heterozid koga je nazvao supstanca G, a zatim ga (1974-b) identifikovao kao ranunkozid čijom kiselom hidrolizom je dobio D-glukoze i aglikon 5-hidroksilevulinsku kiselinu. Tschesche i sar. (1981) su dokazali da je 5-hidroksilevulinska kiselina inkorporirana u četiri glukoze (ranunkulin, izoranunkulin, ranunkozid i ranunkulozid) nadzemnog dela *H. foetidus* L i da je prekursor u biosintezi protoanemonina. Iz semena *H. odoratus* W. et K. Kißmer i Wichtl (1986) su pored helebrina i desglukohelebrina izolovali kardiotonični bufadienolidni heterozid 11 α -hidroksi-desglukohelebrin, a Meng i sar. (2001) su iz semena *H. torquatus* Archer-Hind izolovali i determinisali strukturu tri bufadienolida: helebortina A, helebortina B i helebortina C.

Hill i van Heyningen (1951) su kristalni glikozid ranunkulin (β -D-glukopiranozid), izolovan iz svežeg lišća različitih vrsta *Helleborus* L. (tokom procesa sušenja ovaj glikozid se enzimski dekomponuje), konvertovali u uljani nezasićeni γ -lakton protoanemonin (5-metilen-2-oksodihidrofuran) odvajanjem D-glukoze pomoću slabe baze (natrijum acetata). Hemiterpenski lakton protoanemonin je supstanca sa antibiotskim i antimikotičkim delovanjem (Martin i sar., 1990) koja je nestabilna i spontano polimerizuje u nerastvorljivi dimer anemonin koji nema antibiotsku aktivnost (Paris i Moyse, 1981). Dobija se autolizom ranunkulina postupcima maceracije, alkalne hidrolize ili destilacije svežeg biljnog tkiva nekoliko vrsta porodice *Ranunculaceae*, uključujući rodove *Helleborus* L., *Anemone* L., *Clematis* L., *Ceratocephalus* L. i najčešće *Ranunculus* L. (Bonora i sar., 1987). Iz destilata lišća deset vrsta ove porodice, Bonora i sar. (1985) su dobili protoanemonin iz prekursora ranunkulina, a zatim ga pomoću HPLC, primenom tehnika normalnih i reverznih faza, determinisali, izdvojili i

utvrdili njegov nizak sadržaj kod *H. odorus* W. et K. (4,6 µg/g) i visoke vrednosti kod *H. niger* L. (5820,5 µg/g) i *H. foetidus* L. (672 µg/g). Prieto i sar. (2006) su iz metanonog ekstrakta svežeg lišća *H. foetidus* L. izolovali γ-lakton anemonin. Protoanemonin kod svih vrsta životinja prilikom žvakanja nadzemnih delova kukureka izaziva intenzivnu zapaljensku reakciju, pojačanu salivaciju i ulceracije usne duplje i grla, a dospevanje veće količine u želudac i creva dovodi do iritacije digestivnog trakta, odnosno gastroenteritisa praćenog pojačanom sekrecijom, abdominalnim bolom, povraćanjem i dijarejom sa primesama krvi (Frohne i Pfänder, 2005). Prilikom aplikovanja kukureka kao antiparazitika na kožu, ova supstanca može da izazove kontaktni dermatitis praćen eritemom i otokom, a ponekad i pojavom plikova i nekrozom tkiva (Spoerke i Smolinske, 1990). Bai i sar. (1996) su koristeći različite ekstrakcione postupke iz smrznuto-suvih biljnih uzoraka nadzemnih delova 11 vrsta familije *Ranunculaceae* uspeali da HPLC analizom determinišu ranunkulin u 8 vrsta, u koncentraciji od 1,5-19,9% (analiza nije obuhvatila *Helleborus* L.).

Flavonoidi su dugo smatrani hemotaksonomskim markerima familije *Ranunculaceae* (Lebreton, 1986), a posebno su kafeoidni i feruloidni flavonoidni glikozoidi tipični za ovu familiju i *Helleborus* sp. (Gluchoff-Fiasson i sar., 1994). Harborne (1965) je saopštio da su u kruničnim listićima *H. foetidus* L., prisustni polifenoli kvercetin 3-(kafeoilsoforozid)-7-glukozid i 3-(ksilozilglukozid)-7-glukozid, a dve godine kasnije objavio je da latice *H. niger* L. sadrže kemferol 3-sambubiozid-7-glukozid, 3-sambubiozid i 3-glukozid-7-glukozid, dok se u prašnicima nalazi kemferol-3-soforozid (Harborne, 1967). Preliminarnim hromatografskim i spektroskopskim skriningom metanolnog ekstrakta pulverizovanih prizemnih listova *H. cyclophyllus* Boiss. Philianos i sar. (1983) su utvrdili prisustvo polifenolnih komponenti (flavonoida i fenolnih kiselina: parakumarinske, vanilinske, hlorogenske i kafene). Tankoslojnom hromatografijom na silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck), Maleš i Medić-Šarić (2001) su iz metanolnog ekstrakta lišća *H. atrorubens* W. et K. izdvojili 15 komponenti: 8 aglikonskih komponenti flavonoidnih heterozida (8 flavonoida koji su derivati kemferola i kvercetina) i 7 aglikona fenolnih heterozida (7 fenolnih kiselina odn. fenolkarbonskih kiselina od kojih su tri identifikovane kao ferulinska, kafena i hlorogenska kiselina). Braca i sar. (2004) su iz lišća *H. viridis* L. izolovali tri nova flavonoidna kvercetin glikozida, a Prieto i sar. (2006) su iz lišća *H. foetidus* L. izolovali

novi acetilizovani flavonoidni kvercetin glikozid, zajedno sa dva poznata fenolna glikozida i identifikovali ih na osnovu detaljne spektroskopske analize. Fitohemijiskim ispitivanjima metanolnog ekstrakta lišća *H. niger* L., Vitalini i sar. (2011) su izolovali derivat fenolnog glikozida i dva flavonoidna glikozida i izvršili njihovu strukturnu karakterizaciju na osnovu obimnih NMR spektralnih analiza. Čakar i sar. (2011) su spektrofotometrijskom metodom utvrdili da vodeni i etanolni ekstrakti lišća sva tri ispitivana taksona *Helleborus* sp. (*H. odorus* W. et K., *H. multifidus* Vis. i *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew) sadrže značajno više ukupnih fenola i flavonoida u odnosu na ekstrakte podzemnih organa ovih biljaka, dok je količina proanticianidina bila slična kod svih ekstrakata. Sadržaj fenola je varirao od 7 mg CAT g⁻¹ u vodenom ekstraktu korena *H. odorus* W. et K. do 242,41 mg CAT g⁻¹ u ekstraktu lišća *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew. Najveća koncentracija flavonoida je utvrđena u vodenom ekstraktu lišća *H. multifidus* Vis. (98,44 mg RUT g⁻¹), dok su ekstrakti podzemnih organa imali značajno niže količine ovog jedinjenja.

2.6.1.2. Saponozidi (triterpenski monodezmozidni i bidezmozidni, steroidni spirostanski i furostanski) i ekdisteroide

Triterpenski i steroidni saponozidi. Saponozidi su specifični sekundarni biljni metaboliti kompleksne strukture. Oni hidrolizuju na 1-3 lanca šećera (linearni ili račvasti oligosaharidi, ređe D-glukuronska ili D-galakturonska kiselina ili monosaharidi) i aglikonsku komponentu (sapogenin, sapogenol). Zavisno od hemijske prirode sapogenina, razlikuju se triterpenski i steroidni saponozidi koji se obično u drogama nalaze zajedno kao složene smeše saponozida. Triterpenski saponozidi imaju trideset ugljenikovih atoma, a osnovni skelet se sastoji od pet kondenzovanih heksaciklusa, dok steroidni saponozidi imaju dvadeset sedam C atoma i osnovni skelet od šest kondenzovanih prstenova. Monodezmozidni triterpenski i spirostanski steroidni saponozidi nastaju povezivanjem jednog ravnočlanog ili razgranatog šećernog niza sa sapogeninom etarskom (glukozidnom) vezom preko hidroksilne grupe na C₃, a kod bidezmozidnog tipa triterpenskih saponozida ostvarena je estarska veza drugog ravnočlanog ili razgranatog lanca šećera sa sapogeninom preko supstituentske karboksilne grupe na C₃, C₁₇ ili C₂₀. Kod bidezmozidnih steroidnih saponozida šećeri se ne vezuju estarski, ali drugi lanac šećera može biti vezan za hidroksilnu grupu na C₂₆ i

tada nastaju furostanski steroidni saponozidi sa sapogeninom u obliku pentacikličnog skeleta. Saponozidi su rastvoreni u ćelijskom soku i lokalizovani u vakuolama parenhimskih ćelija različitih biljnih organa u koncentraciji od 5-15%. To su amorfnja jedinjenja, neprijatnog, sapunastog, iritirajućeg ukusa, velike molekulske mase. Izrazito su polarni i rastvaraju se u vodi i razblaženim alkoholima gradeći koloidne rastvore, dok su u čistim alkoholima znatno slabije rastvorljivi. U etru, hloroformu, petroletru i drugim lipofilnim organskim rastvaračima su nerastvorljivi. Sapogenini su kristalne strukture i rastvorljivi su u nepolarnim organskim rastvaračima. Dokazivanje prisustva saponozida u drogama se zasniva na stvaranju obilne, stabilne pene prilikom mućkanja vodenog ekstrakta, izazivanju hemolize eritrocita *in vitro*, toksičnosti za životinje hladne krvi (kišne gliste, žabe, ribe) i na hemijskim reakcijama na tankom sloju silikagela u kombinaciji sa spektrofotometrijom. Vrednost droga koje sadrže ove metabolite ne određuje se na osnovu njihove količine, već na osnovu hemolitičkog delovanja ekstrakta i izražava se brojem saponozidnih jedinica po gramu droge. Smatra se da saponozidi deluju nadražajno na sluzokožu želuca i podstiču sekreciju u digestivnom traktu, da refleksnim mehanizmom pojačavaju bronhijalnu sekreciju i olakšavaju iskašljavanje, a da se mogu primeniti i kao diuretici i lokalna kontraceptivna sredstva. U *in vitro* uslovima je potvrđena njihova antimikrobna aktivnost (fitoaleksini-deluju na bakterije, gljivice i viruse), a neke droge koje ih sadrže koriste se kao antiinflamatorna i antiedematozna sredstva (Kovačević, 2004).

Steroidni saponozidi nisu široko rasprostranjeni u biljnom svetu i pronađeni su u monokotiledonim biljnim porodicama, dok je *Helleborus* L. jedan od samo nekoliko rodova dikotiledonih biljaka kod kojih je opisano njihovo prisustvo (Prieto i sar., 2006, 2007). Iz nekih vrsta roda *Helleborus* L. izolovane su aglikonske komponente steroidnih saponozida i utvrđena im je struktura, pri čemu se došlo do zaključka da pojedine vrste kukureka ne sadrže iste sapogenine (bar ne glavne sapogenine). Petričić i sar. (1969) su uspeli da izdvoje spirostanski steroidni sapogenin makrantogenin, glavni aglikon saponozida rizoma i korena *H. machrantus* Freyn. i da mu odrede strukturu (25/27-dehidro-sarsapogenin, odn. 25/27-dehidro-5 β -spirostan-3- β -ol). Iz metanolnog ekstrakta podzemnih organa *H. atrorubens* W. et K. Petričić i sar. (1970) su postupkom hromatografije na koloni silikagela i na koloni sefadeksa G 25 izolovali genin čiju strukturu nisu odredili, a Petričić (1974) ga naziva atrorubogenin. Tschesche i sar.

(1984) su istim postupkom iz metanolnog ekstrakta sirovih podzemnih organa *H. machrantus* Freyn. izolovali i odredili strukturu glavnog furostanol saponozida, niske hemolitičke aktivnosti, koga su nazvali makrantozid I, a zatim su kao produkte kisele hidrolize makrantozida I, dobili D-glukozu i makrantogenin. Isti saponozid izolovali su i Liedtke i sar. (1997) iz rizoma i korena *H. niger* ssp. *niger* L.

Živanov-Stakić i Mladenović (1970-a) su predložili postupak odvajanja triterpenskih saponozida od steroidnih, ekstrakcijom podzemnih organa *H. odorus* W. et K. 80%-im etanolom i taloženjem sa tetrahidrofuranom. Ovim postupkom dobija se smeša triterpenskih saponozida, dok se steroidni saponozidi nalaze samo u tragovima (tankoslojnom hromatografijom nađena su 2 steroidna saponozida). Živanov-Stakić i Mladenović (1970-b) su prvi upotreбили PABTSK reagens (smeša p-acetilaminobenzaldehidtiosemikarbazona i sumporne kiseline u acetonskom rastvoru) za identifikovanje nekih steroidnih supstancija i ugljenih hidrata na tankoslojnom hromatogramu i utvrdili da triterpenski saponozidi *H. odorus* W. et K. sa ovim reagensom ne daju bojenu reakciju, dok steroidni saponozidi i saponogenoli daju tamno ljubičastu boju koja fluorescira narandžasto. Helebrin, dezglukohelebrin i helebrigenin daju svetlo smeđu boju sa žutom fluorescencijom.

Saponozidi su površinski aktivna jedinjenja koja smanjuju napon na dodirnoj površini dve faze koje se ne mešaju. Oni se vezuju za sterole ćelijskih membrana i povećavaju njihovu permeabilnost, što se kod eritrocita manifestuje hemolizom i gubitkom hemoglobina. Kofler i Steidl (1934) su utvrdili da rizom i koren kukureka obrađeni holesterolom gube hemolitičku aktivnost, a obrađeni ksilolom deluju hemolitički, pri čemu hemolitički krug nastaje posle 3-5 minuta i zauzima malu zonu. U rizomu je najefikasnija sekundarna kora, dok epiderm, primarna kora, srž i sržni zruci sadrže malo materija koje deluju hemolitički. U korenu je najdelotvornija kora, epiderm deluje slabije, a provodni elementi nemaju hemolitičko delovanje. Petričić i sar. (1970) su osušene i usitnjene delove rizoma i korena *H. atrorubens* W. et K. oslobodili masti ekstrakcijom petroletrom i utvrdili da ekstrakt deoleiranih podzemnih organa deluje slabo hemolitički i sadrži samo 0,23 sap. jed./g droge. Ispitivanjem hemolitičkog efekta, Petričić i sar. (1971-b) su dokazali prisustvo saponozida u podzemnim delovima ispitivanih vrsta roda *Helleborus* L. (*H. macranthus* Freyn., *H. atrorubens* W. et K., *H. odorus* W. et K., *H. multifidus* Vis. i *H. istriacus* Schiffner) i utvrdili da hemolitičko

delovanje nije u korelaciji sa količinom saponozida, ako se radi o različitim saponozidima. Ono zavisi od njihove strukture i umanjuje se produžavanjem niza šećera, a u korelaciji je sa količinama istog saponozida. Saponozidi sa jednim ugljenohidratnim lancem (monodezmozidi) imaju visoku hemolitičku aktivnost, kiseli slabu, dok su neutralni saponozidi sa dva šećerna lanca (bidezmozidi) gotovo inaktivni. Hemoliza se uglavnom odvija u prvih 3 časa, a posle toga nema bitnijih promena. Uporednim ispitivanjem hemolitičkog delovanja saponozida ovi autori su utvrdili veliku razliku ne samo između pojedinih vrsta roda *Helleborus* L., već i u okviru iste vrste sa različitim staništa. Vodeni ekstrakti većine uzoraka podzemnih organa ispoljili su slabu hemolitičku aktivnost, koja se znatno povećala nakon izlaganja enzimskom sistemu sa β -glikozidazom (24h na 30 °C), ali je istovremeno utvrđeno da kod nekih vrsta sa značajnim hemolitičkim efektom dolazi do njegovog smanjenja nakon enzimske hidrolize. U nefermentisanom ekstraktu rizoma i korena *H. odoratus* W. et K. hemolitička aktivnost je u prvom uzorku izosila 3,81 sap. jed./g droge, a u drugom uzorku 1,76 sap. jed./g droge. Dodavanjem enzimskog sistema koji sadrži β -glikozidazu, hemoliza se višestruko povećala i u prvom uzorku je konstatovano 35,7 sap. jed./g droge, a u uzorku sa drugog staništa 13,16 sap. jed./g droge. Nakon fermentacije, hemolitička vrednost je bila povećana i kod *H. istriacus* Schiffner (sa 13,16 na 26,3 sap. jed./g droge) i *H. macranthus* Freyn. (60 puta: sa 0,47 na 28,2 sap. jed./g droge), a mogući uzrok je otcepljenje glukoze na C₂₆. Smanjenje hemolitičke aktivnosti u uzorcima *H. atrorubens* W. et K. (sa 54,2 i 28,35 na 45,1 i 14, 1 sap. jed./g droge) i *H. multifidus* Vis. (sa 15,24 na 9,55 sap. jed./g droge) nastaje zbog značajnih promena na šećernom lancu na C₃. Bogdan i sar. (1990-b) su ispitivali hemolitičko delovanje saponozida rizoma i korena *H. purpurascens* L. na eritrocite ovce i nakon više proba sa različitim koncentracijama (4%, 8%, 10%, 20%, 30% i 40%) utvrdili da potpunu hemolizu eritrocita izazivaju saponozidi u koncentraciji 40%. Isti autori su dokazali, da mlad rizom sa korenčićima ove biljke ubran u leto i ispitivan u naredna dva meseca, sadrži 0,2% saponozida, dok stari podzemni organi uzeti u jesen i ispitivani nakon 2 godine, sadrže 0,08% saponozida. Dobijene vrednosti su relativno male u poređenju sa sadržajem hemolitički aktivnih saponozida u pojedinim biljkama sa ekspektorantnim efektom (*Primula officinalis* preko 10%, *Gypsophila paniculata* preko 18% ili *Saponaria officinalis* preko 8%). Maksimović (1998) je utvrdio da saponozidni kompleks 80% etanolnog ekstrakta

H. serbicus Adam. poseduje slabo hemolitičko delovanje (10,64 sap. jed./g droge), što ukazuje na sadržaj steroidnih saponozida bidezmozidnog tipa, dok su triterpenski saponozidi prisutni samo u tragovima.

Aglikon spirost-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -triol su izolovali Linde i sar. (1971) iz ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. i *H. niger* L. Wissner i Kating (1974-b) su izolovali dva saponozida iz većeg broja vrsta kukureka prikupljenih sa prirodnih biotopa širom Evrope i male Azije (*H. odorus* W. et K., *H. multifidus* Vis., *H. dumetorium* W. et K., *H. dumetorium* ssp. *atrorubens* (W. et K.) Merxm. et Podl., *H. cyclophyllus* Boiss., *H. bocconeii* ssp. *siculus* (Schiffner) Merxm. et Podl. i *H. orientalis* Lam.), a zatim izvršili njihovu enzimsku razgradnju pomoću celulaze A i dobili isti aglikon. Ovi autori su i u preostalim vrstama roda *Helleborus* L. koje su ispitivali, identifikovali još jedan (*H. niger* L., *H. foetidus* L., *H. purpurascens* L.) ili dva saponozida (*H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *occidentalis* (Reuter) Schiffner), ali ni jedan od ova četiri saponozida nije pronađen kod *H. lividus* ssp. *corsicus* (Willd.) Tutin i *H. vesicarius* Auch. Colombo i sar. (1990) su isti, prethodno navedeni aglikon izolovali iz etil acetatnog ekstrakta podzemnih organa *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *viridis* i *H. odorus* W. et K. ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl.

Iz podzemnih organa *H. multifidus* Vis. subsp. *serbicus* Adam. izolovan je veći broj steroidnih sapogenina i određena im je struktura: Kálmán i sar. (1985) su hromatografijom na koloni sa silikagelom izolovali polimorf A spirosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -triol monohidrat (C₂₇H₄₀O₅.H₂O), a Argay i sar. (1998) su determinisali kristalnu strukturu polimorfa B 1 β ,3 β ,11 α -trihidroksi-spirosta-5,25(27)-dien monohidrata (C₂₇H₄₂O₆), dok su godinu dana kasnije Fábíán i sar. (1999) ukazali da polimorfizam ovog sapogenin monohidrata nastaje usled različitih rotacija molekula vode. Ribár i sar. (1986) su hromatografijom na koloni i preparativnom tankoslojnom hromatografijom na silikagelu izolovali spirosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -diol (C₂₇H₄₀O₄), veoma sličan prethodnom. Vladimirov i sar. (1991) su izdvojili 3 β ,11 α -dihidroksispirosta-5,25(27)-dien (C₂₇H₄₀O₄) i odredili strukturu hemijskim reakcijama i spektroskopskom analizom. Watanabe i sar. (2003) su iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam. hromatografski razdvojili (hromatografijom na koloni uz silikagel kao adsorbens i tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom-HPLC analizom), a zatim i vizuelizacijom hromatograma spektroskopskom metodom (uključujući 2D

NMR) i kiselom hidrolizom determinisali strukturu pet novih spirostanol saponozida, a dve godine kasnije (2005) ovi autori su dokazali i dva nova bidezmozidna furostanol saponozida i dva nova furospirostanol saponozida. Istim postupkom, Mimaki i sar. (2003) su iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam. izolovali i ispitivali citotoksično delovanje dva nova bisdezmozidna i jednog novog tridezmozidnog spirostanol saponozida (helebosaponin A, B i C). Akin i Anil (2007) su iz korena *H. orientalis* Lam. i Rosselli i sar. (2009) iz metanolnog ekstrakta *H. bocconeii* Ten. ssp. *intermedius* izolovali furostanol saponozide heleborozid A i heleborozid B, a poslednja grupa autora i jedan furospirostanol saponozid.

Iz metanolnog ekstrakta podzemnih delova *H. caucasicus* A. Br., Bassarello i sar. (2008) su izolovali četiri nova polihidroksilna i polinezasićena furostanol saponozida koje su nazvali kavkazoidi A, B, C i D, zajedno sa nekoliko poznatih jedinjenja (četiri spirostanol derivata, furostanol glikozidom i furospirostanol glikozidom). Mimaki i sar. (2010) su iz glikozid obogaćene frakcije pripremljene iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam., izolovali i na osnovu opsežne spektroskopske analize, uključujući 2D NMR i rezultate hidrolitičkog cepanja, determinisali strukturu osam novih furostanol glikozida, zajedno sa dva poznata. Ovi autori su opisali i citotoksičnu aktivnost izolovanih jedinjenja prema HSC-2 skvamoznim (planocelularnim) ćelijama karcinoma ljudi.

Iz lišća *H. viridis* L. Braca i sar. (2004) i Prieto i sar. (2007) su izdvojili dva nova furostanol saponozida čija je struktura determinisana spektroskopskom analizom uključujući 2D NMR i masenu spektrometriju. Prieto i sar. (2006, 2007) su istim postupkom iz lišća *H. foetidus* L. izolovali i utvrdili strukturu jednog poznatog furostanol saponozida (sadrži C-22 hidroksi grupu) i njegove C-22 metoksil forme. U potrazi za prirodnim jedinjenjima koja inhibiraju proizvodnju metana u preživara, Stochmal i sar. (2010) su iz etanolnog ekstrakta lišća *H. viridis* L. izolovali i ¹H NMR spektralnom analizom determinisali tri nova furostanol saponozida. Muzashvili i sar. (2011) su iz metanolnog ekstrakta lišća *H. caucasicus* L. izolovali i pomoću 1D i 2D NMR uz ESIMSⁿ analize utvrdili strukturu devet furostanol glikozida i nazvali ih kavkazoidi E-M, zajedno sa 11 poznatih jedinjenja, uključujući 9 furostanol glikozida i po jedan bufadienolid (helebrigenin 3-O-β-D-glukopiranozid) i ekdisteroid (20-hidroksiekdison).

Ekdisteroidi. Fitoekdisteroidi ispoljavaju brojna lekovita svojstva kod sisara, ali hormonski efekti su dokazani samo kod zglavkara (Hikino i Takemoto, 1972). Njihova struktura je donekle slična strukturi steroidnih hormona kičmenjaka, uz postojanje određenih razlika između ove dve steroidne grupe. Terapijski efekti biljnih ekdisteroida kod sisara, uključujući čoveka, slični su efektima steroidnih hormona. Mogu da imaju anaboličku, hepatoprotektivnu, hipoglikemijsku, antioksidantnu i adaptogenu aktivnost (povećanje otpornosti prema stresu i ublažavanje umora) (Báthori i sar., 2008), a deluju i imunomodulatorno (aktiviraju prezentaciju CD2 markera na T limfocitima (Jesse i sar., 2009). Fitoekdisteroidi su detektovani u 5-6% svih biljnih vrsta, ponekad u vrlo visokim koncentracijama (Dinan i sar., 2001), a Hardman i Benjamin (1976) su ih utvrdili i opisali kod 11 vrsta roda *Helleborus* L. Primenom radioimuno apsorpcije (RIA) i biotestova, Dinan (2001) i Dinan i sar. (2002) su utvrdili da u 16 ispitivanih rodova familije *Ranunculaceae* najveći broj biljaka ne sadrži ova jedinjenja, mali broj poseduje vrlo niske nivoe, dok su u rodu *Helleborus* L. ekdisteroidi prisutni u značajnim količinama (najviše u *H. croaticus* Mart. i *H. torquatus* Archer-Hind). Sve vrste kukureka imaju genetski kapacitet za biosintezu ekdisteroida, ali nemaju istu sposobnost akumulacije. Razlike u prisustvu i profilu fitoekdisteroida su od značaja za hemotaksonomsku vrednost vrsta *Helleborus* L. Subrod *Helleborus* obuhvata vrste sa pretežno niskim nivoima ekdisteroida, ali prisustvo ekdisteroid negativnih vrsta (*H. vesicarius* Aucher i *H. atrorubens* W. et K.) u subrodu *Helleborastum*, ne čini ovu podelu oštrom. Morfološka grupa *Caulescentes* uključuje većinu ekdisteroid deficitarnih vrsta, dok *Scapigeri* vrste akumuliraju ova jedinjenja (sa izuzetkom *H. atrorubens* W. et K.). Raspodela ekdisteroida u *Helleborus* spp. je izgleda paralelna sa distribucijom bufadienolida (Wissner i Kating, 1971, 1974-b,c), tako da vrste visoko toksične za sisare sadrže i visoke nivoe ekdisteroida. Hardman i Benjamin (1980) su preparativnom tankoslojnom hromatografijom na poliamidnom gelu, iz metanolnog ekstrakta cele biljke *H. cyclophyllus* Boiss. izdvojili dva ekdisteroida: 20-hidroksiekdison odn. 2 β ,3 β ,14 α ,20R,22R,25-heksahidroksi-5 β -holesten-7-en-6-on (ekdisteron) i 5 β ,20-dihidroekdison (polipodin B) u obliku njihovih trimetilsililimidazolnih derivata i izvršili determinaciju pomoću masene spektrometrije. Iz metanolnog ekstrakta rizoma i semena *H. odorus* W. et K. i *H. purpurascens* W. et K. Kißmer i Wichtl (1987) su izolovali četiri ekdisteroida: β -ekdison, 5- α -hidroksiekdison, 5- α -hidroksiekdison 3- β -D-glukozid

i 5- β -hidroksiekdison 3- β -D-glukozid. Colombo i sar. (1990) su hromatografijom i spektroskopskom analizom etil acetatnog ekstrakta podzemnih organa *H. viridis* L., *H. viridis* ssp. *viridis* i *H. odorus* W. et K. ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. izolovali 5 β -hidroksiekdisteron i 2 β ,3 β ,14 α ,20 β ,22,25-heksahidroksi-7-holesten-6-on (β -ekdison) koji su biološki aktivni i ispoljavaju terapijski efekat na pacijente sa neuralgijama (Hikino i Takemoto, 1972). Colombo i Tome (1993) su HPLC detekcijom dokazali da količina ekdisteroida β -ekdisona i 5 β -hidroksiekdisterona u metanolnim ekstraktima svežih podzemnih organa *H. odorus* ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. prikupljenih sa različitih staništa, pokazuje sezonsko variranje. Sadržaj ekdisteroida je najviši (čak preko 2% suve materije) u toku rasta i razvoja biljke (letnji period), niži je za vreme cvetanja (proleće), u nekim slučajevima se smanjuje na polovinu u fazi mirovanja (jesen-zima), pri čemu je utvrđena veća količina 5 β -hidroksiekdisterona nego β -ekdisona u svim slučajevima. Biljke koje rastu na mestima obraslim kratkom travom, na nadmorskoj visini od 1000 i 2500 m, imaju tokom celog biološkog ciklusa za 30-40% veći sadržaj ovih metabolita nego biljke čija su staništa šume hrasta i kestena, na 500, 1000 i 1300 m nadmorske visine, što ukazuje na značajan uticaj različitih ekoloških uslova. Ovi autori ističu da utvrđeni visoki nivoi fitoekdisteroida imaju insekticidno delovanje, pa se mogu koristiti kao prirodni insekticidi u kontroli populacija insekata.

Iz rizoma i korena *H. niger* ssp. *niger* Liedtke i sar. (1997) su preparativnom HPLC analizom izdvojili β -ekdison i ustanovili da su dvadesetak godina ranije Wissner i Kating (1974-b) iz navedene biljne vrste izolovali isti, do tada nepoznati steroid, kome su dali naziv supstanca E. Meng i sar. (2001) su HPLC analizom metanolnog ekstrakta semena *H. torquatus* Archer-Hind utvrdili prisustvo 20-hidroksiekdisona i 20-hidroksiekdison 3-O- β -D-glukozida i ukazali na analogiju između fitoekdisteroida i steroidnih hormona beskičmenjaka (insekata i ljuskara). Ovo otkriće je značajno zbog toga što ova jedinjenja mogu dovesti do inhibicije uzimanja hrane i poremećaja hormonskog balansa u insekata i tako delovati insekticidno. Iz podzemnih organa *H. caucasicus* A. Br., Muzashvili i sar. (2006-a, 2011) su takođe izolovali značajnu količinu 20-hidroksiekdisona (ekdisterona) i utvrdili da ima širok spektar terapijske aktivnosti. Prisustvo istog ekdisterona (20-hidroksi- β -ekdison-3-O- β -D-glikozida) su dokazali Akin i Anil (2007) u korenu *H. orientalis* Lam., Bassarello i sar. (2008) u metanolnom ekstraktu podzemnih delova *H. caucasicus* A. Br., Puglisi i sar. (2009) u

metanolnom ekstraktu korena *H. bocconeii* Ten. ssp. *siculus* i Rosselli i sar. (2009) u metanolnom ekstraktu korena *H. bocconeii* Ten. ssp. *intermedius*. Rosselli i sar. (2009) su izdvojili i 5 β -hidroksiekdisteron (polipodin B) i utvrdili njegovu značajnu citotoksičnu aktivnost protiv C6 malignih glioma ćelija kod pacova, koje su vrlo rezistentne prema hemoterapeuticima.

2.6.1.3. Alkaloidi

Alkaloidi su specifični biljni sastojci koji se retko nalaze u golosemenicama (*Gymnospermae* – *Cephalotaxus*), ali su zastupljeni u 10-15% skrivenosemenica (*Angiospermae*), pri čemu ih više proizvode dikotiledone nego monokotiledone biljke. Izolovani su i iz nekih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*), gljivica (*Claviceps*) i gljiva (*Psilocybe*), mahovina, paprati, insekata, mekušaca, vodozemaca i sisara. Alkaloidi su sekundarni, tercijerni ili kvaternerni amini kompleksne strukture u kojoj dominira molekul heterocikličnog azota koji vodi poreklo od odgovarajućih aminokiselina (ornitina, lizina, fenilalanina, tirozina, triptofana ili antranilne kiseline). Sintetišu se u delovima korena koji rastu ili u ćelijama mlečnih cevi, a potom se transportuju i akumuliraju u parenhimskim ćelijama perifernih delova tkiva ili specijalizovanim ćelijama (sekretorne ćelije i mlečni sok). Pojedini organi biljke sadrže različitu količinu alkaloida koja je genetski uslovljena, a zavisi i od ontogenetskog razvoja i ekoloških faktora. Većina alkaloida je bezbojna, gorkog ukusa, optički aktivna, amorfne ili kristalne strukture. Ova jedinjenja ispoljavaju izrazitu i specifičnu fiziološku aktivnost u organizmu ljudi i životinja, a mogu da deluju na CNS (depresivno ili stimulatивно), autonomni nervni sistem (simpatomimetici, simpatolitici, parasimpatomimetici, antiholinergici, blokatori ganglija), anestetizirajuće, citotoksično, antiaritmijski, antibakterijski, amebicidno i dr. Primena većih doza dovodi do akutne ili hronične intoksikacije (Kovačević, 2004). Struktura alkaloida koje sadrže pojedine vrste roda *Helleborus* L., kao ni njihove hemijske osobine nisu dovoljno poznati.

Keller i Schöbel (1928) su metodama po Stollu i Stas-Ottou utvrdili da *H. niger* L. ne sadrži alkaloida, a iz rizoma i korena *H. viridis* L. izolovali su smešu azotnih materija u količini 0,2%, koje su identifikovali kao alkaloida steroidnog tipa: celiamin (C₂₁H₃₅NO₂, baza X₄), spirintilamin (C₂₈H₄₅NO₄, baza Z), spirintilin (C₂₅H₄₁NO₃, baza

M), i alkaloid "V". Čučković (1939) je pokušala da dokaže alkaloidne u podzemnim organima *H. atrorubens* W. et K. uobičajenom metodom po Stas-Ottou, ali kako alkaloidni reagensi nisu dali pozitivne reakcije, a Lassaigneova proba je bila negativna, zaključila je da ova vrsta kukureka ne sadrži alkaloidne. Dilparić-Knežević (1977) je pomoću tankoslojne hromatografije sa silikagelom G prema Stahlu sa sistemom rastvora hloroform–metanol (95:5) i kolorimetrijske reakcije alkaloidnih supstanci sa Dragendorffovim reagensom, utvrdila da su alkaloidi prisutni u *H. croaticus* Mart. i *H. atrorubens* W. et K., samo u tragovima u podzemnim organima *H. odoratus* W. et K., *H. istriacus* Schiffn., *H. multifidus* Vis. i *H. macranthus* Freyn., a nisu prisutni u *H. niger* L. Slavík i sar. (1987) ističu da rod *Helleborus* L. praktično ne sadrži alkaloidne i da prisustvo navedenih alkaloida, osim kod *H. viridis* L., nije potvrđeno kod ostalih biljaka ovog roda. Tankoslojnom hromatografijom na silikagelu G (Merck) ovi autori su iz podzemnih i nadzemnih delova različitih vrsta kukureka izolovali alkaloidne koji nisu karakteristični samo za familiju *Ranunculaceae*: magnoflorin (kvaternarni aporfinski alkaloid) iz *H. viridis* L. (veća količina utvrđena u rizomu i korenu) i korituberin (tercijerni N-demetil derivat magnoflorina) iz *H. foetidus* L., *H. viridis* L. i *H. niger* L. (samo u tragovima). Maksimović (1998) je u prečišćenom etarsko-amonijačnom ekstraktu *H. serbici* Adam. dokazao prisustvo alkaloida kvalitativnom analizom (opštim, taložnim reagensima) i tankoslojnom hromatografijom, a zatim je gravimetrijskim postupkom odredio i njihovu količinu (0,048%).

2.6.2. Primarni metaboliti u vrstama roda *Helleborus* L.

Veći broj autora je pored farmakološki aktivnih supstanci iz podzemnih organa kukureka, ispitivao i sadržaj primarnih metabolita. Oni nastaju procesom fotosinteze i transformacijom i polimerizacijom nastale glukoze do ostalih ugljenih hidrata, kao i njene glukolize i formiranja masnih kiselina i lipida, aminokiselina i peptida.

2.6.2.1. Ugljeni hidrati (glucidi)

Ugljeni hidrati su univerzalni sastojci svih živih organizama i predstavljaju jedan od izvora energije za ćelije. U biljnom tkivu imaju gradivnu ulogu, sastavni su delovi

metabolita i prekursori sekundarnih metabolita (Kovačević, 2004). Stefanović (1962) je koristeći biohemijsku Bourquelotovu metodu enzimske hidrolize heterozida, izvršila hidrolizu vodenog rastvora ekstrakta droge, dobijenog alkoholnom ekstrakcijom prethodno stabilizovanog rizoma i korena *H. odorus* W. et K. i *H. atrorubens* W. et K. Za hidrolizu su korišćeni enzimi: invertin (deluje na α -glukozide), emulzin (deluje na β -glukozide), strofantobioza i enzimski preparati dobijeni iz lišća i iz podzemnih organa kukureka. Upoređivanjem optičke aktivnosti hidrolizata i količine reduktivnih materija pre i posle hidrolize i izračunavanjem enzimolitičkog redukcionog indeksa, konstatovano je da se u podzemnim organima *H. odorus* W. et K. pored saharoze, nalaze i rafinoza i stahioza ili jedna od njih, a u *H. atrorubens* W. et K. saharoza. Sa strofantobiozom i enzimskim preparatom same biljke hidroliza je dala negativne rezultate. Stefanović i Mladenović (1963) su iz 96% alkoholnog ekstrakta podzemnih organa kukureka, metodom hromatografije na stubu aluminijumoksida (Merck) izolovali saharozu, i time potvrdili njeno prisustvo u podzemnim organima *H. odorus* W. et K. (u maloj količini) i *H. atrorubens* W. et K. (3%), koje je prethodno bilo samo konstatovano biohemijском metodom. Zatim su hromatografijom na hartiji kod *H. odorus* W. et K. identifikovali: rafinozu, saharozu, galaktozu, glukozu, fruktozu i ramnozu, a kod *H. atrorubens* W. et K. pored navedenih, još i liksozu. Baytop i Malkoc (1965) navode da se u infuzu i tinkturi podzemnih organa *H. orientalis* Lam. nalaze glukozu, fruktozu i saharoza.

Živanov-Stakić i Mladenović (1970-b) su identifikovali ugljene hidrate iz 80% etanolnog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. na tankoslojnom hromatogramu sa silikagelom G (Merck) kao adsorbensom, pomoću novog PABTSK reagensa: glukozu, fruktozu, galaktozu, saharoza i rafinozu su dale svetlo ljubičaste mrlje, ramnozu ružičasto smeđu, arabinozu i ksilozu plavozelene. Godinu dana kasnije ovi autori (1971-a) su ispitivali isti ekstrakt tankoslojnom hromatografijom na aluminijumoksidu D₅ (Fluka) i silikagelu G (Merck), ali pomoću reagensa difenilamin fosforne kiseline, pri čemu su razdvojili i identifikovali šećere: rafinozu, maltozu, saharozu, glukozu i fruktozu, kao i helebrin i dva steroidna saponozida. Maksimović (1998) je pomoću Felingovih rastvora dokazao prisustvo slobodnih redukujućih ugljenih hidrata glukoze, fruktoze i saharoze u 80% etanolnom ekstraktu *H. serbicus* Adam. i

identifikovao ih primenom hromatografije na tankom sloju aluminijum-oksida i silikagela.

2.6.2.2. Lipidne materije (ukupne masne kiseline i neosapunjive masne materije)

Masne materije predstavljaju energetska rezervu biljnih ćelija, a njihova količina nije odlika vrste, već zavisi od uslova sredine (temperature, vlage, mineralnih materija tla) i stadijuma razvoja biljke. Masno ulje podzemnih organa kukureka najvećim delom čine uobičajene i rasprostranjene klase lipidnih materija: fosfolipidi, mono-, di- i trigliceridi, slobodne masne kiseline i neosapunjivi deo masnih materija (steroli, esterifikovani derivati sterola i ugljovodonici u količini od 0,03-1,5%). One se u korenu i rizomu akumuliraju u velikim količinama (14-18%), što je retka pojava u biljnom svetu. U masnim uljima podzemnih organa i semena vrsta roda *Helleborus* L. najzastupljenije su frakcije triglicerida i slobodnih masnih kiselina, pri čemu je dominacija nezasićenih masnih kiselina važna odlika biosinteze lipida kod biljaka ovog roda. Čučković (1939) je izvršila kvalitativnu i kvantitativnu analizu sadržaja masnih materija u podzemnim organima *H. atrorubens* W. et K., i pri tom utvrdila da se njihov sadržaj u rizomu i korenu kvalitativno ne razlikuje, ali da je rizom (11,12%) bogatiji masnim sastojcima od korena (8,08%). U masnom, sušivom ulju žuto-crvene boje, dokazano je prisustvo glicerida čvrstih zasićenih masnih kiselina (stearinske i palmitinske kiseline), kao i znatna količina tečnih nezasićenih masnih kiselina sa jednom ili više dvostrukih veza. Pozitivna elaidinska reakcija ukazala je na prisustvo uljne kiseline, a pozitivna heksabromidska proba i visok jodni broj na sadržaj lanenouljne kiseline i njenih estara. Stefanović i Mladenović (1960) su iz neosapunjivog dela masnih materija dobijenih iz rizoma i korena *H. odorus* W. et K. i *H. atrorubens* W. et K. izolovali hemijski jedinstvenu, kristalnu supstancu β -sitosterol u količini oko 1,7% i dobili acetilne i bromacetilne derivate i digitonid ovog fitosterola. Petričić i sar. (1971-b) su postupkom kontinuirane ekstrakcije po Soxhletu, pomoću petroletra, deoleirali podzemne organe više vrsta roda *Helleborus* L. i utvrdili velike razlike u sadržaju masti ne samo između uzoraka različitih vrsta, već i u okviru iste vrste sa različitih staništa: *H. multifidus* Vis. 15,24%, *H. istriacus* Schiffner 12,48%, *H. odorus* W. et K. 5,4-12%, *H. macranthus* Freyn. 11% i *H. atrorubens* W. et K. 6,6-10%.

Živanov-Stakić i Mladenović (1971-b) su ispitivali sadržaj masnih materija rizoma i korena *H. odorus* W. et K. i dobili veću količinu ulja iz korena, nego iz rizoma, za svaki mesec u toku vegetacionog perioda. Najmanja količina masnog ulja u oba podzemna organa je u decembru, raste u januaru, februaru i martu, najveću vrednost dostiže u aprilu kad se formira lišće, opada u junu kad plod sazreva, a od avgusta do novembra se javlja blagi porast i u decembru ponovo pad uz povećanje sadržaja nezasićenih masnih kiselina. Izolovanom ulju su odredili indeks refrakcije, kiselinski, saponifikacioni, estarski i jodni broj i dobili odnos slobodnih, esterifikovanih i nezasićenih masnih kiselina u toku vegetacionog perioda. Gravimetrijskim postupkom je određen sadržaj neosapunjivih materija ulja korena, pri čemu je najniža vrednost utvrđena u decembru (1,1%), a najveća u aprilu (5,6%), dok je hromatografijom na tankom sloju utvrđen odnos β -sitosterola, drugih slobodnih i esterifikovanih fitosterola neosapunjivog dela. Serebryakov (1982) i Anguladze i sar. (1983) su ustanovili da lipide rizoma i korena *H. abchasicus* A. Br. i *H. caucasicus* A. Br. karakteriše visok sadržaj slobodnih masnih kiselina (oko 70%) u periodu cvetanja, pri čemu je dominantna linoleinska kiselina (82,6%), a dokazali su i prisustvo β -sitosterola. Spontana oksidacija lipida iz podzemnih organa *H. caucasicus* A. Br. odvija se u pravcu stvaranja keto kiselina i slobodnih masnih kiselina (Dalakishvili, 1983). Colombo i sar. (1991) su ispitivali varijacije u sadržaju masnih materija i masnih kiselina u podzemnim organima vrsta roda *Helleborus* L. za vreme ontogenetskog razvoja tokom dve godine. Oni su, za razliku od prethodno navedenih autora, utvrdili da je količina masnih materija kod *H. odorus* W. et K. i *H. viridis* L. najveća u periodu mirovanja (od oktobra do februara) koji karakteriše relativno visoka metabolička aktivnost i mali rast, a najmanja u proleće kada biljka koristi lipidne rezerve za rast. Kod *H. niger* L. visoke temperature imaju pozitivan efekat na sintezu i akumulaciju lipida, tako da je njihova najveća količina u periodu rasta i razvoja (maksimalna u julu). Sadržaj masnih materija tokom celog vegetacionog perioda je bio veći u rizomu kod *H. odorus* W. et K. i *H. viridis* L., a kod *H. niger* L. u korenu. *H. foetidus* L. nema rizom, već lignificiran koren sa niskim sadržajem masnih materija, koji ne pokazuje promenljivost u toku godine. Kod svih vrsta je otkriveno prisustvo zasićenih (palmitinske, miristinske, stearinske) i nezasićenih (linoleinske, oleinske, linolne, palmitoleinske) masnih kiselina, pri čemu su najviše zastupljene palmitinska i linoleinska kiselina. U korenu *H. odorus*

W. et K. i *H. viridis* L. palmitinska kiselina je dominantna masna kiselina tokom celog biološkog ciklusa (oko 40%), a posebno za vreme mirovanja (oko 75% u decembru). Rizom ovih biljaka sadrži najveću količinu linoleinske kiseline (oko 60%) u periodu rasta, a palmitinske kiseline u toku mirovanja (oko 60% u decembru). Odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, u neutralnim mastima korena je skoro isti tokom različitih perioda biološkog razvoja, a u rizomu je u korist nezasićenih, osim u toku zime kada je zastupljenost zasićenih masnih kiselina u podzemnim organima čak 70-85%. U proleće, kada je biljkama potrebno više energije, zasićeni spojevi se pretvaraju u nezasićene koji su mnogo reaktivniji. Kod *H. niger* L. dominantna masna kiselina u korenu je palmitinska, a u rizomu linoleinska kiselina. U korenu ove biljke tokom cele godine, osim u rano proleće, prevladavaju zasićene, a u rizomu su uvek dominantne nezasićene masne kiseline, posebno u toku leta. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina u korenu *H. foetidus* L. je najviši u zimskom periodu i smanjuje se u proleće i leto, dok je količina zasićenih masnih kiselina maksimalna u toku leta.

Argay i sar. (1996) su iz neosapunjivih masnih materija podzemnih organa *H. multifidus* ssp. *serbicus* (Adamović) Merxm. et Podl. izolovali i kristalografski odredili strukturu stigmast-5-en-3 β -ol monohidrata (C₂₉H₅₂O₂). Kontinuiranom ekstrakcijom usitnjene droge *Hellebori (serbici) radix et rhizoma* petroletrom, Maksimović (1998) je dobio bistro, masno ulje žutomrke boje, otužnog mirisa i bljutavo gorkog ukusa u količini od 10,95%. Ispitivano ulje karakteriše sadržaj 89,9358% ukupnih masnih kiselina (visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina: 83% i 88,1% frakcije ukupnih odn. slobodnih masnih kiselina) i 1,6679% neosapunjivih materija (26,59% β -sitosterola odn. 0,44% ukupnog masnog ulja, 30,48% ugljovodonika odn. 0,50% ukupnih lipida: alkana (28,609%), alkena (20,843%), diena (3,264%) i 42,93% neidentifikovane komponente).

2.6.2.3. Aminokiseline i peptidi

Aminokiseline se u ćelijama i tkivima biljaka nalaze slobodne ili grade oligopeptide i proteine, a ulaze i u sastav nekih grupa sekundarnih metabolita (alkaloida, sumpornih i cijanogenih heterozida) (Kovačević, 2004). Metodom dvodimenzionalne hromatografije na hartiji, Mladenović i Stefanović (1963) su iz alkoholnog ekstrakta podzemnih delova *H. odorus* W. et K. identifikovali i razdvojili aminokiseline:

asparagin, asparaginsku i glutaminsku kiselinu, serin, lizin, arginin, glicin, histidin, treonin, alanin, prolin, metionin, valin, leucin i izoleucin, dok u ekstraktu *H. atrorubens* W. et K. nisu otkrili aminokiselinu serin.

Milbradt i sar. (2003) su iz rizoma *H. purpurascens* W. et K. izolovali višestruki cistin peptid heletionin D, koji se potencijalno može koristiti u terapiji tumora. Oni su utvrdili da se antimikrobna aktivnost i citotoksični efekat heletionina D, kao i tionina ranije izolovanih iz drugih biljaka (Grossarth-Maticek i sar., 2001), zasniva na njihovom vezivanju za fosfolipide ćelijskih membrana i izazivanju lize i smrti ćelija. Zahvaljujući ovakvom delovanju, omogućeno je stvaranje transgenih biljaka koje sadrže tionin gene odgovorne za povećanje otpornosti prema patogenim mikroorganizmima, gljivicama i kvascima, dok se sa druge strane, kukurek može primeniti kao podrška antitumorskoj terapiji.

Pěňčík i sar. (2009) su razvili visoko specifični analitički protokol za izolaciju i kvantifikaciju indol-3-sirćetne kiseline (IAA), koja je važan fitohormon auksin, i njenih aminokiselinskih konjugata koji imaju funkciju skladištenja ili prethode degradaciji prekomerne IAA. Kombinacijom anti-IAA imunoafinitetne ekstrakcije sa osetljivim i selektivnim LC-MS/MS analizama, uz primenu internih standarda, u maloj količini nezrelog semena (oko 30 mg) *H. niger* L. pronađeni su fiziološki nivoi ovih jedinjenja u rasponu od 7,5 nmol/g IAA do 0,44 pmol/g IAA konjugovane sa alaninom. Nivo IAA i njenih konjugata sa Asp, Glu i Leu u perikarpu je bio značajno niži od onih u semenu, dok su konjugati sa Ala, Gly, Phe i Val bili ispod granica detekcije.

Tabelarni prikaz najvažnijih sastojaka kukureka dat je u Prilozima 8-12.

2.7. MEDICINSKO-ISTORIJSKO GLEDIŠTE PRIMENE KUKUREKA

Prirodne lekovite sirovine se mogu podeliti i na oficinalne, koje su zahvaljujući delotvornim sastojcima, priznate u veterinarskoj medicini, farmakopeji i naučnoj medicini i neoficinalne koje nisu propisane državnim farmakopejama, ali se koriste u narodnoj medicini i homeopatiji (Kišgeci, 2002). Sredinom XIX veka iz podzemnih organa *H. niger* L., *H. viridis* L. i *H. foetidus* L. je izolovan heleborein, koji je ispoljio kardiotonično delovanje slično delovanju digitalisa, pa je biljna droga *Hellebori radix* (koren) bila zastupljena u velikom broju farmakopeja tog doba kao kardiotonično

sredstvo (*Extractum Hellebori viridis* i *Tinctura Hellebori viridis*), a danas najčešće ima lokalni značaj. Od svih vrsta roda *Helleborus* L., samo je biljna droga *Helleborus viridis radix* (koren) obrađena u *Materia medica* prve srpske farmakopeje Ph. Serb. I iz 1881. god., ali se ne nalazi u ostalim srpskim i jugoslovenskim farmakopejama (Ph. Serb. II iz 1908. god. i 1926. god., Ph. Jug. I, II, III i IV iz 1933. god., 1951. god., 1972. god. i 1984. god. (Sarić, 1989), kao ni u Ph. Jug. V iz 2000. god).

Biljnu drogu *Helleborus* sp. predstavlja osušen rizom koji je sa donje i bočnih strana gusto obrastao tankim korenjem (*Hellebori rhizoma et radix*). Kod odrasle biljke, rizom je horizontalan, čvrst (teško se reže), kvrgav, tamno smeđe boje, 5-10 cm dugačak i 1-1,5 cm širok, a korenje je žiličasto, krto, tamno smeđe boje, dužine 10-15 cm, u bazalnom delu debljine 3-4 mm, a u donjem delu obraslo tankim, vlaknastim korenčićima. Rizom sa korenjem se vadi u rano proleće ili u jesen, dobro ispere tekućom hladnom vodom, očisti od trulih delova i iseče po dužini na manje komade. Zatim se brzo suši u vakuum sušnici nad slojem kalcijum hlorida na temperaturi od 45°C ili prirodno, na promajnom mestu, u sloju debljine 3-5 cm. Sveže iskopani podzemni organi imaju slab, sladunjav miris, koji se sušenjem intenzivira. Osušena droga je tamno mrke do crne boje, lako je lomljiva, oštrog mirisa, gorkog ljutog i neprijatnog ukusa, a prilikom drobljenja ili mlevenja njena prašina izaziva kijanje (Kišgeci, 2002). Duže udisanje ove prašine može dovesti do iritacije i zapaljenja organa za disanje i očiju, usled prisustva saponozida koji jako draže sluzokožu disajnih organa i očiju, izazivaju kašalj i kijanje (sternutatorno dejstvo), crvenilo i suzenje očiju (Tucakov 1996; Lukić 1993). Jaka trovanja se manifestuju kompleksnim digestivnim (jak nadražaj sluzokože usta i grla, pojačana salivacija, hematemesi, dijareja, crevne kolike), vizuelnim (konjuktivitis, dilatacija zenica), neurološkim (omamljenost, neosetljivost, delirijum, konvulzije, paraliza mišića, pareza ekstremiteta) i kardiološkim (poremećaj srčanog rada, bradikardija, produžen P-R interval, fibrilacija komora, asistolija, spor i nepravilan puls) simptomima, a može nastupiti i smrtni ishod usled respiratornog kolapsa i asfiksije (Lukić, 1993; Frohne i Pfänder, 2005). Lečenje se mora brzo sprovesti, a sastoji se u pražnjenju gastrointestinalnog trakta (ispiranje želuca, natrijum sulfat), davanju aktivnog uglja (adsorbens koji za sebe vezuje neresorbovane sastojke unete droge) i sprovođenju simptomatskih mera (otklanjanju spazma i.v. aplikovanjem dijazepamama ili ksilokaina, davanju elektrolita, sprečavanju acidoze infuzijom natrijum

bikarbonata), a može se primeniti intubacija i davanje kiseonika (www.scbaghdad.com/elibrary/biobooks/PDR.for.Herbal.medicines.2nd.ed1563633612.pdf; Bossi i sar., 1981; Maksimović, 1998).

2.7.1. Primena kukureka u narodnoj tradicionalnoj medicini i etnoveterinarskoj medicini

Brojni literaturni podaci ukazuju na ranu primenu kukureka u narodnoj tradicionalnoj i etnoveterinarskoj medicini, kada su bili poznati samo efekti ove biljke, dok se o strukturi i komponentama koje sadrži ništa nije znalo.

Poznavanje *Helleborus* sp. i njegova upotreba započinju još u doba starih civilizacija, pre više od 2500 godina, kada se u Staroj Grčkoj koristio *Helleborus niger* L. (*Elleboros melas*) zbog svog jakog diuretičnog, emetičkog, nadražajnog i narkotičnog delovanja, kao za lečenje gluvoće, lepre, šuge, mahnitosti i ludila (Vitalini, 2011). Ova vrsta danas dominira u flori južne i istočne Evrope, dok su za Grčku i Malu Aziju karakteristični *Helleborus orientalis* Lam. i *Helleborus cyclophyllus* Boiss. koji ispoljavaju slične efekte. Govornici u drevnoj Grčkoj su koristili čaj pripremljen od lišća *Helleborus cyclophyllus* Boiss. da bi osnažili svoj glas (Brussel, 2004). Stari narodi su kukurekom premazivali vrhove strela ili koplja kada su išli u lov ili kada su međusobno ratovali (Tucakov, 1996). U Hipokratovim (459-377 g.p.n.e.) i Teofastovim (370-287 g.p.n.e.) delima postoje podaci o delovanju kukureka kao drastika (snažnog sredstva za čišćenje kod opstipacije), laksativa i emetika. Rimski medicinski pisac Celzijus (25 g.p.n.e. do 50 g.n.e.) u knjizi *De re medica* i lekar Galen (131-200) u spisima o veštini izrade lekova, pominju kukurek kao sredstvo koje je korišćeno u cilju otklanjanja bola (pored kanabisa, opijuma, mandragore, hiosciamusa i velebilja), za izazivanje kijanja, kod mentalnih poremećaja (melanholije, psihoze, depresije) i epilepsije, protiv hroničnih oboljenja zglobova i otoka. Po zapisu Plinija Starijeg (23-79) u *Historia Naturalis*, Rimljani su spravljali diuretični napitak od kukureka pomoću kojeg su izbacivali otrov iz tela (van Tellingen, 2007). Koliko je u davna vremena terapija kukurekom bila uobičajena i visoko cenjena, najbolje ukazuju činjenice, da je Antikira u drevnoj Fokidi gde se sprovodilo najefikasnije lečenje ovom biljkom nazvana „Helleborus“ (Karrer, 1943) i da je 77. godine u Dioskoridovoj „De materia medica“, zbog jakog delovanja, zabeležen kao vladarska biljka među lekovitim biljem (Amigues,

1999). U Paracelzusovom (1493-1541) „Herbariusu“ kukurek se nalazi na prvom mestu zbog čudotvornih lekovitih efekata, a pored ostalih indikacija, navodi se i primena sušenog lišća *H. niger* L. kao eliksira za duži život odn. geriatrikuma (lek za usporavanje procesa starenja i povećanje fizičke i mentalne sposobnosti starijih osoba) (Martinek, 1973; Ciulei i sar., 1993). Obzirom da *H. niger* L. (Božićna ruža) cveta sredinom zime, pod snegom, u periodu nepovoljnih vremenskih uslova dok ostala vegetacija miruje, pripisivana mu je i posebna božanska moć. Srednjevekovna i medicina novog veka preuzele su tretman kukurekom od Grka i Rimljana, a zabeležen je u biljarušama iz 16. veka (Brunfels, 1532; Fuchs, 1543; Bock, 1577). Od 16 biljnih vrsta iz familije *Ranunculaceae* koje su se u periodu renesanse koristile u evropskoj narodnoj medicini za lečenje malarije, tri su pripadale rodu *Helleborus* L.: *H. foetidus* L., *H. niger* L. i *H. viridis* L. (Adams i sar., 2011). Iako su brojni efekti kukureka poznati još iz vremena Hipokrata, sve do polovine XIX veka nema podataka o dejstvu droge *Hellebori rhizoma et radix* na srčani mišić i primeni u terapiji srčanih oboljenja, kako u tradicionalnoj, tako ni u zvaničnoj medicini (Husemann i Marmé, 1865).

Kušan (1956) navodi da se u narodnoj medicini obično upotrebljavaju sve vrste raspoloživog kukureka, i to: rizom *H. viridis* L. se koristio kao purgativ, drastik, opojno sredstvo, narkotik, kao lek za srce i nerve; droga *H. niger* L. *rhizoma et radix* primenjivala se u lečenju duševnih bolesti, dok su se podzemni delovi *H. orientalis* Lam. upotrebljavali kao lek protiv vodene bolesti (hydrops), epilepsije, melanholije, povratne groznice i za izazivanje povraćanja (emetičko delovanje). Sva navedena dejstva pripisivana su glikozidu helebrinu i saponozidu heleborinu. Isti autor ističe da se ne smeju koristiti sveži delovi ovih biljaka, jer zbog delovanja na centralni i periferni nervni sistem može nastupiti nesvestica, povraćanje, dijareja, grčevi i ukočenost, pa i smrt kod čoveka i životinja. U danskoj narodnoj medicini se čaj od lišća kukureka, koji ima sedativno dejstvo, koristi za lečenje epilepsije i konvulzija (Jäger i sar., 2006). Leonard Jr. (2004) potvrđuje da su početkom XIX veka, lekari pacijentima obolelim od mentalnih i duševnih oboljenja, šizofrenije, anoreksije, gojaznosti i alkoholizma, preporučivali kukurek za izazivanje gađenja, povraćanja, vrtoglavice i urinarne inkontinencije, u cilju povećanog lučenja antidiuretičnog hormona vazopresina. Vazopresin deluje i direktno kao neurotransmitter (značajan u procesima pamćenja, spavanja i biološkog ritma) i indirektno utiče na druge neurotransmitere kao što su

noradrenalin i serotonin. Svoju primenu kukurek je našao i u lečenju šećerne bolesti, kao sastojak mešavine biljnih ekstrakata (zgustaka), koja se uzima ujutru i uveče (Gostuški, 1941).

Crveni kukurek *H. purpurascens* W. et K. u narodu nazvan spinc (ili špinc) je vrlo popularna biljka i nalazi različitu primenu: stavlja se u vodu kojom se napajaju ovce u čijoj su se u jetri razvile parazitske larve, rizom i korenje ekstrahovani vodom koriste se u lečenju zubobolje, a svež rizom sa korenjem samleven u kašicu stavlja se na bolestan zub (Zoz, 1956). U cilju uklanjanja bola, u italijanskoj narodnoj medicini se takođe aplikovao izgnječen koren *H. bocconei* Ten. ili *H. foetidus* L. (Barone, 1963; Leporatti i Pavesi, 1989) na bolan zub, a *H. cyclophyllus* Boiss. u grčkoj narodnoj medicini (Brussel, 2004), dok su Scherrer i sar. (2005) zabeležili da ljudi žvaću koren kukureka kako bi došlo do ispadanja crnih i pokvarenih zuba. *H. orientalis* Lam. se u turskoj narodnoj medicini koristi u istu svrhu, kao i za lečenje reumatizma ljudi, a u etnoveterinarskoj medicini se u cilju ublažavanja inflamatornog stanja i smanjenja edema ekstremiteta goveda koristi na različite načine: malo parče naoštrenog rizoma provuče se kroz probušeno uhu ili rep i ostavi 24h ili se aplikuje spolja na otečeni zglobov ili se osušen i usitnjen rizom sa korenjem daje peroralno (Fujita i sar., 1995; Yeşilada, 2002). Kao antipiretici, primenjivani su i podzemni organi *H. viridis* L. (Corsi i Pagni, 1978; Guarrera, 1994), *H. bocconei* Ten. (Guarrera, 1990), *H. odoratus* W. et K. i *H. foetidus* L. (Uncini Manganelli i sar., 2001) kod svinja, goveda i ovaca. Dekokt nadzemnih delova *H. foetidus* L. koristio se spolja u tretmanu rana (Blanco i sar., 1999), dok se koren *H. orientalis* Lam. postavljao u otvor na uhu u cilju lečenja inficiranih rana ili pod repove 24h kod lumbaga (Kültür, 2007).

U italijanskoj narodnoj medicini se koriste usitnjeni podzemni organi kukureka u obliku dekokta i gorkog tonika kao kardijačno sredstvo i kao pomoćno sredstvo u cilju poboljšanja funkcija digestivnog trakta (Coassini Lokar i Poldini, 1988). Alkoholni ekstrakt stabla, rizoma i korena kukureka daje direktan i dugotrajan efekat u lečenju migrene, a koristi se i kao anabolični, vazodilatatorni i antiseptični lek (Tosevski i sar., 1999). Osušeni rizom *H. thibetanus* Franch. se koristi u kineskoj narodnoj medicini za lečenje cistitisa, uretritisa i traumatskih povreda (Yang i sar., 2010).

Novija saznanja ukazuju da kukurek zauzima značajno mesto u sistemu terapije koji se svrstava u alternativnu medicinu i označava kao homeopatija. Njegovom

primenom se stimulišu mentalne i fiziološke funkcije u slučajevima neurološke ili mentalne regresije, a indikovana je i kod pojave septikemije, autizma, teškoća u učenju i akutnih psihoza mladih žena (Deltombe, 1997). U Nemačkoj se *H. niger* L. primenjuje u homeopatiji u slučajevima meningitisa, konvulzija, hidrocefalusa i kaheksije, a injekciono (aplikovan subkutano) upotrebljava se kao adjuvans u terapiji tumora (Büssing i Schweizer, 1998). Homeopatska medicina koristi tinkture (alkoholno vodeni ekstrakti droga ili etanolno vodeni rastvori suvih i tečnih ekstrakata droga u kojima alkohol inhibira enzime čime se sprečava razlaganje sastojaka, na primer protoanemonina) pripremljene od podzemnih organa kukureka za lečenje eklampsije, epilepsije, nekih psihoza, meningitisa i encefalitisa (Frohne i Pfänder, 2005). U antropozofskoj medicini, koja pripada alternativnoj i komplementarnoj medicini, koristi se vodeni ekstrakt cele biljke *H. niger* L. u veoma niskim koncentracijama (počevši od razređenja 10^{-3} koje se dalje razređuje), kao pomoćno terapijsko sredstvo u lečenju raznih vrsta nemetastaziranih i metastaziranih tumora i hematoloških maligniteta (tumora mozga kod dece, bronhijalnog i kancera prostate, abdominalnih tumora, leukemije, mijeloproliferativnih bolesti kao što su Hočkinov i Non-Hočkinov limfom i bolesti u vezi sa AIDS-om, kao što je Kapošijev sarkom) u cilju smanjenja neželjenih efekata hemoterapije (Jesse i sar., 2009).

Bogdan i sar. (1990-a) ističu navode većeg broja autora, da se u rumunskoj i nemačkoj narodnoj medicini, kukurek ponekad upotrebljavao kod pojave nesаницe, apatije, ošamućenosti, bolesti bubrega i hidropsa, nepravilnog rada srca, usporenog rada creva, osipa i čireva na koži. U nekim delovima Crne Gore se i danas ekcem i svrab leče podzemnim organima *H. odoratus* W. et K. (Menković i sar., 2011). Saponozidi imaju jako nadražajno dejstvo i ubrzavaju motilitet creva, pa se kukurek koristio kao purgativ, a zbog uterotonične aktivnosti i izazivanja krvarenja prilikom uvođenja oljuštenog rizoma u spoljašnje genitalne organe, korišćen je za izazivanje abortusa (Scherrer i sar., 2005). Svojstvo kukureka da izaziva crvenilo kože, korišćeno je za oslobađanje od vojne službe, tako što se rizom karpatskog kukureka *H. caucasicus* A. Br. upotrebljavao u cilju nastanka otoka i rana (Zoz, 1956).

U etnoveterinarskoj medicini kukurek se uspešno unosi peroralno, u obliku infuza, za podsticanje kontrakcija buraga (Bogdan i sar., 1990-a). Dekokt nadzemnih delova *H. foetidus* L. se koristi za sprečavanje pojave timpanije (naduna), u tretmanu

bradavica (Blanco i sar., 1999) i kao antiseptik za ispiranje novorođenih životinja (Uncini Manganelli i sar., 2001; Viegi i sar., 2003) i čišćenje rana (Idolo i sar., 2010), a dekoka dobijen iz lišća *H. viridis* L. se daje životinjama da piju kod prehlade i kašlja (Uncini Manganelli i sar., 2001). Kombinovana biljno-mineralna mikstura u obliku masti, koja sadrži plod *H. foetidus* L. sa još nekoliko toksičnih biljnih vrsta, sumpor i maslinovo ulje, koristi se u tretmanu dermatofitoza, izazvanih gljivicama iz roda *Microsporum*, *Trichophyton* ili *Epidermophyton*. Ovaj narodni lek se koristi u lečenju mikoza kod krava, zečeva, pasa i drugih domaćih životinja, ali i ljudi koji se inficiraju u kontaktu sa obolelim životinjama (Hualde i Ormazábal, 2002; Àngels Bonet i Vallès, 2007). U južnoj Italiji, mikstura je našla primenu u tretmanu sličnih problema sa kožom, kao što je "lečenje svraba" kod pasa i svinja (Pieroni i sar., 2004). U narodu postoji običaj da se vežu listovi *H. viridis* L. pod repove ovaca kako bi se izazvao estrus (Corsi i sar., 1981) i graviditet (Uncini Manganelli i sar., 2001). U cilju antineoplastičnog delovanja, koren *H. viridis* L. se postavlja pod kožu ovaca i svinja (Viegi i sar., 2003), a obloge od izdrobljene sveže biljake *H. foetidus* L. se aplikuju na kožu kod krava (Àngels Bonet i Vallès, 2007).

Pored toga što se u veterinarstvu koristi kao purgativno sredstvo, kukurek deluje i kao kardiotonik i iritans (Kišgeci, 2002). Sarić (1989) ističe navode naših poznatih botaničara i lekara, Josifa Pančića iz 1873. god. da se "u našem narodu koren od obe fele* (*H. viridis* L. i *H. odoratus* W. et K.) upotrebljava za lečenje stoke" i Save Petrovića iz 1883. god., da "narod i neki veterinari uvlače koren od kukureka pod kožu marve, te tu izazivaju gnojenje u nekim opasnim bolestima marve". Zbog iritirajućeg delovanja na kožu i sluzokožu, u narodu postoji običaj da se rizom kukureka upotrebljava za "zatravljanje" obolele stoke, a negde i ljudi. Ovaj prirodni metod lečenja sprovodi se u cilju zaštite od bolesti i parazita ili obeležavanja vlasništva, a bio je poznat još Rimljanima i verovatno se indirektno i kroz literaturu sačuvao do danas (Čajkanović, 1985). U našem narodu se primenjuje naročito u Peku, Zviždu i Jarmenovcima (Đurić, 1985), u Vojvodini gde se ovaj posao naziva "uvlačenje spreža" (Tucakov, 1996), u oblasti homoljskih planina (Milanović i sar., 2004) i u kopaoničkim selima (Jarić i sar., 2007). Nadražajna terapija pomoću subkutanog implantata sa imunostimulativnim delovanjem, poznata je vekovima u italijanskoj etnoveterinarskoj medicini (Mattioli, 1568; Pieroni, 2000; Uncini Manganelli i sar., 2001). U makedonskoj tradicionalnoj

medicini (Stojkovski i sar., 1999) i u Rumuniji, pre svega u rumunskim gazdinstvima iz Zibenburga, primenjuje se već više od 100 godina (Bogdan i sar., 1990-a). Rizom sa korenjem izvađen u avgustu se dobro opere, iseče na komade od po 3-5-10 cm, osuši i sastruže do beline. Potom se komad rizoma kukureka postavlja u ranu napravljenu šilom, debelom iglom ili nožem kod svinja, ovaca i jagnjadi u uhu ili ispod repa. Kod konja se probode koža u predelu grudi, a kod goveda kroz đerdan na vratu ili sa donje strane repa i zatim poveže da ga životinje ne izbace. Posle nekoliko dana, ovaj biljni implantat se uklanja, što omogućava oslobađanje tečnosti i oporavak životinje. Na mestu implantacije korena kukureka nastaje aseptično zapaljenje praćeno crvenilom i edemom, a u narodu se smatra da predstavlja "izvučenu bolest". Ove promene su prolaznog karaktera i povlače se tokom jedne nedelje nakon uklanjanja implantata. Pri tome je opšte stanje životinja dobro, ponašanje nepromenjeno, a apetit zadržan. Terapiji implantatom se obično podvrgavaju životinje ukoliko se u nekom susednom području pojave zarazne ili parazitske bolesti, u cilju profilakse neinficiranih grla. Postupak se sprovodi i kod nedovoljne razvijenosti životinja, odsustva apetita, slabijih i bolešljivih životinja kada u proleće "menjaju krv", pojave kašlja, groznice nepoznatog porekla, bolesti pluća i creva, crvenog vetra (Bogdan i sar., 1990-a; Pieroni, 2000), "murdarluka" konja (Čajkanović, 1985), epileptične krize jagnjadi usled edema lobanje (Uncini Manganelli i sar., 2001), kao i u cilju akutiziranja hroničnih bolesti radi bržeg ozdravljenja (Stojkovski i sar., 1999).

Veruje se da najefikasnije deluje rizom mladog kukureka (jedinac, jednak) sa jednom glavom ili jednim cvetom (Čajkanović, 1985). Do pre nekoliko decenija, psi oboleli od štenećaka lečeni su ubacivanjem dela korena *H. foetidus* L. pod kožu u blizini traheje. Lečenje gnojnog apscesa goveda nastalog na grebenu usled iritacije jarmom i na ušima, sprovodi se ubacivanjem stabljike umesto korena kukureka ili se sveže lišće macerira i primenjuje lokalno nakon odstranjivanja gnoja (Uncini Manganelli i sar., 2001). Na Siciliji, ovaj metod se koristi za postavljanje dijagnoze i lečenje zapaljenja pluća goveda (Raimondo i Lentini, 1990; Lentini, 2000). Komadima osušenog korena *H. bocconeii* Ten. ssp. *siculus* naprave se dve male posekotine na koži bolesne životinje i ukoliko rezovi upadljivo otiču tokom narednih dana, uz pojavu gnojnog apscesa, znači da je životinja obolela od pneumonije. Infektivni, gnojni materijal i komadi korena se uklone, a nakon 5-6 dana dolazi do ozdravljenja. Passalacqua (2006) ističe da se u

regionu Kalabrije ista biljka koristi za oporavak od bronhitisa. Osušena duga peteljka bazalnog lišća se podeli na tri dela i ubaci u inciziju na zadnjoj strani uha ili pod kožu lateralnog dela vrata goveda. U početnim fazama bolesti, razvija se otok okolnog područja sa nekrotičnim promenama prečnika oko 1 cm, životinje postaju imune na bolest, a trajno ostaje mali otvor na uhu ili na vratu. Ako je bolest u poodmakloj fazi i ne postoji mogućnost oporavka goveda, dolazi do atrofije otvora i ispadanja stabljike. Leporatti i Impieri (2007) navode da je veći broj autora došao do saznanja da se i *H. foetidus* L. uspešno primenjuje širom Italije u lečenju infekcija respiratornog trakta kod goveda.

Takođe postoji običaj, da se ovca koja se "okrvila", tj. dobila unutrašnja krvarenja, pored puštanja krvi i "zatravi" na dva mesta. Kukurek se koristi i za lečenje upale vimena kod ovaca, a stavlja se u vodu za piće ako ovca ili goveče odbijaju hranu. Kokoškama se protiv zaraznih bolest preventivno daje istucani kukurek u vodi ili hrani (Mačukanović-Jocić i Blaženčić, 2000).

U našem narodu se od davnina daje malo rizoma i korena kukureka bolesniku od vodene bolesti da iz njega "tera vodu na mokraću" (Čajkanović, 1985), a Fossati i sar. (1999) navode da se u etnoveterinarskoj medicini koristi *H. niger* L. kod oštećenja bubrega. U nekim našim krajevima, podzemni organi kukureka prokuvani zajedno sa korenom bele čemerike (*Veratrum album* L., Liliaceae) i listom duvana (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), primenjuju se spolja, kao antiparazitik u suzbijanju šuge i vašljivosti domaćih životinja (Tucakov 1996, Kišgeci 2002), dok se drobljeno lišće *H. niger* L. koristi kao antihelmintik u etnoveterinarskoj medicini u Pakistanu (Hussain i sar., 2008). Voda u kojoj je kivan rizom čemerike, sam ili zajedno sa rizomom kukureka, upotrebljava se za prskanje krompira i uništavanje krompirove zlatice (Kovačević i Jančić, 2003).

2.7.2. Primena kukureka u konvencionalnoj medicini

Pisana svedočanstva o osobinama i načinu primene kukureka mogu se pronaći u Hilendarskom medicinskom kodeksu, najznačajnijem delu srpske srednjovekovne medicine, koji je nastao u XV ili XVI veku na srpskoslovenskom jeziku. Otkrio ga je akademik Đorđe Sp. Radojičić u biblioteci manastira Hilandara 1951. god., a profesor

Relja Katić je 1989. god. priredio izdanje ovog dela na srpskom jeziku. Zbornik sadrži prevode najvažnijih spisa (uključujući terapeutsko dijagnostičke i toksikološke) tadašnje zvanične (naučne) medicine evropskih medicinskih centara, Salerna i Monpeljea, uz značajne elemente antičke medicine. Prema Opisu prostih lekova (u okviru Farmakoloških spisa Hilendarskog medicinskog kodeksa N° 517) crni i beli kukurek se koriste za čišćenje, i to crni kukurek za čišćenje od crne žuči, a beli kukurek za čišćenje flegmonoznih rana. Ovaj kodeks navodi da je kukurek koristan za lečenje otoka zglobova, hroničnog zapaljenja zglobova i mišićnih tetiva, a preporučuje ga i kod otežanog disanja i kao sredstvo za izazivanje povraćanja.

Biljne vrste koje pripadaju rodu *Helleborus* L. imaju široko farmakološko delovanje. Keller i Schöbel (1928) su utvrdili da alkaloidi celiamin, spirintilamin i spirintilin iz podzemnih organa *H. viridis* L. imaju isto fiziološko delovanje na srce. Primena 1-3 kapi 0,0475% rastvora ovih alkaloida na izolovano srce žabe dovodi do jačanja sistole, dok dijastole ostaju iste, a povećanjem koncentracije alkaloida i promene su jače izražene. Farmakodinamičkim istraživanjem heleborina izolovanog iz *H. atrorubens* W. et K. utvrđeno je anestetičko delovanje kukureka. Heleborin aplikovan čoveku u miligramskoj koncentraciji izaziva intenzivnu anesteziju sluzokože nosa i usta, koja relativno dugo traje, dok aplikacija 10 mg heleborina žabama u grudnu limfnu kesicu izaziva potpunu paralizu svih žabljih ekstremiteta usled paralize kičmene moždine, a bez uticaja je na rad srca i na disanje (Čučković, 1939). Površeno je i anestetičko delovanje *H. niger* L. (Gastaldo, 1987).

Petričić (1974) smatra da veliki broj identifikovanih i izolovanih steroidnih sastojaka iz različitih vrsta roda *Helleborus* L. upućuje na razmatranje ovih biljaka kao izvora početnih jedinjenja u sintezi terapijski korisnih steroida, kao što su kortikosteroidi. Neke *Helleborus* vrste su značajni izvori kardiosteroida. Iz sekundarnih metabolita kao što je aglikon helebrigenin moguće je sintetisati acilkardiosteroidne derivate koji imaju bolji terapijski indeks u poređenju sa konvencionalnim srčanim glikozidima (Engel i sar., 1983). Polusintetsko jedinjenje helebrigenina je kardiosteroid akrihelin, D12316 (3beta,5,14-trihidroksi-19-okso-5beta-bufa-20,22-dienolid-3-(3-metil-krotonat). Delovanje akrihelina je vrlo slično kao i adrenalina (epinefrina) (Achenbach i sar., 1983). Kod pasa i mačaka, akrihelin se apsorbuje brzo i skoro u potpunosti, povećava kontraktilnu snagu miokarda i pokazuje jači pozitivni inotropni

efekat u odnosu na digoksin i metildigoksin, a istovremeno ne izaziva propratne efekte na CNS-u za razliku od metildigoksina (Stroman i sar., 1984).

Pedesetih godina prošlog veka vršena su klinička ispitivanja delovanja glikozida korelborina K iz rizoma i korena kavkaskog kukureka (*H. caucasicus* A. Br.) i korelborina P iz korena i rizoma crvenog kukureka (*H. purpurascens* W. et K.). Shubov (1952) je utvrdio da je korelborin K delovao blagotvorno u 24 slučaja od ukupno 32 bolesnika sa kombinovanim oboljenjima mitralnih zalistaka i miokarda, koja su se razvila na podlozi hipertenzije, arterioskleroze i hroničnih plućnih bolesti. Kod 24 pacijenta ispoljio se diuretikički efekat, olakšano je disanje, uravnotežen je ritam srčanog rada, smanjene su dimenzije srca i jetre, poboljšani srčani tonovi i korigovana je alkalna rezerva krvne plazme. Zoz (1956) ističe da je terapija korelborinom P primenjena na 60 pacijenata sa poremećajem cirkulacije i hroničnom srčanom insuficijencijom sa dekompenzacijom. Kod 51 pacijenta uklonjeni su svi osnovni simptomi poremećaja, kod 5 bolesnika je zapaženo izvesno poboljšanje, a nije bilo delovanja kod 4 bolesnika. Poboljšanje zdravstvenog stanja je bilo ispoljeno u većoj meri kod bolesnika koji su imali poremećaje I i II stepena. Zahvaljujući osobini da se ponaša kao dobro kardiotonično sredstvo, koje može da zameni strofantin, u bivšem SSSR-u je korelborin stavljen u promet. Međutim, potrebno je da se napravi pauza u terapiji posle 5 dana, jer je usled kumulativnog delovanja moguća pojava mučnine, gađenja, povraćanja, nepravilnog pulsa, poremećaja srčanog ritma i bolova u predelu srca.

Kardiotonični glikozid korelborin P (Corelborinum) ekstrahovan iz rizoma i korenja kukureka koji je rasprostranjen u bivšem SSSR-u, daje se kao kardiotonični lek u tabletama po 0,2 mg, u injekcijama kao 0,025%-tni rastvor (Turova, 1974; Машковский, 1977; Sarić, 1989) i u obliku supozitorija (Kojić i Janjić, 1991; Kišgeci 2002).

Po svom delovanju, ekstrakt kukureka je sličan strofantusu (deluje brzo i snažno na srce) i digitalisu (kumulativan je), jer predstavlja i lek i otrov za srce. Lekovitost ali i otrovnost kukureka, potiče od kardiotoničnih steroidnih glikozida koji u malim, terapijskim dozama deluju tonično na srce (kardiotonika), dok uzeti u većoj količini ili pri dužoj nekontrolisanoj upotrebi, predstavljaju otrov za srce (kardiotoksici). Steroidni gliozidi ostvaruju kardiotonično delovanje direktno, tako što pojačavaju kontrakciju i aktivnost srčanog mišića i normalizuju rad srca kada postaje nedovoljan i nepravilan

usled različitih oboljenja (srčana insuficijencija) i indirektno, jer deluju diuretično, posebno u slučajevima srčanih edema (Tucakov, 1996). Terapeutska koncentracija kardijskih glikozida izaziva umerenu inhibiciju enzima Na^+/K^+ -ATP-aze (oko 30%). Kada je ćelija depolarizovana, manje je enzima na raspolaganju za obnavljanje Na^+/K^+ ravnoteže. Preostali neinhibirani enzimi će delovati brže, mada će uspostavljanje jonske ravnoteže potrajati duže nego kada su svi enzimi dostupni. Ovo kašnjenje izaziva privremeno povećanje koncentracije intracelularnog Na^+ i menja koncentraciju intracelularnog Ca^{++} . Izmena ovih jona omogućava da natrijum izađe iz ćelije u zamenu za kalcijum, pri čemu se povećava koncentracija kalcijuma u ćeliji, a time i kontraktilna snaga srca. Kada koncentracija kardijskih glikozida dostigne toksični nivo, inhibicija enzima je vrlo visoka (>60%), čime se smanjuje transport Na^+ i K^+ do te mere, da vraćanje na normalan nivo za vreme dijasole nije moguće pre sledeće depolarizacije, što dovodi do toksičnih efekata (na primer, aritmije) (Singh i Streeper, 2005). Petričić i sar. (1971-a) navode da su još četrdesetih godina prošlog veka, pre više od 70 godina, Grossman i Benzon preporučivali helebrin kao veoma efikasan lek u slučaju insuficijencije desnog srca kada digitalis ne deluje ili je primena strofantina kontraindikovana. Smatrali su da je ovaj glikozoid posebno koristan i kod tahikardijske dekompenzacije, jer je njegov efekat na vagus često jači od strofantina.

Kovačević (2004) takođe navodi da se kardijski heterozidi, helebrin i heleborein, u terapijskim dozama mogu primeniti kod srčane insuficijencije i poremećaja srčanog ritma, jer poboljšavaju radnu sposobnost srčanog mišića, pri čemu se ne povećavaju potrebe za kiseonikom. Ova jedinjenja pojačavaju snagu kontrakcija insuficijentnog srca (pozitivno inotropno delovanje), usporavaju ritam srčanih kontrakcija, odnosno imaju indirektni parasimpatikomimetički efekat (negativno hronotropno delovanje), usporavaju provođenje impulsa i produžuju period relaksacije, čime ispoljavaju holinergički efekat (negativno dromotropno delovanje) i smanjuju razdražljivost miokarda (negativno batmotropno dejstvo). Navedena delovanja dovode do toga da se srce kontrahuje snažnije, usporenim i ravnomernim ritmom, pri čemu je smanjen otpor u arterijskom delu krvotoka. Usled povećanja minutnog volumena srca, smanjuje se venski pritisak i zapremina krvi u venskom sistemu, a povećava se obim bubrežne filtracije, odn. diureze, a to izaziva nestajanje edema nastalih usled srčane insuficijencije. Svoje delovanje, kardijski heterozidi ostvaruju vezivanjem za

aktivni kalijumov centar membranske transportne ATP-aze, pri čemu dolazi do njene privremene, reverzibilne inhibicije, a time i enzimski posredovanog aktivnog katjonskog transporta kroz membranu, neophodnog za generisanje akcionih potencijala i prenošenje nervnih impulsa. Maksimović (1998) iznosi pretpostavku mogućeg mehanizma delovanja: sile jakih vodoničnih veza koje deluju na relativno velikom rastojanju, vode konjugovani laktoski prsten ka K^+ aktivnom centru receptorskog enzima. U formiranim vodonikovim mostovima, kiseonik karbonilne grupe laktosa je akceptor protona, ali ostvareno vezivanje u jednoj tački nije čvrsto i steroidni aglikon može slobodno da rotira duž ose C(17)-C(20). Prilikom rotacije aglikon se uklapa u komplementarne strukture na površini enzima, što omogućava da deluju kratko dometne Van der Valsove sile i fiksiraju molekul vezivanjem u više tačaka. Terness i sar. (2001-a,b) su utvrdili da bufadienolidi izolovani iz *Helleborus* L. inhibiraju Na^+/K^+ -ATP-azu T limfocita, čime povećavaju nivo intracelularnog Na^+ i smanjuju koncentraciju K^+ , što može biti uzrok T-ćelijske supresije, jer je limfocitna aktivnost vezana za povećanu ekspresiju Na^+/K^+ -ATP-aze. Petnaestak godina ranije, Serebryakov (1982) i Anguladze i sar. (1983) su ustanovili da lipidi podzemnih organa *H. abchasicus* i *H. caucasicus* A. Br. deluju inhibitorno na transport kalijumovih jona i aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze u bubrežnim ćelijama svinja, a da se ovaj efekat lipida može u izvesnoj meri redukovati metilacijom slobodnih masnih kiselina.

Prečišćen ekstrakt različitih vrsta roda *Helleborus* L. pripremljen u obliku injekcija i masti pod trgovinskim nazivom Boicil (U.S. Patent) koristi se u Rumuniji od 1981. godine kao terapeutsko sredstvo sa antireumatskim, antizapaljenskim, analgezijskim, antialergijskim, spazmolitičkim i miorelaksantnim delovanjem, kao i u cilju lečenja autoimunih bolesti i regulisanja funkcije krvnih sudova (Kerek, 1981). Zbog brzog otklanjanja bola i postizanja dugotrajnog antireumatskog efekta, u početku je korišćen samo na osnovu iskustva, jer su aktivni principi ovog ekstrakta bili nepoznati, a u skorije vreme je ekstrakt *H. purpurascens* W. et K. visoko prečišćen i određen mu je sastav (Bogdan i sar., 1990-a; Linke i sar., 1998; Milbradt i sar., 2003). Boicil forte se u Rumuniji primenjuje u lečenju spondiloartropatije, lumbalne diskopatije i displazija lakta i kuka pasa (Bolte i sar., 1994). Veći broj autora je utvrdio da Boicil utiče na morfološke, fiziološke, metaboličke i genetske karakteristike humanih diploidnih ćelija *in vitro* (Dima i sar., 1986, 1987), kao i na neke imunokompetentne

ćelije u *in vitro* i *in vivo* uslovima (inhibitor mitogeneze PHA-stimulisanih limfocita) i na modulaciju celularnog i humoralnog imunog odgovora kod pacova i čoveka (Olinescu i sar., 1986, 1987). Adomnicăi i sar. (1990) su ispitivali teratogeno i embriotoksično delovanje Boicil tableta kod tri generacije pacova i miševa u prefertilizacionim i implantacionim fazama. Novorođene životinje nisu ispoljile patološke (mikroskopske i makroskopske) promene niti somatske anomalije. Na bazi neutralnih lipida iz podzemnih organa *Helleborus* L. pripremljen je preparat Hellipol za lečenje malignih površinskih tumora (Kemertelidze i Dalakishvili, 1996).

Kerek (1997) je u Nemačkoj registrovao patent DE 196 00 301 A1, u kome su navedene bioregulatorne supstance sa anorganskim strukturnim sklopom, koji je izgrađen od ugljen suboksida pomoću ciklooligomerizacije i dodatnog formiranja makroprstenastih struktura. Ove aktivne supstance i njihovi adukti, asocijati i kompleksi sa molekulskom masom $M \leq 2000$ D se upotrebljavaju samostalno i/ili kao stabilni dodaci sa drugim poznatim supstancama. Hemijskom analizom je dokazano da visoko prečišćeni *H. purpurascens* W. et K. ekstrakt (HP12) dobijen iz suvog, grubo usitnjenog korena i rizoma, sadrži novu supstancu opisanu kao ciklo-oligomerni derivat ugljen suboksida $co-(C_3O_2)_6$ (molekulske mase 408,19) koja deluje imunoregulatorno.

Najnovija ispitivanja koja su sprovedli Păun-Roman i sar. (2013) ukazuju da prečišćen ekstrakt *H. purpurascens* W. et K. sa visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja (flavonoidi, tanini i fenolne kiseline), koncentrovan mikrofiltracijom i ultrafiltracijom, ispoljava značajnu inhibitornu aktivnost prema ureazi i α -himotripsinu.

2.8. BIOAKTIVNA SVOJSTVA I PRAVCI DELOVANJA EKSTRAKTA RIZOMA I KORENA KUKUREKA

Zavisno od uslova (doze, načina aplikacije i vrste procesa na koji deluje), ukupni ekstrakt kao i pojedine frakcije rizoma i korena kukureka, ispoljavaju višestruke bioaktivne efekte i mogu da deluju u više pravaca, pri čemu su mehanizmi delovanja u većini slučajeva nedovoljno precizno ispitani i opisani ili su nepoznati. Identifikacija i karakterizacija komponenti ekstrakta *Helleborus* L. uključenih u indukciju određenih efekata su od primarnog značaja za razjašnjenje osnovnih mehanizama njihovog *in vitro* i *in vivo* delovanja.

2.8.1. Proinflamatorno i imunostimulativno delovanje

U zdravstvenoj zaštiti životinja se koriste imunomodulatorne supstance, koje različitim mehanizmima, menjaju nivo aktivnosti komponenti imunskog sistema. Egzogeni imunomodulatori podstiču imunski odgovor ćelijskog i humoralnog tipa (imunostimulatori) ili smanjuju neželjene efekte aktivnosti imunološkog sistema i podstiču mehanizme tolerancije, u cilju smanjivanja negativnog odgovora na sopstvene i alo-antigene (imunosupresori sprečavaju odbacivanje transplantata, alergijske i autoimune reakcije). Utvrđen je veliki broj supstanci sa imunomodulatornim delovanjem, od hemijskih proizvoda do proizvoda biljnog porekla, a potvrđeno je i da ekstrakt rizoma i korena kukureka deluje imunomodulatorno.

Bogdan i sar. (1989, 1990-a) su sprovedi nespecifičnu imunostimulativnu terapiju domaćih životinja, transkutanom implantacijom rizoma *H. purpurascens* W. et K., kroz ranu napravljenu sterilnom debelom iglom, u uhu ovaca i svinja i u đerdanu goveda, dok je koža grudi kod konja probodena na dva mesta sa razmakom od 1,5-2 cm i postavljen je rizom. Nakon 24h uklonjen je omekšali rizom da se ne bi širila kožna nekroza, a pre i 24h, 48h, 96h i 144h posle implantacije, praćeni su opšte stanje i lokalne promene. Ispitivane su i promene vrednosti hematoloških parametara i stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita. Kod goveda je uočena najjača reakcija na implantat kukureka, sa dugotrajnim rastom temperature (rektalna temperatura je porasla posle 24h za 1,4 °C, posle 48h za 1,7 °C, posle 96h za 0,9 °C, a posle 144h za 0,5 °C) koji je doprineo smanjenju apetita i pogoršanju opšteg stanja. Već 24h posle implantacije formirao se veliki edem đerdana koji se i dalje povećavao do 3. ili 4. dana, a zatim se otok lagano povlačio. Posle mesec dana od implantacije, kod jednog govečeta se mogao zapaziti tvrd čvor veličine oraha, kod drugog tvrd čvor veličine jabuke, a kod trećeg govečeta otvorena flegmona prečnika 15 cm sa nekrotičnim komadima kože i veća količina zelenkasto žutog gnoja. Kod konja, 1-3 dana posle implantacije rektalna temperatura je bila neznatno povećana (nekoliko desetinki stepena Celzijusa), opšte stanje je bilo dobro, a apetit zadržan. Nakon 24h, prednji deo grudi je jako natekao, edem je bio tvrd i topao, ali je relativno brzo omekšao i formirao se apsces koji se otvorio 6. do 9. dana nakon vađenja implantata i došlo je do spontane drenaže, pri čemu stvoreni žućkasti sekret nije imao osobine gnoja. Posle nedelju dana, otok se povukao,

rana zatvorila, a u toku naredne tri nedelje ožiljak je bio gotovo neprimetan. Kod ovaca je opšte stanje bilo dobro, apetit nesmanjen, a 24h posle implantacije uho se uvećalo za oko tri puta. Posle uklanjanja implantata tokom jedne nedelje se edem povukao, a iz malog otvora na ušnoj školjci pojavio se serozni sekret. Nekrotizovani deo uha prečnika 1,5 cm je otpao posle mesec dana, a uho je zalečeno bez ožiljka. Opšte stanje svinja je bilo nepromenjeno i implantacija nije uticala na apetit i ponašanje. Posle 24h uho je jako nateklo, debljina ušne školjke se povećala 3-4 puta, a crne nekrotične zone su se širile do korena uha. One su se sasušile i otpale, tako da je posle tri nedelje uho zaraslo, ali je bilo oštećeno (probušeno, izrovano ili prepolovljeno). *Restitutio ad integrum* je zapažen kod mlade prasadi i kod starijih jedinki čija je ušna školjka vrlo malo nekrotizovala. Analiza diferencijalne krvne slike je potvrdila izraženu leukocitozu i neutrofiliju kod svih tretiranih životinja koja je trajala više od 6 dana (izuzev kod ovaca). Pod uticajem implantata kukureka, povećali su se indeks fagocitoze (0-21 vs 0-34) i vrednost ukupnog kapaciteta fagocitoze neutrofilnih granulocita (više od 6 puta) u odnosu na vrednosti pre implantacije.

U cilju utvrđivanja aktivnih sastojaka, odgovornih za izazivanje leukocitoze i neutrofilije nakon aplikovanja ekstrakta podzemnih organa kukureka životinjama, potrebno je izolovati i ispitati svaki posebno. Kako saponozidi dovode do najveće iritacije, Bogdan i sar. (1990-b) su ih izolovali metodama opisanim u rumunskoj farmakopeji (izdanje IX, str. 821) i upoređivali efekte dobijene kod ovaca 24h, 48h i 96h posle implantiranja rizoma *H. purpurascens* L. u ušnu školjku i SC injektiranja 3 varijante *H. purpurascens* L. Aplikovanje po 0,5 ml 4% dekokta ili 4% ekstrakta saponozida u ušnu školjku, izazvalo je pojavu vidljivog edema uha koji se povukao u roku od 1-2 dana bez ostavljanja traga (bez nekroze i rana), uz dobro opšte stanje i očuvan apetit. Kod ovaca kojima je sa unutrašnje strane bedra aplikovano po 2 ml 1% dekokta rastvorenog 200 puta, nije bilo promena na mestu aplikacije, kao ni promene opšteg stanja. Utvrđena je slična dinamika promena u broju leukocita i neutrofilnih granulocita. Najizraženija leukocitoza sa neutrofilijom postignuta je nakon 24h i to implantacijom rizoma, koja je dovela do povećanja broja ukupnih leukocita za 67,2% i broja neutrofilnih granulocita za 195,4%. Po efikasnosti slede 4% ekstrakt saponozida i 4% dekokt, dok je najslabiji efekat ispoljio 1% dekokt razblažen 200 puta, za koga se može pretpostaviti efekat homeopatskog tipa, jer je koncentracija aktivnih supstanci u

finalnom razređenju bila veoma niska. Ispitivan je i efekat izazivanja blastične transformacije krvnih ćelija na bazi preuzimanja glukoze, korišćenjem kultura u medijumu RPMI 1640 sa dodatkom 10% fetalnog seruma, kao i na kulturama stimulisanim sa PHA. Blastična transformacija je dokazana samo kod ovaca kojima je aplikovan 4% ekstrakt saponozida, jer je pokazala značajan rast posle 24h i 48h, a nakon 96h se smanjila na osnovni nivo. Viši energetskei metabolizam i utrošak glukoze koji je u proseku za 251% veći nakon aplikacije 4% ekstrakta saponozida, potvrdio je imunostimulatorni efekat ovog preparata.

Bolte i sar. (1992) su na osnovu iritacije kože i vezivnog tkiva i reakcije konjunktiva (spazam kapaka i kongestija konjunktiva) kod pacova, kunića, konja i pasa, utvrdili proinflamatorno delovanje, lokalno (u obliku 10% kreme), subkutano, intradermalno ili intramuskularno aplikovanog ekstrakta *Helleborus* sp. Inflamatorni efekat se konstantno pojavljuje 8-12h nakon aplikacije ekstrakta i povećava se u narednih 48-92h u srazmeri sa primenjenom koncentracijom, dozom i načinom aplikacije, pri čemu nisu utvrđene pojave koje bi ukazivale na toksično stanje. Na delu oko mesta uboda, kod pacova posle 24h nastaju edem i tačkasta krvarenja, sa brojnim neoformacijskim kapilarima, a navedene promene nestaju nakon 12-24 dana. Proinflamatorno delovanje kukureka je izraženije kod konja, naročito kod bolesnih, a manifestuje se u prva 2-4 dana pojavom burne inflamatorne reakcije, seroznom do eksudativno-hemoragičnom eksudacijom, deskvamacijom epidermisa, limfangitom i regionalnim limfonodulitom, a 5-7 dana posle primene ekstrakta dolazi do nekroze kože. Ovi autori su utvrdili da ekstrakt *Helleborus* sp. izaziva imunostimulatorni efekat kada se aplikuje teladima istovremeno sa vakcinom protiv salmoneloze (vacc. *Salmonella Dublin*).

Bogdan i sar. (1993) su tovnjoj jagnjadi sa poremećajima metabolizma (u uzrastu od 7-8 meseci TM od po samo 16 kg) dvokratno aplikovali ekstrakt rizoma i korena *H. purpurascens* W. et K. (0,5 ml 4% ekstrakta SC u predelu levog uha, a nakon 14 dana i u predelu desnog uha). Utvrđeno je da grupa tretirana biljnim ekstraktom permanentno pokazuje prednost nad kontrolnom grupom, da bi nakon 2 meseca razlika u njihovoj prosečnoj težini (21,71 kg odn. 20,12 kg) iznosila 1,59 kg (veći porast za 7,9%). To znači da se na broju od 100 jagnjadi dobija povećanje telesne mase za 159 kg. Isti autori su 24h, 48h i 96h nakon SC aplikovanja ekstrakta podzemnih organa *H. purpurascens*

W. et K. u predelu levog uha ovaca konstatovali izraženu leukocitozu (2-3 puta povećan broj leukocita) sa neutrofilijom (povećanje broja neutrofila za 254,5% posle 24h), što je od značaja za povećanje antimikrobne zaštite. Nueleanu (2007, 2008) je mladim zdravim ovcama, u starosti od 12 meseci, koje su imale manju telesnu težinu od prosečne, SC aplikovao po 0,5 ml 3%, 4% ili 5% dekokta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K. u spoljni deo uha. Kod tretiranih grupa, nisu primećene promene opšteg stanja, apetita i pokretljivosti, dok su lokalne promene bile iste, ali su bile izraženije u grupi kojoj je aplikovan 5% dekokt: lokalna inflamatorna reakcija, nakon 24-48h jak edem uha, koji se smanjio posle 2-3 dana, a zatim i potpuno nestao. Izražena leukocitoza je zabeležena kod svih grupa posle 24h, 48h i 96h, a najznačajnije promene (maksimalna limfocitoza i neutrofilija) su registrovane u broju limfocita posle 48h i neutrofila 24h nakon aplikovanja 3% i 4% dekokta i 48h posle tretmana 5% dekoktom. Tokom oglada sve grupe su u ispitivanim periodima ispoljile monocitopeniju, sa najnižim vrednostima nakon 48h, sa izuzetkom grupe tretirane sa 5% dekokta kod koje je ova vrednost bila povećana za 54%.

Prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. ispoljava efekat potenciranja postvakcinalnog imunološkog odgovora, koji se može uporediti sa delovanjem drugih proizvoda korišćenih u istu svrhu (Bolte i sar., 2001). Istovremeno aplikovanje prečišćenog ekstrakta kukureka sa vakcinom protiv salmoneloze teladima i junadima, aktivira kako specifične (porast titra antitela), tako i nespecifične (povećanje broja leukocita, koncentracije properdina i lizozima) mehanizme imunološkog odgovora. Dobijeni rezultati su potvrdili da ekstrakt *Helleborus* sp. izaziva modifikaciju imunskog odgovora u stanjima primarne ili sekundarne imunodeficijencije. Ovi autori su u dva oglada, kontrolnim grupama klinički zdrave teladi SC aplikovali Agavac vakcinu protiv salmoneloze (5 ml ili 2 ml), a eksperimentalnim grupama klinički zdrave teladi su istovremeno dali vakcinu protiv salmoneloze (5 ml ili 2 ml) i prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. (2 ml ili 5 ml). Utvrđene su značajne razlike u vrednosti većine ispitivanih imunoloških parametara između grupa posle 7, 14, 21 i 28 dana, pri čemu su najveće vrednosti utvrđene kod ogledne grupe kojoj je aplikovano 5 ml ekstrakta. Kod svih grupa je konstatovan značajan porast broja leukocita 14. i 21. dana, ali bez signifikantne razlike među grupama, što se odnosi i na promene u broju neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita. Procenat fagocita je značajno opao 7. dana posle

vakcinacije kontrolne grupe u prvom ogledu, a povećao se za 64,6% kod tretirane grupe i za 92,3% nakon 14. dana. U drugom ogledu, procenat fagocita se nije značajno menjao 14. i 28. dana nakon vakcinacije kontrolne grupe, dok je kod ogledne grupe zabeležen rast od 31,8% nakon 14. dana i 44% posle 28. dana. Utvrđeno je i da prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. stimuliše ćelijsku multiplikaciju, aktiviranje makrofaga i oslobađanje IL-2, TNF i interferona.

Kerek (1997) je iz prečišćenog ekstrakta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K. izolovao aktivne supstance (HP12) i utvrdio njihovo bioregulatorno delovanje. Ove supstance su delovale stimulatorno na makrofage pacova, imunostimulatorno i različito na aktivnost NK ćelija (kod reumatičnih pacijenata značajno je snižena patološki uvećana spontana citotoksičnost, dok se kod zdravih pacijenata spontana citotoksičnost neznatno povećala). U grupi od 10 miševa tretiranih intraperitonealno sa 5 µg/kg aktivne supstance, indeks stimulacije makrofaga bio je značajno veći nego u kontrolnoj grupi, nakon izlaganja različitim mitogenima (lipopolisaharidima 402% vs 288% ili fitohemaglutininu 1346% vs 165%). Isti autor navodi rezultate ogleda u kome je utvrđen povećan procenat preživljavanja miševa tretiranih ovim supstancama, a zatim inficiranih letalnom dozom *Pseudomonas aeruginosa*. Oglednim grupama je davano po 2 µg aktivne supstance 7., 14. i 28. dana pre letalne infekcije, pri čemu je 21. dana jednoj grupi aplikovano 0,25 ml fiziološkog rastvora, a drugoj grupi 0,06 mg ciklofosfamida (imunosupresor). Kontrolnoj grupi nisu davane aktivne supstance. Aktivne supstance (HP12) su značajno povećale procenat preživljavanja životinja prve grupe, dok je u drugoj grupi procenat preživljavanja opao u odnosu na prvu grupu, ali je bio znatno iznad vrednosti kontrolne grupe. Autor smatra da izolovane aktivne supstance učestvuju u bioregulaciji Na⁺/K⁺-ATP-aze i drugih enzima, smanjenju oštećenja tkiva kod autoimunih bolesti, imunoregulaciji vezivanjem za Fc receptore i terapiji bola vezivanjem za nociceptore.

Tosevski i sar. (1999, 2004) su pratili zdravstveni status i ponašanje prasadi i ovaca u uslovima ubrzanog metabolizma izazvanog parenteralnom primenom ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K. Prvim ogledom je bilo obuhvaćeno 21 prase, u starosti od 35 dana. Intradermalna aplikacija ekstrakta *H. odorus* W. et K. izazvala je povišenje telesne temperature posle 24h, zavisno od doze, za 20% (temperaturni koeficijent Q₁₀ iznosio je 0,2), 38% (Q₁₀ 0,38) i 30% (Q₁₀ 0,30) u odnosu na fiziološku vrednost. U

odnosu na vrednosti utvrđene pre aplikacije ekstrakta, debljina kožnog nabora na mestu aplikacije, bila je veća za 0,43 cm, 0,9 cm odn. 0,88 cm, a površina zone zahvaćene zapaljenjem i crvenilom je bila veća za 0,56 cm², 2,6 cm² odn. 2,92 cm² nakon aplikovanja 0,263, 0,425 odn. 0,905 mg/kg TM ekstrakta kukureka. Upotrebljene doze su bile u korelaciji sa telesnom masom prasadi (jako negativnoj $r=-0,609$), eritematoznom površinom (jako pozitivnoj $r=0,707$), debljinom kožnog nabora i telesnom temperaturom (slabo pozitivnoj $r=0,47$ odn. $r=0,3$). Vrednosti hematoloških parametara određivane su 7. i 14. dana nakon aplikacije ekstrakta u dozi od 0,450 mg/kg TM. Prosečne vrednosti broja leukocita, neutrofilnih granulocita i limfocita koje su se pre tretmana ekstraktom kretale u granicama referentnih vrednosti, značajno su se povećale tokom eksperimenta. Sedmog dana posle aplikovanja ekstrakta, broj leukocita je bio povećan 1,56 puta, broj granulocita za 69% i broj limfocita za 87%, dok je povećanje ovih vrednosti nakon 14. dana iznosilo 1,47 puta, 63% odn. 83%. Utvrđene razlike u broju monocita i eritrocita i koncentraciji hemoglobina u krvi prasadi pre i posle aplikovanja ekstrakta nisu bile statistički značajne, a vrednosti su bile u fiziološkim granicama.

U drugom ogledu, ovi autori su ispitivali reakciju na ekstrakt 14. i 21. dana, kod 30 prasadi kojima je u starosti od 52 dana intradermalno aplikovan ekstrakt cele biljke *H. odoratus* W. et K. u dozi od 0,450 mg/kg TM. Nakon 14. i 21. dana eksperimenta, prosečan broj leukocita povećao se za 24% i 8,2%, dok se broj granulocita koji je pre davanja ekstrakta bio nizak, povećao 2,86 puta odn. 2,07 puta. Prosečna vrednost broja limfocita se održala i 66. i 73. dana starosti prasadi, sa malim, neznačajnim smanjenjem. Broj monocita u krvi prasadi pre tretmana bio je povećan u odnosu na fiziološku vrednost, a tokom oglea, ova vrednost se 14. i 21. dana povećala 1,4 puta, odn. 1,2 puta. Prosečne vrednosti broja eritrocita bile su niže za 22% u odnosu na vrednosti pre aplikacije ekstrakta, dok je smanjenje koncentracije hemoglobina u toku eksperimenta iznosilo 11%. Broj trombocita se u krvi prasadi pre aplikacije ekstrakta kretao u fiziološkim granicama, a ova vrednost se smanjila pri uzrastu od 66 dana za 42% i uzrastu od 73 dana za 26%. U ispitivanja je bilo uključeno i 30 Virtenberg ovaca, u uzrastu od 1 godine, koje su intradermalno tretirane ekstraktom kukureka u koncentraciji od 0,450 mg/kg TM. Utvrđeno je statistički značajno povišenje telesne temperature ovaca (za 0,77 °C nakon 24h, za 0,47 °C posle 72h) u odnosu na vrednost

pre aplikovanja ekstrakta. Debljina kožnog nabora je bila veća u odnosu na debljinu pre aplikacije ekstrakta (2,95 cm) za 1,4 cm, 1,7 cm odn. 1,0 cm nakon 24h, 48h odn. 72h, a sve uočene razlike su bile visoko signifikantne ($P < 0,001$). Razlika između dijametra edema na mestu aplikacije ekstrakta posle 24h (3,92 cm) i 48h (4,17 cm) nije bila statistički značajna, dok je razlika bila vrlo signifikantna ($P < 0,01$) posle 72h (2,41 cm) u odnosu na 24h i visoko značajna ($P < 0,001$) u odnosu na 48h. Već 24h posle aplikacije ekstrakta, ovce su bile pospane, usporenih pokreta, edem je bio intenzivno crvene boje, u mnogim slučajevima temperiran i bolan. Nakon 48h opšte stanje se poboljšalo, konzumiranje hrane je bilo dobro kao i preživljavanje, životinje su bile vrlo pokretne, a površina i temperiranost edema su se smanjivali. Iz dobijenih rezultata je izveden zaključak da ekstrakt biljke *H. odorus* W. et K. deluje na metabolizam brojnih ćelija, kao što su hepatociti, mišićne ćelije, ćelije koštane srži i mastociti, koje su zato i nazvane ciljnim ćelijama (*BTC-bufaenolides target cells*). Ovi autori smatraju da ekstrakt *Helleborus* L. ima značajan potencijal u profilaksi i lečenju bolesti koje u veterinarskoj medicini nisu dovoljno etiopatogenetski razjašnjene (mišićna distrofija jagnjadi, atrofični rinit svinja, kržljivost, dijareja, hepatosplenomegalija, hipertrofija nadbubrežne žlezde, blede, meko i vodenasto meso svinja, artritis, ataksija, orhitis i dr.) i da je neophodno nastaviti ispitivanja u tom pravcu.

Ristoska (2002) i Ristoska i sar. (2002) su ispitivali mogućnost upotrebe ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. u cilju utvrđivanja zdravstvenog stanja priplodnih svinja prilikom selekcije, kao i za jednostavno i efikasno otkrivanje patoloških stanja koja značajno smanjuju produktivne i reproduktivne rezultate (smanjen prirast, visoka konverzija hrane, loš kvalitet mesa, povećana smrtnost), čime bi se omogućilo i njihovo blagovremeno lečenje. Ovi autori su nazimicama u periodu polne zrelosti, u starosti od 8 meseci, aplikovali ekstrakt intramuskularno, u dozi od 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. Nespecifični znaci zapaljenske reakcije, povišena temperatura, anoreksija, letargija i ataksija, utvrđeni su 24-48h nakon aplikacije ekstrakta. Kod većeg broja nazimica promene su nestale posle 48h i one su ostale u eksploataciji do petog legla, pri čemu je zapaženo da je ekstrakt pozitivno uticao na reproduktivna svojstva, plodnost i broj živorođene prasadi. Iz priploda su isključene nazimice sa produženim znacima reakcije do 120h usled pothranjenosti, kaheksije, mišićne distrofije, subkliničkih oboljenja zglobova, kostiju, jetre i srčanog mišića. Dobijeni rezultati su nakon 24h i 48h

ukazali na leukocitozu sa veoma izraženom monocitozom (povećanje broja monocita čak 14 puta), dok je kod nazimica koje su isključene iz priploda utvrđeno i povećanje koncentracije albumina. Vrednosti ostalih hematoloških i biohemijskih parametara su bile u fiziološkim granicama.

Milanović i sar. (2004) su ispitivali uticaj vodenog ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. na imunski sistem pacova soja Wistar u starosti od 45 dana, tako što su im u pretkoloni nabor aplikovali po 0,2 ml ekstrakta razređenog fiziološkim rastvorom u odnosu 1:2, 1:4 i 1:8. Nakon 24h je utvrđena statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u ukupnom broju leukocita između kontrolne grupe kojoj je aplikovano 0,2 ml fiziološkog rastvora i grupe kojoj je aplikovan najmanje razređen ekstrakt kukureka (1:2), dok veća razređenja ekstrakta nisu imala takav efekat. Najizraženija granulocitoza je registrovana u grupi životinja kojoj je aplikovan ekstrakt razređen 2 puta, dok se sa povećanjem razređenja ekstrakta smanjivao ukupan broj leukocita, kao i procentualna zastupljenost granulocita u leukocitarnoj formuli, ali je postojala statistički vrlo značajna razlika ($P < 0,01$) ovih vrednosti između kontrolne grupe i svih grupa kojima je aplikovan ekstrakt.

Subkutana, intraperitonealna i intramuskularna aplikacija različitih koncentracija vodenog ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. dovodi kod Wistar pacova do aktiviranja brzih, nespecifičnih odbrambenih mehanizama organizma, izražene leukocitoze i povećanja broja i procenta neutrofilnih granulocita (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2006-a,b, 2007-a, 2010-a,b), kao i slabe hemolize (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2006-b, 2007-a,b, 2010-c). Utvrđeno je statistički značajno ($P < 0,05$) povišenje telesne temperature pacova 24h posle intramuskularne primene ekstrakta u dozi od 20 mg/100 g TM (za 0,44 °C), pri čemu rast temperature nije bio dugotrajan (rektalna temperatura se smanjila za 0,56 °C nakon 48h i za 0,43 °C posle 72h) (Davidović i sar., 2006-a).

Visoko mobilna grupa proteina (HMGB1) su intracelularni proteini koji se aktivno otpuštaju iz monocita i makrofaga ili pasivno iz nekrotičnih i oštećenih ćelija. Apetrei i sar. (2011-a) su utvrdili da visoko prečišćena frakcija iz *H. purpurascens* W. et K. efikasno inhibira oslobađanje HMGB1 kod eksperimentalnih životinja, čak i u kasnoj fazi septičnog šoka, i na taj način značajno povećava stopu preživljavanja glodara. Ovo jedinjenje uspešno reguliše oslobađanje HMGB1 iz aktiviranih mononuklearnih ćelija

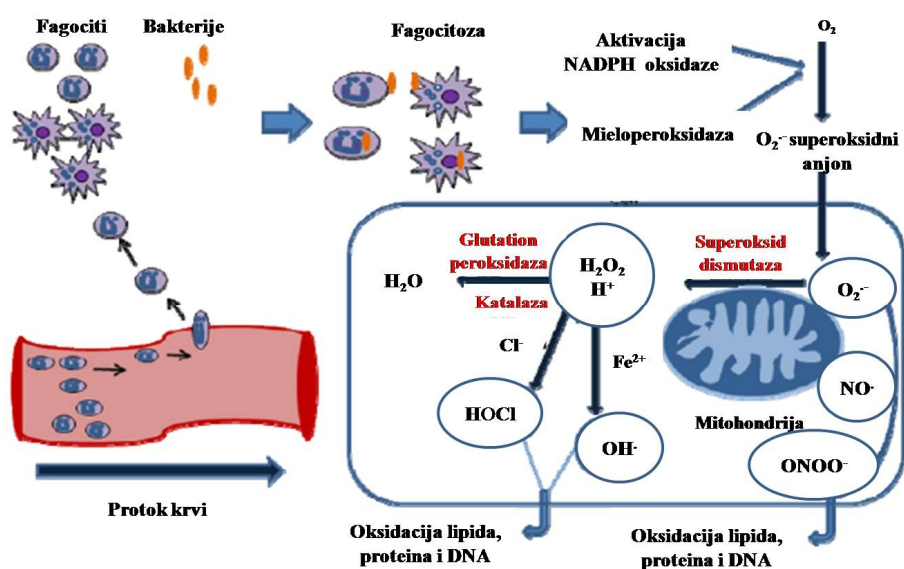
krvi i tumorskih ćelija kod čoveka. U kombinaciji sa ciklofosfamidom, dovodi do značajnog smanjenja oslobađanja HMGB1 iz tumorskih ćelija, dok sinergizam nije primećen kada je primena kombinovana sa doksorubicinom.

2.8.2. Antibakterijsko delovanje i pojava oksidativnog (respiratornog) praska

Rosselli i sar. (2007) su ispitivali antibakterijsku aktivnost ekstrakta *H. bocconei* Ten. ssp. *intermedius* i ustanovili da deluje inhibitorno na *Staphylococcus epidermalis* i *Staphylococcus aureus*. Puglisi i sar. (2009) su utvrdili da koren *H. bocconei* Ten. ssp. *siculus* sadrži supstance sa antibakterijskim delovanjem, pa smatraju da se ova biljka u tradicionalnom lečenju respiratornih bolesti kod goveda, koristi ne samo zbog imunostimulatornog i proinflamatornog delovanja, već i zbog antibakterijskih svojstava. Ovi autori su bujon mikrodilucijom, u *in vitro* uslovima, procenjivali antibakterijsku aktivnost metanolnog ekstrakta korena *H. bocconei* Ten. ssp. *siculus* i bufadienolidnih i ekdisteroidnih frakcija dobijenih iz korena, protiv sojeva bakterija koje su vodeći patogeni odgovorni za respiratorne infekcije (pneumoniju, sinuzitis, zapaljenje srednjeg uha). Ekstrakt B (bufadienolidni) je ispoljio najjače inhibitorno delovanje protiv svih testiranih mikroorganizama, a kao i ostali ekstrakti, pokazao najveću aktivnost protiv *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238 i *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta B, pri kojima nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama posle inkubacije od 18h na 35 °C, bile su niže od koncentracija ekstrakta C (ekdisteroidni) protiv ova dva mikroorganizma (0,1 mg/ml prema 0,2 mg/ml) i 8-15 puta niže od koncentracija ekstrakta A (sirovi metanolni ekstrakt korena) i ekstrakta C protiv drugih sojeva bakterija (izuzev protiv *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, gde je koncentracija bila 4 puta niža u odnosu na ekstrakt C). Međutim, antibakterijska aktivnost ekstrakta B prema *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 sojeva je 4-8 puta manja nego prema *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 i *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238 i duplo manja u odnosu na delovanje prema *Haemophilus influenzae* ATCC 49247.

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) su proizvodi prirodnog metabolizma kiseonika, koje se kontinuirano formiraju u ćelijama kao rezultat oksidativnih biohemijskih

reakcija. U fiziološkim i stresnim uslovima imaju važne funkcije u aktivnosti efektorskih odbrambenih ćelija, ćelijskoj signalizaciji, apoptozi i mobilizaciji jonskih transportnih sistema. Primarno se formiraju kao krajnji produkti mitohondrijalnog respiratornog lanca ili ih katalizuje aktivirana NADPH oksidaza nakon unošenja patogenih agenasa. Najvažnije forme su: superoksid anjon (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HClO$) i najreaktivniji hidroksilni radikal (OH^\cdot) (Sordillo i Aitken, 2009). Polimorfonuklearni neutrofilni (PMN) se aktiviraju nakon internalizacije patogena i stvaraju velike količine ROSa tokom fagocitoze. Ovaj funkcionalni odgovor, nazvan oksidativni ili respiratorni prasak, zajedno sa migracijom i degranulacijom ćelija, doprinosi odbrani domaćina, ali može dovesti i do kolateralnog inflamatornog oštećenja tkiva (Chen i Junger, 2012) (Slika 1.)



Slika 1. Šematski prikaz oksidativnog praska u fagocitu (Bruno, 2010)

U cilju ispitivanja ovog važnog PMN odgovora, razvijene su različite metode, koje se zasnivaju na proceni oksidativnog praska izolovanih PMN i PMN suspendovanih u heparinizovanoj punoj krvi, merenjem intraćelijske proizvodnje ili nastajanja ROSa u ekstracelularnom prostoru. Postoji nekoliko kongenitalnih poremećaja (hronična granulomatозна bolest) ili nedostataka, kod kojih je sprečen nastanak oksidativnog praska, usled nemogućnosti neutrofilnih granulocita da tokom aktivacije pravilno formiraju multiproteinski NADPH oksidaza kompleks na ćelijskim membranama (Hager i sar., 2010).

Pri delovanju stresnih faktora (UV zračenje, izlaganje toploti, radioaktivne materije, ciklični ksenobiotici, neki lekovi) ili u patološkim i degenerativnim stanjima, celularni nivo ROS/RNSa (slobodni radikali i neradikali kiseonika i azota) se značajno povećava, ravnoteža između njihovog stvaranja i antioksidativnog zaštitnog sistema se pomera u korist oksidacijskog stanja, što dovodi do oksidativnog stresa (Prilog 13). Antioksidativni odbrambeni sistem deluje preko enzimskih (superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza, katalaza, laktoperoksidaza, tioredoksin reduktaza i peroksiredoksini) i neenzimskih mehanizama (vitamin E, selen, askorbinska kiselina, glutathion, "heat shock" proteini, ubihinon, β -karoten, mokraćna kiselina, bilirubin) (Sharma i sar., 2011), koji odlažu, preveniraju ili uklanjaju oksidativno oštećene target molekule (Halliwell i Gutteridge, 2007). Ukoliko su ovi antioksidansi deficitarni, uzročnici oksidativnog stresa mogu da utiču na metaboličke i fiziološke procese, da oštete ćelijske lipide, proteine ili DNA, a time da ugroze funkcije ćelija, zdravstveno stanje i proizvodne sposobnosti jedinke. Nekontrolisana oksidacija može izazvati oštećenja ćelijskih struktura i tkiva, degenerativne procese povezane sa starenjem i mnoge bolesti (ateroskleroza, šećerna bolest, reumatoidni artritis), a ROS su i potencijalni kancerogeni, jer olakšavaju mutagenezu, nastajanje i napredovanje tumora. Prirodna (polifenoli, flavonoidi, vitamini, karotenoidi i druge bioaktivne biljne komponente) i sintetička jedinjenja koja imaju sposobnost da smanje generisanje i oslobađanje ili da vežu, inhibiraju i uklone reaktivne vrste kiseonika, mogu imati terapijski potencijal u smanjenju oksidacionih oštećenja nastalih prekomernim generisanjem ROSa.

Apetrei i sar. (2011-b) su, uzimajući u obzir činjenicu da antioksidativna zaštita deluje na više nivoa (inhibicija proizvodnje i oslobađanja ROSa ili uklanjanje kiseonika, katalizatorskih jona metala ili ROSa), procenjivali *in vitro* uticaj pet biljnih frakcija na pojavu respiratornog praska PMN ćelija ljudi (koristeći luminol poboljšani hemiluminometrijski metod) i njihov kapacitet za "skupljanje" slobodnih radikala (kvantifikovan pomoću dve metode u nećelijskim sistemima: ORAC za peroksilne radikale i TAC za ukupne reaktivne kiseonične vrste). Biljne frakcije (MCS-a, MCS-b, MCS-c, MCS-d razdvojena u podfrakcije MCS-Dx i MCS-EF), progresivno prečišćene iz multianjonskog jedinjenja MCS-18, izolovanog iz *H. purpurascens* W. et K., testirane su u tri različite koncentracije (1, 5 i 10 μ g) kao mogući modulatori proizvodnje i

oslobađanja ROSa iz PMN ćelija (sa ili bez *in vitro* aktivacije sa 0,6 μM Pam3Cys). Pam3Cys je specifični agonist Tool-like-receptora 2 (TLR2), čija je aktivacija praćena aktivacijom PMNs, a potom i oslobađanjem velike količine ROSa. Četiri frakcije (MCS-EF, MCS-a, MCS-c i MCS-d) deluju prooksidativno i povećavaju proizvodnju i oslobađanje ROSa iz nestimuliranih PMN ćelija (1 μg za 129,75%, 126,09, 235% odn. 181,95%; 10 μg za 114,81%, 175,36%, 133,41% odn. 112,43%), dok MCS-Dx biljna frakcija smanjuje oslobađanje ROSa (između 94,45% i 69,87%), u odnosu na kontrolu (nestimulisane PMN ćelije). Primenom MTT kolorimetrijskog testa citotoksičnosti je utvrđeno da je pri najvećoj dozi ekstrakata (10 μg) održivost nestimuliranih PMN ćelija oko 80%. Prečišćene biljne frakcije drugačije regulišu proizvodnju i oslobađanje ROSa iz Pam3Cys aktiviranih PMN ćelija u odnosu na nestimulisane ćelije. Sve frakcije, u zavisnosti od doze, smanjuju nivo ROSa za 2% (10 μg MCS-a) do 77,72% (10 μg MCS-Dx) u poređenju sa Pam3Cys kontrolom. Dejonizacioni kapacitet za peroksil radikale, utvrđen ORAC metodom, je bio visok za MCS-Dx (267,04 TE/g) i MCS-EF (226,8 TE/g), niži za MCS-a i MCS-d (169,64 TE/g odn. 153,14 TE/g), a MCS-c je imala najnižu antioksidativnu sposobnost (110 TE/g). Rezultati dobijeni TAC necelularnim testom ukazuju da je MCS-Dx moćan antioksidans za ukupne ROS (1156,92 μM askorb. kis./g), MSC-EF ima antioksidativnu aktivnost 967,34 μM askorb. kis./g i da MCS-a, MCS-c i MCS-d imaju nisku dejonizacionu aktivnost (od 289,92 μM do 237,72 μM askorb. kis./g). Prečišćena frakcija MCS-Dx značajno smanjuje nivo ROSa u poređenju sa kontrolom, bez značajne promene ćelijske vitalnosti, snažan je dejonizator reaktivnih kiseoničnih vrsta i može se koristiti kao adjuvans u antioksidativnoj terapiji.

Čakar i sar. (2011) su procenjivali antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost etanolnih i vodenih ekstrakata osušenih listova i podzemnih organa tri *Helleborus* taksona. Rezultati DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) testa su ukazali da je antioksidativna aktivnost ekstrakata lišća svih vrsta kukureka bila veća u odnosu na aktivnost ekstrakata korena i pozitivne probe (timola). Ekstrakt korena *H. odorus* W. et K. je pokazao veću efikasnost u pogledu smanjivanja koncentracije DPPH slobodnih radikala nego timol, dok su ekstrakti podzemnih organa *H. multifidus* Vis. i *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew bili manje aktivni. Između sadržaja fenolnih glikozida u ekstraktima i antioksidativne aktivnosti ekstrakata utvrđena je statistički

značajna korelacija. Antioksidativna aktivnost je uglavnom rezultat redoks mogućnosti polifenolnih jedinjenja, koja imaju značajnu ulogu u adsorbovanju i neutralisanju slobodnih radikala, uklanjanju singlet ($1SgO_2$) i triplet kiseonika (O_3) ili razlaganju peroksida. Sa druge strane, ekstrakti korena sve tri vrste kukureka su ispoljili jače antiproliferativno delovanje, prema B ćelijskoj liniji Burkitt limfoma, nego ekstrakti dobijeni iz lišća. Inhibicija je bila dozno zavisna i najizraženija pri 2 μ l ekstrakta po ml medijuma. Najveći procenat inhibicije rasta ćelija je utvrđen prilikom testiranja vodenog ekstrakta korena *H. multifidus* Vis. (50,14%) i *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew (49,04%). Nasuprot tome, vodeni ekstrakt lišća *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew je uzrokovao najnižu inhibiciju ćelijskog rasta (8,59%), ali je istovremeno ispoljio snažnu antioksidativnu aktivnost. Utvrđena je negativna korelacija između inhibicije ćelijske proliferacije i antioksidativne aktivnosti, kao i između antiproliferativnog delovanja i sadržaja fenola u ekstraktima.

2.8.3. Uticaj na koncentraciju proteina akutne faze i status elektrolita krvnog seruma

Akutni inflamatorni odgovor je važna sistemska reakcija organizma na lokalne ili sistemske poremećaje homeostaze uzrokovane infekcijom, oštećenjem tkiva, traumom, rastom neoplazija ili imunološki posredovanim oštećenjima. U toku ovog odgovora na stresne stimulse, proinflamatorni citokini (IL-1 α / β , IL-6, IL-8, TNF- α / β i IFN- α / β) aktiviraju prekursore ćelija bele krvne loze u koštanoj srži, podstiču rast fibroblasta i makrofaga i stimulišu hepatocyte na proizvodnju velike količine proteina akutne faze (APP), kao deo nespecifičnog odbrambenog mehanizma organizma (Gruys i sar., 2005). Nekoliko časova nakon infekcije značajno se povećava sinteza određenih proteina, koji se označavaju kao pozitivni APP (fibrinogen, haptoglobin, serum amiloid A, α_1 -kiseli glikoprotein, α_2 -makroglobulin, C-reaktivni protein, komplement faktor C3, monozin vezujući protein), a istovremeno se smanjuje produkcija negativnih APP s. "acute booster reactants" (prealbumin, albumin, transferin, transtiretin, retinol vezujući protein, kortizol vezujući globulin). Maksimalna serumska koncentracija APP se obično registruje nakon 24 do 48h, ali se ovi proteini detektuju i nekoliko dana kasnije. U veterinarskoj medicini se mogu koristiti kao nespecifični indikatori zdravstvenog stanja

životinja (kontrolu svinja na nivou stada, detekciju mastitisa kod mlečnih krava, prognozu ishoda respiratornih oboljenja konja) (Petersen i sar., 2004).

Hajrulai (2001) i Hajrulai i sar. (2002) su ispitivali uticaj intramuskularne aplikacije ekstrakta rizoma i korena *H. odoratus* W. et K. u dozi od 450 µg/kg TM na proteinski status jagnjadi Virtenberg rase, u starosti od 55 dana. Srednje vrednosti koncentracije ukupnih proteina i albumina u krvnom serumu 7. dana i 14. dana nakon tretmana ekstraktom nisu odstupale od fizioloških granica. Sedam dana posle tretmana jagnjadi ekstraktom, zabeleženo smanjenje koncentracije albumina je bilo 6% ($P < 0,05$), a posle 14 dana 2%. Nivo $\alpha 1$ i $\alpha 2$ globulina je pre aplikacije ekstrakta bio viši za 11,5%, a nivo γ globulina za 21,5% niži u poređenju sa vrednostima kod telesno zrelih jedinki. Srednje vrednosti koncentracija ovih klasa globulina u plazmi su bile najviše 7. dana, a β globulina 14. dana, dok su najniže koncentracije $\alpha 1$ i $\alpha 2$ globulina zabeležene 14. dana, γ globulina pre aplikacije ekstrakta i β globulina 7. dana. Jagnjad u starosti od 55 dana imala su samo 4%, od 62 dana 9% i od 69 dana 8% γ globulina od ukupnih serumskih proteina, što znači da je 7 dana posle aplikovanja ekstrakta zabeleženo povećanje koncentracije γ globulina za 5%, a posle 14 dana za 4%. Albuminsko-globulinski količnik (A/G) je pre aplikacije ekstrakta iznosio 1,2 (32,7/26,91), 7 dana po aplikaciji 0,96 (30,1/31,25) i 14 dana nakon aplikacije 1,15 (31,6/27,31). Dobijeni rezultati su ukazali da je ekstrakt kukureka delovao imunostimulatorno, a izvesna disproteinemija, koja se odnosi na γ globuline, bila je u vezi sa uzrastom ispitivane jagnjadi. Naime, aktivna sinteza γ globulina počinje intenzivno da se odvija kod jagnjadi u starosti od 55 dana, jer tada više praktično nema pasivno unetih γ globulina (iz kolostruma) koji deluju supresivno na sintezu imunoglobulina.

Rezultati ispitivanja uticaja istog ekstrakta, na promenu vrednosti koncentracije ukupnih proteina i albumina kod nazimica, 24h nakon intramuskularne aplikacije, su ukazali na statistički visoko značajnu ($P < 0,001$) hiperalbuminemiju (za 34% veća od maksimalne referentne vrednosti) sa normoglobulinemijom (Ristoska 2002). Utvrđena vrednost A/G (1,44) je bila za 64-74% veća u odnosu na fiziološke vrednosti ($A/G = 0,70-0,80$) i ta razlika je bila statistički signifikantna. Dobijeni rezultati su naveli autora na zaključak da hemijski sastojci ekstrakta kukureka dospevaju adsorptivnom pinocitozom u hepatocite, utiču na njihov metabolizam i stimulišu ih na povećanu sintezu proteina, a pre svega albumina.

Tosevski i sar. (2004) su intradermalno aplikovali po 0,450 mg/kg TM ekstrakta *H. odorus* W. et K. prasadima u starosti od 35 dana i 55 dana i utvrdili da je kod mlađe prasadi, proteinemija bila nešto niža od fizioloških vrednosti 7. i 14. dana nakon primene ekstrakta, dok je kod prasadi druge grupe, 14. i 21. dana posle tretmana proteinemija bila u granicama referentnih vrednosti. Koncentracija albumina je kod prasadi uzrasta od 35 dana, posle primene ekstrakta bila bliža maksimalnim referentnim vrednostima (odnos A/G=1,16), a kod prasadi u uzrastu od 52 dana, tretman ekstraktom kukureka je doveo do povećanja ove vrednosti za 6% (odnos A/G=0,87).

Intramuskularna primena ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. u dozi 10 mg/kg TM, termički tretiranog ili dijalizovanog ekstrakta kod Wistar pacova je rezultirala statistički značajnim povećanjem brzine sedimentacije eritrocita i koncentracije fibrinogena, kao i smanjenjem koncentracije albumina (Davidović, 2006).

Rezultati istraživanja većeg broja autora su ukazali da primena ekstrakta *Helleborus* L. utiče na promenu koncentracije makroelemenata u krvnom serumu životinja. Stojkovski i sar. (1999) su utvrdili da 7. i 21. dana od intramuskularne aplikacije po 0,450 mg/kg TM ekstrakta *Helleborus* L. grupi od 20 svinja, dolazi do značajnog povećanja koncentracije natrijuma (7,19%, odn. 2,5%) i kalijuma (13,74%, odn. 7,53%) u poređenju sa kontrolnim serumom analiziranim prvog dana. Ovi autori smatraju da promene koje ekstrakt kukureka izaziva u metabolizmu natrijuma i kalijuma, mogu imati uticaj na njihovu regulaciju ćelijskih funkcija i kontrolu ćelijske aktivnosti. Tokom oglada nisu utvrđene promene u koncentraciji kalcijuma i gvožđa u krvnom serumu.

Tosevski i sar. (2004) su utvrdili da ekstrakt cele biljke *H. odorus* W. et K., aplikovan prasadima različite starosti, u dozi od 0,450 mg/kg TM, dovodi do povećanja koncentracije elektrolita u krvnom serumu: kod prasadi uzrasta 35 dana koncentracija natrijuma je 7., odn. 14. dana oglada bila veća za 12%, odn. za 6%, a kalijuma za 15%, odn. 10%; natrijemija (Na) se kod prasadi u uzrastu od 52 dana povećala 14. dana za 9% i 21. dana za 5%, a kalijemija (K) se u istom periodu povećala za 19% odn. 12%. Kod prasadi obe ispitivane kategorije koncentracije serumskog kalcijuma i gvožđa su bile u granicama referentnih vrednosti.

Rezultati oglada u kome su Hajrulai-Musliu i sar. (2004) i Tosevski i sar. (2004) aplikovali ekstrakt rizoma i korena *H. odorus* W. et K. u dozi od 0,450 mg/kg TM, 31

grlu Vitenberg jagnjadi, oba pola, u starosti od 50-60 dana, slični su rezultatima dobijenim u prethodno navedenim istraživanjima sadržaja elektrolita. Sedmog i četrnaestog dana nakon tretmana, u krvnom serumu jagnjadi je utvrđeno statistički značajno povećanje koncentracije natrijuma (11%), fosfora (14%, odn. 8%) i kalijuma (14%, odn. 7%), u odnosu na vrednosti pre aplikacije ekstrakta. Koncentracija kalcijuma se tokom ogleda održala u granicama referentnih vrednosti, dok je sadržaj hlorida bio niži od fizioloških vrednosti (za 23% pre aplikacije ekstrakta, 26% sedmog dana i 21% četrnaestog dana), ali razlike između grupa nisu bile statistički značajne.

2.8.4. Antitumorska (antikancerogena) aktivnost

Hemoterapeutici deluju tako što izazivaju apoptozu tumorskih ćelija (programiranu ćelijsku smrt) ili sprečavaju njihove deobe. U mnogim slučajevima, ova jedinjenja su neefikasna jer tumorske ćelije poseduju brojne signalne puteve koji deluju protiv različitih citotoksičnih insulata (Lefranc i sar., 2005). Aktuelna naučna istraživanja usmerena su na pronalaženje novih jedinjenja, koja su u stanju da savladaju višestruke odbrambene mehanizme ovih ćelija, koji su bar delimično odgovorni za neuspeh postojećih hemoterapijskih sredstava.

Lipidne komponente nekih *Helleborus* sp. (*H. abchasicus*, *H. caucasicus* A. Br.) pokazuju specifičnu antitumorsku (antikancerogenu) aktivnost prema izolovanim tumorskim ćelijama, bez opšteg toksičnog dejstva (Serebryakov, 1982; Andguladze i sar., 1983; Dalakishvili i sar., 1990). Na bazi ovih supstanci je razvijen preparat Hellipol za lečenje malignih površinskih tumora, koji vrši lizu plazma membrane tumorskih ćelija, dok primena nelitičkih koncentracija rezultira znatnom inhibicijom transporta jona kalijuma i aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aze (Kemertelidze i Dalakishvili, 1996). Steroidi iz podzemnih organa *H. caucasicus* A. Br. ispoljavaju jaku citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama karcinoma pluća (A-549) i debelog creva (DLD-1), pri čemu je njihova citotoksična doza prilično niska (2×10^{-9} g/ml) (Muzashvili i sar., 2006-b; Kemertelidze, 2007). Mimaki i sar. (2003) su utvrdili da je tridezmozidni spirostanol helebosaponin C, izolovan iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam., ispoljio umerenu citotoksičnu aktivnost sa IC_{50} vrednošću od 15,8 $\mu\text{g/ml}$ prema HSC-2 skvamoznim ćelijama karcinoma ljudi (IC_{50} pozitivnih kontrola etopsida i

doksorubicina je 24,4 i 2,5 µg/ml). Slično citotoksično delovanje (IC₅₀ vrednost 16 µg/ml) furospirostanol saponozida, izolovanog iz metanolnog ekstrakta iste biljne vrste, prema HSC-2 ćelijama zabeležili su i Watanabe i sar. (2005), dok izolovani spirostanol saponozidi nisu ispoljili značajniju citotoksičnost prema kulturama HSC-2 ćelija karcinoma, melanomskih A375 ćelija i HepG2 ćelija hepatoma čoveka (Watanabe i sar., 2003). Biološku aktivnost komponenata, različitih koncentracija (1-1000 µM), izolovanih iz metanolnog ekstrakta *H. bocconei* Ten. ssp. *intermedius* Rosselli i sar. (2009) su ispitivali na malignim C6 glioma ćelijama pacova. Ovi autori su utvrdili da jedinjenje dobijeno enzimskom hidrolizom heleborozida B, furospirostanol saponin i polipodin B ispoljavaju jak dozno zavisni citotoksični efekat (inhibicija rasta malignih ćelija je 60-70% pri koncentraciji od 1000 µM). Mimaki i sar. (2010) su utvrdili, da su od deset furostanol saponozida izolovanih iz metanolnog ekstrakta rizoma *H. orientalis* Lam., dva monodezmozidna furostanol glikozida ispoljila umerenu citotoksičnu aktivnost prema HSC-2 ćelijama karcinoma ljudi, sa IC₅₀ vrednošću od 43 i 15 µg/ml (IC₅₀ etopsid pozitivne kontrole je 24 µg/ml). Derivati ovih jedinjenja, kao i drugi bidezmozidni furostanol glikozidi nisu ispoljili citotoksično delovanje prema HSC-2 ćelijama u koncentracijama od 100 µg/ml. Vochita i sar. (2011) su ukazali na potencijalni citostatski i citotoksični efekat polifenolnih jedinjenja iz vodenog (HphE) i hidroalkoholnog ekstrakta korena i rizoma *H. purpurascens* W. et K. (HphaE) na HeLa ćelije raka (inhibicija tumorskih ćelija 59,46-90%).

Upotreba ekstrakta podzemnih organa *Helleborus* L. kod inflamatornih hroničnih hiperplastičnih procesa, tipa keloida kod konja i karcinoma mlečne žlezde kuja, dovodi do njihovog akutiziranja praćenog nekrolizom. Za 24-48h posle intrafokalne aplikacije 10 ml injekcionog rastvora ekstrakta kod konja i 1-3 ml injekcionog rastvora ekstrakta u tumorsko tkivo kuja, na mestu aplikacije razvija se intenzivna inflamatorna reakcija praćena izrazitom nekrolizom, a nakon 5 dana dolazi do autodrenaže tumora (Bolte i sar., 1992).

Potencijalni mutageni i karcinogeni efekat biljaka roda *Helleborus* L., Büssing i Schweizer (1998) su procenjivali na osnovu uticaja ekstrakta na DNA i destabilizaciju imunokompetentnih ćelija. Ovi autori su utvrdili da *in vitro* aplikovan vodeni ekstrakt *H. niger* L. različite koncentracije, indukuje statistički značajno povećanje metafazne razmene sestrinskih hromatida (SCE) u po tri od pet kultura perifernih krvnih

mononuklearnih ćelija (PBMC) zdravih osoba tretiranih sa 1 ili 10 µg/ml i u svih pet uzoraka tretiranih sa 50 ili 100 µg/ml, u odnosu na kontrolu bez ekstrakta. Međutim, u poređenju sa uzorcima tretiranim sa 40 µg/ml ciklofosfamida (pozitivna kontrola- imunosupresor) povećanje nivoa SCE indukovano biljnim ekstraktom je bilo relativno slabo. Proliferativni indeks izolovanih limfocita je bio značajno povećan samo prilikom dodavanja 10 µg/ml ekstrakta, a u ostalim slučajevima se vrlo malo povećao, jer je broj CD3⁺ T-ćelija ostao skoro nepromenjen. Povećana inkorporacija [³H]timidina u DNA limfocita, u četiri od pet uzoraka tretiranih sa 1 µg/ml ekstrakta, ukazala je na pojavu novosintetisane DNA u proliferisanim ćelijama, dok se sa povećanjem koncentracije, stimulacioni indeks cele grupe smanjio, ali ipak ostao veći nego u netretiranim uzorcima. Koncentracija citokina IL-2 i TNF-α, koji povećavaju frekvenciju SCE, nije se menjala značajno u supernatantu PHA-aktivisanih kultura PBMC tretiranih ekstraktima različite koncentracije (1, 10 ili 100 µg/ml), mada postoji individualna osetljivost uzoraka. Utvrđeno je i da se dodavanjem ekstrakta, na površini T limfocita ne menja ekspresija IL-2 receptora (CD25) i transferinskih receptora (CD71) potrebnih za ćelijsku proliferaciju. Ovo ukazuje da sam ekstrakt ne može indukovati blastnu transformaciju ćelija. Iz dobijenih rezultata je izveden zaključak da vodeni ekstrakt *H. niger* L., zavisno od koncentracije, može da deluje imunomodulatorno i da utiče na destabilizaciju DNA, pri čemu u ispoljavanju ovog efekta postoje individualne razlike, tako da potencijalno može imati mutageni efekat na periferne mononuklearne ćelije krvi ljudi.

Petruť i Bolte (2001) su ispitivali antikancerogeni potencijal prečišćenog ekstrakta *Helleborus* sp. prema Walker tumoru 256 kod pacova, i pri tom utvrdili da ekstrakt usporava dinamiku razvoja ascita obolelih pacova, smanjuje količinu peritonealne tečnosti i produžava vreme preživljavanja za 3-7 dana. Izvršena je "kancerizacija" 16 pacova soja Wistar, starosti 5-7 meseci, intraperitonealnim implantiranjem 2x1 ml tumorskih ćelija (2×10^6 ćelija u 0,5 ml fiziološkog rastvora), a nakon 24h, polovini od ukupnog broja pacova je aplikovano SC po 0,5 ml prečišćenog ekstrakta *Helleborus* sp. Obim abdomena pacova I grupe sa tumorskim implantatom bio je povećan nakon 7 dana u proseku za 2,2 cm, a nakon 12 dana za 3-5 cm, što je bilo za 15-25% više u odnosu na II grupu tretiranu i ekstraktom, i značajno veći u odnosu na nekancerizovane pacove III (SC aplikovano po 0,5 ml sterilnog fiziološkog rastvora) i

IV grupe (SC aplikovano po 0,5 ml prečišćenog ekstrakta *Helleborus* sp.), kod kojih su ove vrednosti bile nepromenjene tokom celog eksperimenta. Prečišćen ekstrakt *Helleborus* sp. aplikovan pacovima IV grupe, izazvao je pojavu lokalne inflamatorne reakcije slabog intenziteta u trajanju od 48h, koja je potpuno nestala posle 72h. Konstatovana je i razlika u boji peritonealne tečnosti. Kod pacova sa ascitičnim tumorom kojima nije aplikovan ekstrakt, njena boja je bila limun žuta, dok kod pacova koji su dobili ekstrakt ona je bila crvenkasta. U toku 12 dana nisu primećene druge lokalne ili opšte promene (promene telesne težine, apetita i grupnog ponašanja jedinki). Ovi autori su u drugom ogledu utvrdili, da se vreme preživljavanja produžava za 3-7 dana, kada se pacovima sa intraperitonealno implantiranim tumorskim ćelijama, dvokratno (1. i 7. dana) aplikuje SC po 0,5 ml prečišćenog ekstrakta *Helleborus* sp. (vreme preživljavanja je 22,5 dana) u odnosu na kancerizovane pacove koji nisu tretirani ekstraktom kukureka (vreme preživljavanja je 16,87 dana).

Lindholm i sar. (2002) su u cilju pronalaženja novih supstanci sa antitumorskim delovanjem, u preliminarnim ispitivanjima *in vitro*, testirali citotoksično delovanje 100 frakcionisanih biljnih ekstrakata (koncentracije 50, 10 i 2 µg/ml) protiv tumorskih ćelija pluća embriona čoveka (HEL) i T ćelija (MT4). Od ovih 100 ekstrakata, izabrano je 30 koji su ispoljili najveće citotoksične vrednosti, a zatim je ispitivan njihov antitumorski potencijal prema ćelijskim linijama karcinoma bubrega (ACHN) i jajnika (OVCA), T leukemijskih ćelija (CCRF-CEM) i hronične limfocitne leukemije (CLL). Na osnovu dobijenih rezultata, u dalja istraživanja je uključeno 10 ekstrakata, čija je antikancerogena aktivnost praćena na 10 linija i podlinija različitih tumora čoveka (mijeloma, histiocitnog limfoma, kancera pluća, bubrežnog adenokarcinoma i leukemije). Sedam frakcionisanih biljnih ekstrakata, među kojima i *H. cyclophyllus* Boiss., ispoljilo je značajnu citotoksičnu aktivnost pri koncentracijama nižim od 50 µg/ml, u četiri ili više tumorskih ćelijskih linija.

U cilju ispitivanja terapijskih efekata i identifikovanja glavnih mehanizama delovanja *H. niger* L., Jesse i sar. (2009) su inkubirali vodeni ekstrakt cele biljke različitih koncentracija (0,1 do 0,75 mg/ml), sa ćelijskim linijama limfoma (BJAB), leukemije (Reh, Nalm6, Sup-B15), melanoma (Mel-HO) i matičnim ćelijama koštane srži dece obolele od akutne limfoblastne leukemije (ALL) ili akutne mieloidne leukemije (AML). Posle 4h izmereno je nisko oslobađanje LDH karakteristično za

ćelijsku smrt apoptozom, nakon 24h detektovana je snažna, koncentraciono zavisna inhibicija proliferacije do 96,5%, a analiza ćelijskog ciklusa posle 72h otkrila je specifične hipoploidne DNA fragmente, kao krajnje proizvode apoptotskih kaskadnih reakcija. Ove promene su otkrivene u ćelijskim linijama limfoma i leukemije, ali i B ćelijama prekursorima leukemijskih ćelijskih linija. Specifična indukcija apoptoze je izvedena preko unutrašnjeg, mitohondrijalnog puta, obradom prokaspaze 3 i pojavom aktivne kaspaze 3 nakon 36h, gubitkom mitohondrijalnog membranskog potencijala posle 48h, a delimično je zavisila od ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2. Ekstrakt (140, 210 µg/ml) je ispoljio aditivni efekat u kombinaciji sa citostatičkim lekovima etopsidom i citarabinom, a jak sinergetski efekat sa vinkristinom (2 i 3 nM) i porast indukcije apoptoze i do 208%, nakon 72h inkubiranja sa BJAB ćelijama. U matičnim ćelijama pacijenata sa ALL i AMM, koje su delom slabo reagovale na citostatike doksorubicin ili daunorubicin, utvrđena je jaka indukcija apoptoze.

Jesse i sar. (2007, 2008) su na isti način ispitivali citotoksični efekat četiri različita standardizovana vodena ekstrakta *H. niger* L. – ekstrakt cele biljke, ekstrakt korena, ekstrakt lišća i ekstrakt cvetova (HISCIA[®], Arlesheim, Switzerland, Lot.No. 5201). Ovi autori su utvrdili da je jača indukcija apoptoze, kod različitih ćelijskih linija kancera, uzrokovana ekstraktom korena nego ostalim ekstraktima. Delebinski i sar. (2012) su dokazali da ekstrakt *H. niger* L. izaziva vremenski i dozno zavisnu inhibiciju proliferacije NXS2 ćelijske linije neuroblastoma i aktivaciju mitohondrijalnog signalnog puta apoptoze. Western blot analiza je otkrila uključivanje kaspaza 8 i 9 u izazivanje programirane ćelijske smrti, ali inkubacija sa inhibitorima kaspaza nije sprečila apoptozu, tako da uloga kaspaza ostaje nejasna.

Utvrđeno je da određeni biljni kardenolidi (Mijatović i sar., 2008; Rashan i sar., 2011), bufadienolidi biljnog (Moodley i sar., 2007; Kuo i sar., 2008; Gao i sar., 2011) i životinjskog porekla (Kamano i sar., 1998; Cunha-Filho i sar., 2010; Xie i sar., 2011; Qi i sar., 2011), kao i bufadienolidi nastali biotransformacijom (Ye i sar., 2003, 2004; Zhang i sar., 2007) deluju antineoplastično i inhibiraju rast tumorskih ćelija u *in vitro* uslovima. U nekoliko saopštenja je izneto citotoksično delovanje bufadienolida *in vivo* na humane ćelije karcinoma transplatirane miševima (Han i sar., 2007; Li i sar., 2011). Minimalne strukturne modifikacije bufadienolidnih glikozida izazvane mikrobiološkom transformacijom značajno menjaju njihovu citotoksičnu aktivnost (Ye i sar., 2004; He i

sar., 2006; Ma i sar., 2007). Watanabe i sar. (2003) su utvrdili da bufadienolidi izolovani iz rizoma *H. orientalis* Lam. ispoljavaju različitu citotoksičnu aktivnost prema kultivisanim tumorskim ćelijama. Izražena je citotoksičnost prema HSC-2 humanim skvamoznim ćelijama karcinoma, melanomske A375 humane ćelije su delimično osetljive. Humane ćelije HepG2 hepatoma su relativno rezistentne prema njima. Neki bufadienolidni glikozidi deluju i na tumorske ćelije i na normalne humane ćelije pulpe (HPC), dok su drugi (bufadienolid ramnozidi) visoko specifični prema tumorima i pokazuju slabu citotoksičnost prema HPC. Ovo ukazuje da šećerna komponenta bufadienolida doprinosi njihovom specifičnom delovanju. Citotoksična aktivnost (IC_{50}) novih bufadienolida, izolovanih iz rizoma *H. thibetanus* Franch., prema četiri linije kancerskih ćelija čoveka (3LL, MCF-7, QGY-7701 i BGC-823) utvrđena MTT testovima, kretala se od 105,23 do 253,12 $\mu\text{g/ml}$ za tigenkaozid A i od 56,54 do 86,45 $\mu\text{g/ml}$ za tigenkaozid B (Yang i sar., 2010).

Uprkos brojnim ispitivanjima (Hong i sar., 2007; Schoner i Scheiner-Bobis, 2007; Yu i sar., 2008; Prassas i Diamandis, 2008; Bagrov i sar., 2009; Li i sar., 2009; Sun i sar., 2009), citotoksični potencijal i selektivnost bufadienolida kao i mehanizmi njihovog inhibitornog delovanja su u većini slučajeva ostali nepoznati. Mijatović i sar. (2007) i Bagrov i sar. (2009) su ispitivali mogućnost kardioaktivnih steroida da deluju antineoplastično inhibicijom Na^+/K^+ -ATP-aze, polazeći od hipoteze da je transmembranski transport katjona veoma izražen tokom transformacije malignih ćelija u veoma ranim fazama razvoja tumora, čak i pre morfološkog dokaza tumora (Davies i sar., 1991; Weidemann, 2005). Usled male terapijske širine bufadienolida postoji rizik od srčane toksičnosti, pa je zbog toga sve veća potražnja za bioaktivnim analogima sa poboljšanom terapijskom aktivnošću i smanjenom toksičnošću ili bez nje. Daniel i sar. (2003) su analizirali citotoksični efekat prirodnog bufadienolidnog glikozida helebrina (0,1-100 μM N65) sa kardiotoničnim delovanjem i njegovih umereno (100 μM N34, N35, N83, N8) ili snažno (100 μM N10) hemijski modifikovanih derivata bez kardioaktivnih grupa (C14 hidroksilne grupe i 17 β laktona) na maligne T limfoblaste (Jurkat ćelije) i normalne mononuklearne ćelije krvi čoveka (PBMC). Ovi autori su utvrdili da je helebrin indukovao snažnu vremenski zavisnu apoptozu tumorskih ćelija, dok je uticaj na PBMC bio minimalan. Derivati N8, N34 i N83 koji nisu kardioaktivni, ispoljili su slabiju, ali takođe značajnu citotoksičnu aktivnost prema tumorskim

ćelijama, dok je efekat na zdrave ćelije bio vrlo mali. Uklanjanje hemijskih grupa koje su odgovorne za inhibiciju enzima Na^+/K^+ -ATP-aze nije sprečilo apoptotični efekat, što navodi na zaključak da i drugi mehanizmi učestvuju u bufadienolidima indukovanoj apoptozi. Apoptoza je aktivan proces, koji uključuje seriju morfoloških i biohemijskih promena čiji krajni ishod je ćelijska smrt. Ima glavnu ulogu u embriogenezi, karcinogenezi i ubijanju virusom inficiranih ćelija. Karakteristična odlika apoptoze je aktiviranje klasičnih kaspaza (cistein proteaza) zavisnih puteva sa oštećenjem mitohondrija i oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora. Citohrom *c* (Apaf 2 - apoptotic protease activating faktor 2) u interakciji sa Apaf 1 dovodi do oligomerizacije i indukuje formiranje kompleksa između Apaf 1 i kaspaze 9 označene kao Apaf 3, koja dalje proteolitički aktivira "dželat" kaspaze, uključujući i kaspazu 3. Ona pokreće DNA fragmentaciju aktiviranjem nukleaze DFF40/ICAD odgovorne za razdvajanje DNA na internukleozomalne fragmente. Fosfatidil serin izlazi iz ćelije i postaje vidljivo izložen na površini ćelijskih membrana (eksternalizacija) što omogućava makrofagima da ga prepoznaju. Helebrin i njegovi derivati uzrokuju značajnu promenu mitohondrijalnog transmembranskog potencijala i intranukleozomalnu DNA fragmentaciju u tumorskim ćelijama 24h nakon primene, a u prisustvu Bcl-2 i inhibitora kaspaza (širokog spektra ili specifičnih) značajno se povećava procenat preživljavanja malignih ćelija. Maligne ćelije sadrže vrlo nizak nivo Bcl-2 proteina, koji su lokalizovani u mitohondrijalnim membranama i imaju ulogu da štite ćelije od pokretanja apoptoze, posredovane bufadienolidima, inhibicijom aktivacije MAPK (mitogen-activated protein kinase), smanjivanjem mitohondrijalne propustljivosti i oslobađanja aktivatora kaspaza (citohroma *c* i Apaf 1), sprečavanjem promene mitohondrijalnog transmembranskog potencijala, DNA fragmentacije, fosfatidil serin translokacije i normalizovanjem funkcija mitohondrija. Ova istraživanja su ukazala da helebrin i njegovi hemijski modifikovani derivati imaju snažno antiproliferativno delovanje i da uništavaju tumorske ćelije, a kako apoptoza za razliku od nekroze ne izaziva inflamaciju, mogu biti idealne supstance za lečenje kancera. Terapijska upotreba helebrina može biti ograničena zbog propratnog kardiotoksičnog delovanja, ali su supstance N8, N34 i N83 koje ne deluju na srčanu aktivnost, potencijalni kandidati u antitumorskoj terapiji.

2.8.5. Analgetsko, antiinflamatorno i supresivno delovanje na T limfocite

U vetrinarskoj praksi se u terapiji inflamatornog bola i u cilju smanjenja neželjenih efekata aktivnosti imunološkog sistema (sprečavanja alergijskih i autoimunih reakcija i odbacivanja transplantata) primenjuju brojni imunosupresori (nesteroidni i steroidni). Međutim, jake nuspojave i neželjeni efekti na druge organske sisteme, donekle neizvesni efekti na ciljne ćelije i/ili inkompatibilnost često ograničavaju njihovu primenu. Zbog toga postoji potreba za novim i specifičnim terapeutcima sa manje neželjenih efekata (Littmann i sar., 2008).

Bolte i sar. (1994) su ispitivali efikasnost periartikularne, paravertebralne ili perineuralne primene ekstrakta kukureka, poznatog pod trgovačkim imenom Boicil forte, u lečenju degenerativnih artropatija koje su dominantne u patologiji lokomotornog aparata kod pasa (torako-lumbalne diskopatije i displazija lakta i kuka). Terapijska efikasnost (procenjivana na osnovu intenziteta bola, stepena hromosti, dužine terapijskog efekta i neželjenih efekata) samog preparata Boicil forte je bila 71%, a primenjenog zajedno sa alopatskim lekovima (vitaminima, mineralima i analgetskim i antiinflamatornim lekovima) 81%, pri čemu su u odnosu na konvencionalni način lečenja rezultati bili bolji za 35-53%. Neželjeni efekti prilikom primene Boicil forte zabeleženi su samo u 1% slučajeva, a manifestovali su se svrabom i malim otokom na mestu aplikacije, koji su nestajali nakon 1-3 dana.

U razvoj inflamatornog odgovora uključeni su različiti medijatori (posrednici): prostaglanini, leukotrijeni, citokini i faktor aktivacije trombocita. Delovanje ekstrakata određenih biljnih vrsta koje se koriste u tradicionalnoj medicini u lečenju edema i hroničnih inflamatornih bolesti (reumatizam, reumatoidni artritis) se bazira na inhibiciji inflamatornih citokina poreklom od makrofaga: interleukina-1 α , interleukina-1 β i tumor nekrotičnog faktora α (Yeşilada i sar. 1997). U turskoj tradicionalnoj medicini, rizom, koren i cela biljka *H. orientalis* Lam. koji sadrže helebrin samo u tragovima, koriste se *in vivo* u cilju otklanjanja bola i antiinflamatornog delovanja. Erdemoglu i sar. (2003) su utvrdili da peroralna primena etanolnog i vodenog ekstrakta podzemnih organa ili cele biljke ove vrste kukureka, kod Swiss albino miševa (20-25 g TM) u dozi od 500 mg/kg, značajno smanjuje broj abdominalnih kontrakcija i pojavu edema šape, posle

intraperitonealne aplikacije 2,5% *p*-benzokvinona odn. karaginana u subplantarno tkivo desne zadnje šape, 60 min nakon tretmana ekstraktima kukureka.

TRPV1 (vaniloid tip receptora za bol) su polimodalni receptori, odn. neselektivni katjonski kanali u nociceptivnim završecima u koži i visceralnim tkivima, koji se aktiviraju delovanjem štetnih stimulusa, kao što su visoka temperatura ($>40^{\circ}\text{C}$), rastvori kiselina, masnokiselinski derivati arahidonske kiseline i egzogene komponente slične kapsaicinu. Aktiviranje ovih receptora izaziva depolarizaciju, generisanje akcionog potencijala, unošenje kalcijuma i aktiviranje kalcineurina, što dovodi do neurogenog zapaljenja, preko oslobađanja tahikininu sličnog kalcitonin-gen-vezanog-peptida (CGRP), neurokinina A i supstance P iz nociceptivnih završetaka, uključujući vazodilataciju, edem i bol (Veronesi i Oortgiesen, 2006). Zbog istaknute uloge TRPV1 u pojavi bola kod hroničnih inflamatorih stanja i neuropatskog bola (usled lezija nerava), posebna pažnja je usmerena na razvoj TRPV1 antagonista za kliničku upotrebu. Neascu i sar. (2010) su izvestili da je aktivna supstanca MCS-18 izolovana iz korena *H. purpurascens* W. et K., jak, specifični, koncentraciono zavisni i reverzibilni antagonista kapsaicin receptora, TRPV1, izraženih u dorzalnim korenovima ganglijskih (DRG) neurona pacova, čime se objašnjava njegovo analgetsko delovanje. Aplikovan u dozi od 1 $\mu\text{g/ml}$, MCS-18 je inhibirao porast intracelularne koncentracije kalcijuma u DRG neuronima nakon aktiviranja TRPV1 kapsaicinom (300 nM, 15 s) i niskim pH (5,5, 15 s), ali ne i toplotom (43°C , 15 s). Supstanca nije imala efekat na odgovore posredovane kiselina – osetljivim jonskim kanalima (ASICs) izraženim u senzornim neuronima, kao ni cinamaldehydom, agonistom neselektivnog katjenskog kanala TRPA1. Ovi rezultati su ukazali da MCS-18 nije neselektivni blokator jonskih kanala i da svoje inhibitorno delovanje ne vrši preko voltažno zavisnih (voltage-gated) natrijumovih ili kalcijumovih kanala ili smanjenjem ukupne ekscitabilnosti senzornih neurona. Direktno, dozno zavisno inhibitorno delovanje MCS-18 (10 $\mu\text{g/ml}$) na kapsaicin (2 μM) indukovne struje u DRG neurona pacova potvrđeno je ne samo u "celoćelijskom" modelu, već i u isečenim membranskim strukturama. To znači da se delovanje ovog prirodnog proizvoda, najverovatnije ostvaruje direktno na membranskim kanalima, a ne posredstvom intracelularnih signalnih puteva koji zahtevaju rastvorljive sekundarne glasnike.

Dirsch i sar. (1993) navode da helebrin, β -ekdison i 5α -hidroksiekdison iz *H. purpurascens* W. et K. suprimiraju proliferaciju T limfocita, dok je steroidni saponin stimuliše. Linke i sar. (1998) su izveli veći broj oglada sa ciljem da utvrde imunomodulatorno delovanje visoko prečišćene frakcije *H. purpurascens* W. et K. (HP12) u kulturi T limfocita ljudi u *in vitro* uslovima i dobili rezultate koji dokazuju njegov jak supresivni efekat. U prvoj seriji eksperimenata, analiziran je uticaj HP12 u različitim razređenjima, na proliferaciju T limfocita indukovanu različitim mitogenima (fitohemaglutininom - PHA, konkanavalinom A - Con A i jonomicinom/PMA). Aktivacija T ćelija rezultira kaskadnim događajima, uključujući ekspresiju rano aktiviranih markera, formiranje aktivnih IL-2 receptora, sekreciju T ćelijskih specifičnih citokina i ćelijsku proliferaciju. Na osnovu stepena inkorporacije [3 H]timidina u T limfocite, utvrđeno je da potpunu inhibiciju T-ćelijske proliferacije izaziva HP12 u koncentracijama višim od 200-300 ng/ml. Ispitivanje supresije aloreaktivnosti *in vitro*, vršeno je dodavanjem HP12 u mešovitu kulturu limfocita, koja je prethodno inkubirana 6 dana sa alogenim ćelijama. Totalna inhibicija proliferacije limfocita indukovana je dodavanjem HP12 u koncentracijama višim od 300 ng/ml, dok je 50% inhibicije izazvano sa 80 ng/ml. U drugoj seriji eksperimenata, ekspresija rano aktiviranih limfocitnih markera je analizirana nakon 3h i 24h od jonomicin/PMA stimulacije, sa ili bez 5 μ g/ml HP12. Posle 3h od stimulacije, više od 90% CD4⁺ T ćelija bilo je CD69 pozitivno bez obzira da li je inkubirano sa HP12, dok nije utvrđena značajna ekspresija HLA-DR i CD25. Frakcija HP12 je samo neznatno smanjila ekspresiju CD69 24h posle stimulacije, ali je značajno (40%) suprimirao ispoljavanje HLA-DR i potpuno blokirao ekspresiju α -lanca IL-2 receptora (CD25). Terness i sar. (1999) su upoređivali supresivni efekat različitih razređenja HP12 i ciklosporina A (CsA), važne immunosupresivne supstance koja se koristi prilikom transplantacije organa. Testirali su i delovanje kombinacije ovih supstanci na humane T-ćelijske linije, u cilju utvrđivanja da li HP12 može da potencira efekat CsA. Rezultati određivanja ćelijske proliferacije, na osnovu stepena inkorporacije [3 H]timidina, ukazali su da HP12 ima 32 puta jače supresivno delovanje od CsA. Potpuna supresija T limfocita, prethodno stimulisanih 72h sa Con A, postignuta je sa 0,8 μ g/ml (800 ng/ml) HP12 i sa 25 μ g/ml CsA. Kada je HP12 u koncentraciji koja ne izaziva supresiju proliferativnog odgovora (0,05 μ g/ml), kombinovana sa dozom CsA koja takođe samostalno ne izaziva supresiju, došlo je do

potpune inhibicije T ćelijskog odgovora. Na ovaj način je dokazano da HP12 snažno pojačava efekat CsA. Ukoliko se utvrdi da i u *in vivo* uslovima postoji isti sinergizam između HP12 i CsA i da je sinergistička koncentracija HP12 netoksična za pacijente, bilo bi moguće smanjiti procenat odbacivanja transplantata i eliminisati neka neželjena dejstva CsA.

Terness i sar. (2001-a,b) su analizirali imunoregulatornu aktivnost pikomolskih koncentracija bufadienolida (50000 do 0,01 pmol/10⁵ ćelija) izolovanih tankoslojnom hromatografijom, preparativnom HPLC analizom ili kristalizacijom iz *Helleborus L.* U kulturi T limfocita ljudi dokazano je da nakon 48h stimulacije mitogenima Con A i PHA ili 5 dana alogenim ćelijama u prisustvu bufadienolida, postoji potpuna inhibicija aktivnosti T limfocita sa koncentracijom bufadienolida od 0,75 pmol/10⁵ ćelija. Supresivni efekat, bufadienolidi ostvaruju vezivanjem i inhibicijom Na⁺/K⁺-ATP-aze T ćelija, a poznata je povezanost aktivacije limfocita sa povećanom aktivnošću ovog enzima. Visoka intracelularna koncentracija K⁺, odn. jona Na⁺ u plazmi, je neophodna za pravilnu ekspresiju gena, za sintezu makromolekula i postizanje maksimalne aktivnosti nekih enzima tipa kinaza. Prirodni hormon kortizol i klasične imunosupresivne supstance CsA i takrolimus (FK 506) u koncentracijama od 12500, 195 i 195 pmol/10⁵ ćelija dovode do potpune supresije proliferacije T ćelija, što ukazuje da su bufadienolidi izuzetno jaki T ćelijski supresivni biomolekuli, jer u ovom smislu deluju 16384 puta jače od kortizola i 256 puta jače od CsA ili takrolimusa (FK 506). Utvrđeno je i da posle 1h, 3h ili 12h inkubacije sa bufadienolidima u koncentraciji 781 pmol/10⁵ ćelija, 20-80% T ćelija može da se restimuliše sa Con A, dok ćelije suprimirane bufadienolidima 24h, ne mogu biti restimulisane. Visok procenat vitalnih ćelija (više od 89%) ukazuje da nemogućnost restimulacije nije posledica smrti T-ćelija, a preživeli T ćelije su u stanju da izazovu sekundarni imunski odgovor. Minimalne promene hemijske strukture bufadienolida, imaju značajan uticaj na njihovu funkciju i imunoregulatornu aktivnost. Nedostatak 17β-laktonskog prstena koji potpomaže vezivanje heterozida za Na⁺/K⁺-ATP-azu značajno smanjuje supresivnu aktivnost bufadienolida, dok supstitucija hidroksilne grupe sa epoksi grupom na položaju C14 delimično smanjuje ovu aktivnost. Komponente sa hidroksilnom grupom na atomu C3 imaju 1000 puta jači efekat, koji se može pojačati još 16 puta glikolizacijom hidroksilne grupe, najčešće glukozom ili ramnozom. Promenom

strukture, bufadienolidi gube kardiotonično delovanje pa se mogu primeniti kao imunosupresori bez kardiotoksičnog efekta.

Iz korena *H. purpurascens* W. et K. je izolovan prirodni proizvod MCS-18 u prečišćenoj formi, a njegova kompleksana hemijska struktura [makrociklični ugljen suboksid (C₃O₂)_n derivat], precizan način delovanja i imunomodulatorna funkcija još nisu u potpunosti razjašnjeni (Horstmann i sar., 2008). Ovi autori su utvrdili da je MCS-18 efikasan modulator imunskog odgovora *in vitro* i *in vivo*, sa izuzetnim potencijalom u terapiji inflamatornih oboljenja i poremećaja koje karakteriše patološki povećana aktivnost imunskog sistema (autoimune bolesti – reumatoidni artritis, multipla skleroza, dijabetes tip 1). Izolovana supstanca MCS-18 ispoljava jaku netoksičnu imunosupresivnu aktivnost *in vitro*, jer ometa sazrevanje i migraciju dendritičnih ćelija (DC), glavnih antigen prezentujućih ćelija (APC) imunskog sistema, neophodnih za izazivanje prirodnih i adaptivnih imunskih odgovora na infektivne patogene i tumorske ćelije, kao i za održavanje mehanizama tolerancije na sopstvene antigene. Kako su sazrevanje i migracija dendritičnih ćelija neophodni za indukciju snažnog T-ćelijskog odgovora u limfnim čvorovima, MCS-18 je u stanju da na dozno zavisnan način spreči ključne korake u aktiviranju imunskog sistema. Efikasno inhibira ekspresiju markera na ćelijskim membranama DC bitnih za sazrevanje (CD 40, CD80 i CD86, a posebno CD83, a ne utiče na ekspresiju MHC klase I i MHC klase II) i održava ih u nezreloj/poluzreloj fazi, koja je uključena u indukciju/održavanje mehanizama tolerancije. Blokira DC/T ćelijsko grupisanje, a time i DC posredovanu alogenu proliferaciju T ćelija. Inhibira ekspresiju hemokinog receptora CCR7 na DC, što kasnije dovodi do dozno zavisne blokade CCL19 posredovane migracije dendritičnih ćelija. Supstanca MCS-18 ne samo da jasno i dozno zavisno inhibira APC zavisnu stimulaciju T ćelija posredovanu dendritičnim ćelijama, već i APC nezavisnu proliferaciju T ćelija posredovanu anti-CD3 i anti-CD28 antitelima, što sugeriše da MCS-18 interferira direktno sa T ćelijama. Aplikovan intraperitonealno ili peroralno, bilo da je primenjen profilaktički ili terapijski, MCS-18 snažno i dugotrajno smanjuje paralizu miševa nastalu usled eksperimentalno izazvane CD4⁺ T-ćelijski posredovane autoimune bolesti (EAE-eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis), koja je model rane faze zapaljenja kod multiple skleroze čoveka. Patohistološke analize su ukazale, da tretmani ovim proizvodom, skoro u potpunosti redukuju perivaskularnu infiltraciju T limfocita sa

CD45⁺ markerima u mozgu i kičmenoj moždini, u toku akutne faze bolesti. Imunosupresivna *in vivo* aktivnost MCS-18 u EAE modelu miševa je u korelaciji sa supresivnom *in vitro* aktivnošću prema dendritičnim i T ćelijama, kao i sa slabljenjem T-ćelijski (Th2) zavisne proizvodnje antitela, protiv tetanusnih i difteroidnih toksoid antigena *in vivo* kod miševa (Kerek i sar., 2008). Supstanca MCS-18 je takođe u stanju da smanji B ćelijsku proliferaciju i proizvodnju imunoglobulina pojačanu agonistima "Tool-like receptora" (TRC), kao što su lipopolisaharidi, Pam3Cys ili Freundov kompletni adjuvans. Ovi autori su kao mogući mehanizam supresije predložili blokadu TLR, čija je uloga takođe važna i tokom aktivacije i sazrevanja dendritičnih ćelija. U prvim biološkim testovima, utvrđeno je da je jedan od načina delovanja MCS-18 *in vitro* regulisanje lučenja imunomodulatorih citokina IL-10 i TNF-β (Szegli i sar., 2005). Periartikularni tretman ovim prirodnim proizvodom, kod pacijenata sa periartritisom skapulo-humeralnog zgloba, doveo je do značajnog otklanjanja bolova i poboljšanja pokretljivosti ramena, uz dobru podnošljivost terapije i odsustvo neželjenih efekata (Nica i sar., 2005).

Littmann i sar. (2008) su utvrdili da MCS-18 izolovan iz *H. purpurascens* W. et K., ne samo da na dozno zavisani način inhibira ekspresiju funkcionalno značajnih površinskih molekula na dendritičnim ćelijama i dovodi do poremećaja alogene stimulacije T limfocita dendritičnim ćelijama, već u zavisnosti od koncentracije, značajno smanjuje i proliferativni potencijal B limfocita slezine i proizvodnju imunoglobulina IgM i IgG2b. Molekularna osnova ove supresije nije poznata, a pretpostavlja se da bi usled blokade TLR-4 posredovane aktivacije, MCS-18 mogao da ometa MAPK (mitogen-activated protein kinase) zavisne signalne događaje.

Ispitivanja koja su sprovedli Seifarth i sar. (2011) su ukazala da MCS-18 ispoljava efikasnu imunosupresivnu aktivnost i ima izuzetan potencijal u terapiji bolesti koje karakteriše prekomerna aktivacija imunskog sistema. Ključnu ulogu u pokretanju autoimunog poremećaja, dijabetesa tip 1, ima nepravilna prezentacija auto antigena od strane APC, a manifestuje se hroničnom inflamatornom reakcijom sa infiltracijom mononuklearnih ćelija limfocita i monocita u β ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Limfocitna infiltracija rezultira destrukcijom β ćelija koje proizvode insulin i pojavom kliničkog dijabetesa. Patogeni T limfociti obično ispoljavaju Th1 ćelijski fenotip, koga karakteriše visok nivo sekrecije IFN-γ. Ovi autori su ispitivali

imunosupresivni kapacitet MCS-18 na modelu životinja za dijabetes tip 1 (NOD/LTJ miševi) koje su stimulirane specifičnim auto antigenima (B lanac insulina i NRP-A7). Jednoj grupi miševa intraperitonealno je aplikovan MCS-18 u količini od 5x1 mg, a drugoj grupi 5x2 mg tokom 8. nedelje života svakog drugog dana, dok je treća grupa tretirana dvokratno: 5x2 mg tokom 8. nedelje i 5x2 mg tokom 12. nedelje života svakog drugog dana. U predijabetičnih miševa starih 30 nedelja, MCS-18 je doveo do dozno zavisne inhibicije pojave i manifestacija bolesti (50-40-33% dijabetičnih), dok je 94% kontrolnih životinja imalo dijabetes. Tretman ovim jedinjenjem, nezavisno od doze, značajno je smanjio stepen zapaljenja, infiltraciju T ćelija i stopu njihove proliferacije. Iako životinje tretirane sa MCS-18 delimično ispoljavaju inflamatornu infiltraciju oko Langerhansovih ostrvaca, one su značajno zaštićene od dijabetesa, imaju manji broj ostrvaca uništen intransulitizom, i očuvanu sekreciju insulina čak i u ostrvcima sa periinsulitizom i povišenim CD4⁺/CD8⁺ odnosom T limfocita u periferno infiltriranim ostrvcima. FASC analiza je dokazala da aplikovanje 2x5x2 mg MCS-18 povećava frekvenciju regulatornih T ćelija (Foxp3⁺/CD25⁺ ćelijske populacije) u pankreasu koje inhibiraju dijabetogene efektor ćelije i pojačava ekspresiju insulina, dok je u pankreasu kontrolne grupe miševa jaka infiltracija CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita praćena smanjenim lučenjem insulina. Kvantitativnom RT-PCR analizom utvrđeni su statistički značajno viši nivoi insulin-1, insulin-2 i Foxp3, a niži nivoi IFN- γ specifičnih transkripta mRNA kod MCS-18 tretiranih u odnosu na netretirane miševe. Rezultati ELISPOT testova su ukazali na supresivni efekat ovog jedinjenja na Th1 odgovor i oslobađanje IFN- γ iz limfocita slezine, nakon stimulacije specifičnim auto antigenima. Fenotipska FASC analiza je otkrila, da MCS-18 smanjuje ekspresiju površinskih markera CD25, CD40, CD80 i CD86 na dendritičnim ćelijama (DC), u zavisnosti od koncentracije (50-100 μ g/ml). Osim toga, DC gajene u prisustvu MCS-18 značajno smanjuju lučenje IL-1 β i IL-6, kao i ekspresiju MCP-1, a smanjena je i DC posredovana stimulacija T limfocita.

2.8.6. Repelentno i insekticidno delovanje

Biljke su važan izvor insekticida (nikotin, piretrin, rotenon i dr.) koji se koriste u kontroli poljoprivrednih štetočina. Ekdisteroidi predstavljaju veliku familiju steroida koja postoji kod beskičmenjaka, uglavnom zglavkara, uključujući insekte (*Insecta*),

paukove (*Chelicerata*) i ljuskare (*Crustacea*), ali su pronađeni i kod nekih neartropoda kao što su valjkasti crvi (*Nematoda*), puževi (*Gastropoda*) i meki korali (*Cnidaria*). Mada je najčešći biljni ekdisteroid 20-hidroksiekdison istovremeno i glavni ekdisteroid insekata, identifikovano je još preko 300 različitih fitoekdisteroide u oko 80 familija (Baltaev, 2000). Oko 6% svih biljnih vrsta akumulira fitoekdisteroide (polihidroksilne ketosteroide) koji su strukturni analozi zooekdisteroide ekdisona, hormona rasta kod insekata, čija je uloga da reguliše reprodukciju, embriogenezu, razvoj i metamorfozu insekata (Dinan i sar., 2001). Njihova koncentracija u biljkama je često mnogo viša nego u telu insekata ili drugih beskičmenjaka, a količina od 5-10 ppm je dovoljna da ih zaštiti od fitofagnih insekata i crva. Fitoekdisteroidi imaju ulogu u odbrani biljke (ekološki značaj) jer izazivaju nepokretnost, smanjuju invaziju, onemogućavaju rast i razvoj, pokreću apoptozu u toku metamorfoze i razvojnih stadijuma, i izazivaju smrt insekata (Schmelz i sar., 2002) i parazitskih *Nematoda* (Soriano i sar., 2004). Oni se ne vezuju za citosolne steroidne receptore, već utiču na puteve signalne transdukcije, kao anabolički steroidi, verovatno preko ekdison receptora vezanih za jedarnu membranu (G Protein Coupled Receptor GPCR) (Báthori i sar., 2008).

Pretpostavlja se da uloga ekdisteroide u biljkama može biti slična odbrambenoj ulozi lignina čija proizvodnja pojačava odgovor na patogene. Colombo i Tomè (1993) ističu da ekdisteroidi, zastupljeni u vrlo velikim količinama u svežim podzemnim organima *H. odoratus* ssp. *laxus* (Host) Merxm. et Podl. (više od 2% suve materije) imaju insekticidno delovanje. Velika zastupljenost i jednostavan postupak ekstrakcije ekdisteroide pružaju mogućnost da se ova biljka koristi u kontroli brojnosti populacija insekata. Istraživanja Menga i sar. (2001) su potvrdila insekticidno delovanje fitoekdisteroide, među kojima značajno mesto zauzimaju ekdisteroidi biljaka roda *Helleborus* L.

Fitoekdisteroidi doprinose sprečavanju rasta i razvoja neadaptiranih fitofagnih beskičmenjaka. Podizanjem nivoa ekdisteroide kod useva, od kojih je većina siromašna u njihovom sadržaju, obezbedio bi se veći stepen zaštite ovih biljaka. Repelentno delovanje *Helleborus* L. na insekte utvrdili su Secoy i Smith (1983). Pascual-Villalobos i Robledo (1998) su testirali osetljivost žitne štetočine *Tribolium castaneum* Herbst (*Coleoptera: Tenebrionidae*) na heksanski, acetonski i metanolni ekstrakt nadzemnih delova *H. foetidus* L. (ekstrakti rastuće polarnosti) u koncentraciji od 2 mg/ml.

Dodavanje acetonskog ekstrakta u koncentraciji od 0,05% u hranu 10-dnevnih larvi 2 insekta uzrokovalo je posle 10 dana mortalitet od 40-69%, dok je pojedinačno aplikovanje po 3 µg istog ekstrakta larvama dalo mortalitet od 100% nakon 72 h. Aplikacija metanalnog ekstrakta lutkama izazvala je mortalitet u 39% slučajeva posle 6 dana. Za utvrđivanje kontaktne toksičnosti, 10 lutki mlađih od 24h stavljeno je na filter papir prethodno natopljen sa 250 µl heksanskog ekstrakta i posle 6 dana mortalitet je bio 39%. Repelentno delovanje ekstrakta kukureka dokazano je dodavanjem 0,05% heksanskog ekstrakta u hranu 25 dana starim larvama. Pri tome je repelentni indeks posle 2h iznosio 73,3%, a posle 24h 37,3%.

Međutim, neki insekti su u stanju da odvoje i "zaplene" toksične sekundarne metabolite iz biljke domaćina, da ih sačuvaju u svojoj hemolimfi i koriste za hemijsku odbranu odvrćanjem različitih grupa predatora. Fitofagne larve roda *Monophadnus* vrste A (*Tenthredinidae*, *Phymatocerini*) prikupljene sa lišća *H. foetidus* L. i vrste B hranjene na lišću *H. viridis* L., aktivno su preuzele jedan furostanol saponin, tako da je koncentracija ovog jedinjenja bila 65 i 200 puta veća u hemolimfi ovih vrsta (17,5 i 1,6 µmol/g) nego u njihovom domaćinu (0,268 i 0,008 µmol/g). U laboratorijskim biotestovima, sirova hemolimfa ovih larvi (u koncentraciji od 8 mg/ml), kao i izolovani furostanol saponini (u koncentraciji od 0,8 i 0,08 mg/ml) su ispoljili značajnu aktivnost u odvrćanju potencijalnog grabljivca, mrava radnika *Myrmica rubra* (Prieto i sar., 2007).

2.9. DELOVANJE GLUKOKORTIKOSTEROIDA (DEKSAMETAZONA)

Prirodni glukokortikosteroidi (kortizon, kortizol, kortikosteron) su hormoni koje primarno luči kora nadbubrežne žlezde, ali se proizvode i u drugim organima, uključujući mozak, digestivni trakt, kožu, timus i organe imunskog sistema (Gomez-Sanchez, 2009). Postoji veliki broj sintetskih glukokortikosteroida (deksametazon, betametazon, hidrokortizon, prednizon, prednizolon, metilprednizolon, triamcinolon), koji imaju slično ili isto delovanje kao i prirodni. Oni se međusobno razlikuju prema dužini i intenzitetu delovanja i aktivnosti u tkivima. Deksametazon je visokoaktivni, antizapaljenski sintetski kortikosteroid, jakog glukokortikoidnog delovanja. Njegovo antiinflamatorno delovanje je 25 puta jače od kortizola, 30 puta od hidrokortizona i 4-5

puta od prednizona. Deksametazon fosfat ispoljava brzo delovanje, koje traje oko 48h, pa se zato koristi kada je potrebno brzo delovanje (kod šoka). Deksametazon pivalat deluje produženo, oko 7 dana, te se koristi kada je potrebno prolongirano delovanje (kod ketoze). Mineralokortikoidno delovanje deksametazona je zanemarljivo i on ispoljava veoma slab efekat na retenciju natrijuma, a ne remeti ravnotežu vode i elektrolita. Prirodni glukokortikosteroidi se oslobađaju tokom imunskog odgovora i ova proizvodnja se smatra presudnom negativnom povratnom spregom u regulaciji jačine ovog odgovora i sprečavanju mogućeg oštećenja domaćina. Sintetski glukokortikosteroidi su inhibitori inflamatornog odgovora i imaju široku upotrebu kao antiinflamatorni i imunosupresivni agensi u lečenju mnogih autoimunih i alergijskih oboljenja, kao i sprečavanju odbacivanja transplantata.

Antiinflamatorno i imunosupresivno delovanje glukokortikoida se zasniva na inhibiciji sinteze citokina i hemokina (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-16, TNF- α , GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), INF- γ i eotaksina) i citokinskih receptora (Adcock i Caramori, 2001). Oni regulišu ekspresiju adhezivnih molekula i ćelijsku migraciju u odgovoru na prinflamatorne stimulse, dovode do redistribucije leukocita, inhibiraju funkcije leukocita i tkivnih makrofaga, stabilizuju biološke membrane, smanjuju propustljivost krvnih sudova a time i ekstravazaciju (Gregory i sar., 2009). Osim toga oni inhibiraju rane (crvenilo, toplota, bol, otok) i kasne manifestacije zapaljenskih procesa (smanjuju aktivnost mononuklearnih ćelija, angiogenezu, proliferaciju endotela kapilara i fibroblasta, deponovanje fibrina, a ubrzavaju razgradnju kolagena) (Qing i sar., 2013). Neki adhezivni molekuli, kao što su ICAM-1 (CD54), Mac1 (CD11b/CD18) i L-selektin (CD62L) mogu biti uključeni u adheziju tokom aktivacije eozinofilnih granulocita, a glukokortikosteroidi mogu u izvesnoj meri prevenirati alergijsku reakciju, regulacijom ekspresije adhezivnih molekula na eozinofilima. Deksametazon izaziva smanjenje broja eozinofilnih granulocita i ekspresije adhezivnih molekula ICAM-3 (CD50), dozno zavisnu inhibiciju ekspresije ICAM-1, a povećava ekspresiju L-selektina na površini eozinofilnih granulocita (Juan i sar., 1999). Endogeni MIF (inhibitorni faktor migracije makrofaga) i glukokortikosteroidi recipročno regulišu leukocitno-endotelnu interakciju *in vivo*, a niske fiziološke koncentracije glukokortikoida indukuju ekspresiju MIF (Gregory i sar., 2009). Deksametazon smanjuje vrednosti parametara angiogeneze:

neovaskularnu površinu, ukupnu vaskularnu površinu i broj novonastalih krvnih sudova (Ribeiro i sar., 2012).

Visoke doze deksametazona inhibiraju imunski odgovor. Deksametazon vrši inhibiciju produkcije TNF- α , IL-1 β , IL-6 i stimuliše oslobađanje antiinflamatornih faktora, kao što su IL-10 i aneksin-1 (Antonelli i sar., 2001), a istovremeno povećava sekreciju rezistin proteina (Tsiotra i sar., 2013). Ovaj sintetski kortikosteroid inhibira IL-1 indukovanu aktivnost fosfolipaze A2, prostaglandina E2 i ciklooksigenaze, kao i ekspresiju ciklooksigenaze 2 (Sampey i sar., 2000). Prostaglandini E2 povećavaju nivo i aktivnost brojnih proteina sistema komplementa (C1a, C2, C3, C3, C6), dok deksametazon blokira proinflamatorno delovanje E2 i povećanje sadržaja komponenti komplementa indukovano prostaglandinom E2. Navedeni efekat može biti od koristi u sprečavanju prekida graviditeta ili kod reproduktivnih poremećaja povezanih sa aktivacijom komplementa (pre-eklampsija) (Rhen i Cidlowski, 2006).

Antiinflamatorni i imunosupresivni efekti glukokortikosteroida su uglavnom vezani za inhibiciju ekspresije pojedinih gena i uticaj na brojne puteve prenošenja signala u ćeliji. Njihovo delovanje je integrisano na molekulskom nivou uticajem kompleksa glukokortikosteroid-glukokortikoidni receptor na transkripciju gena (Chinenov i Rogatsky, 2007). Glukokortikosteroidi difunduju kroz ćelijske membrane i vezuju se za svoje citoplazmatske receptore, koji su vezani za šaperone (Hsp 90 i Hsp 70) i ko-šaperonske molekule (imunofiline). Nakon vezivanja za receptore, nastaje hiperfosforilacija, zamena imunofilina FKBP-51 imunofilinom FKBP-52 i vezivanje transportnog proteina dineina. Ovaj novonastali kompleks odlazi u jedro gde se kao dimer vezuje za glukokortikoid odgovorne elemente u target genima DNK ili se vezuje u obliku monomera za transkripcione faktore kao što su NF-AT, NF- κ B i AP-1 (aktivator protein 1) i vrši inhibiciju ekspresije gena ("transrepressing") (Saklatvala, 2002; Ngo i sar., 2013). Antizapaljensko delovanje glukokortikosteroida se ostvaruje indukcijom sinteze I κ B koji vrši inhibiciju transkripcijskog faktora NF- κ B (Antonelli i sar., 2001), inhibicijom transkripcijskih faktora NF-AT, NF- κ B i AP-1 (Nissen i Yamamoto, 2000) i podsticanjem ekspresije gena za transkripcijski faktor GILZ (glukokortikoids-induced leucine zipper) koji može da inhibira translokaciju AP-1, kao i NF- κ B interakcijom sa NF- κ B p65 subjedinicom (Ngo i sar., 2013).

Fosforilisani NF- κ B inicira transkripciju nekoliko proinflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-6 i TNF- α , koji su odgovorni za pokretanje urođenog imunskog odgovora, ali učestvuju i u patogenezi septičkog šoka (O'Neill, 2006). Blokiranjem translokacije NF- κ B65, deksametazon inhibira transkripciju ovih citokina (O'Neill, 2006; Bonin i sar., 2013). Kortikosteroidna terapija deksametazonom ili metilprednizolonom ne može smanjiti stopu smrtnosti u krajnjoj fazi septičkog šoka, ali može povećati preživljavanje u njegovoj ranoj fazi (Sprung i sar., 1984; Sligl i sar., 2009).

Glukokortikosteroidi utiču na imunski i inflamatorni odgovor na više različitih načina. Jedan od mehanizama kojim deksametazon suprimira imunski odgovor je inhibicija diferencijacije, sazrevanja i prezentacije antigena na površini dendritičnih ćelija (Hu i sar., 2013). Deksametazon na dozno zavisni način, reguliše površinsku ekspresiju CD86, CD40, CD54 i MHC II molekula na dendritičnim ćelijama, ali ne utiče na ekspresiju CD80, CD95, CD95L i MHC I molekula, kao niti na endocitoznu aktivnost ovih ćelija. Dendritične ćelije tretirane deksametazonom imaju smanjenu funkciju prezentovanja antigena pomoću MHC II molekula i sposobnost aktiviranja aloreaktivnih T ćelija. Inhibitorni efekat deksametazona na ekspresiju kostimulatornih molekula i antigen prezentujuću funkciju dendritičnih ćelija, može biti blokiran dodavanjem RU486, jakog steroidnog antagoniste hormona, koji se vezuje za receptore u citozolu (Pan i sar., 2001).

Imunosupresivna svojstva glukokortikosteroida su uglavnom usmerena na njihov uticaj na T limfocite i monocite/makrofage, jer utiču na rast, diferencijaciju i funkcije obe vrste ćelija (Gomez-Sanchez, 2009). Oni predstavljaju inhibitore rasta T limfocita, smanjuju klonalnu ekspanziju T i B ćelija i jaki su induktori apoptoze timocita i T limfocita (Tonomura i sar., 2003). Glukokortikosteroidi deluju na različite puteve intracelularne signalizacije, što dovodi do apoptoze i smanjene proliferacije ne samo timocita i limfoidnih ćelija, već i više različitih ćelija, uključujući mišićne, koštane, hondrocyte i ćelije mijeloma (Ranta i sar., 2006).

Deksametazon deluje na različite faze eritropoeze, indukuje ekspresiju gena u nezrelim eritroidnim ćelijama i podstiče stvaranje eritrocita (Narla i sar., 2011). On povećava broj eritrocita, hematokritsku vrednost, koncentraciju hemoglobina, broj retikulocita i koncentraciju eritropoetina, glavnog regulatora eritropoeze.

Glukokortikosteroidi deluju direktno na promotorski region gena za eritropoetin, a mogu da utiču na transkripciju ovog gena indirektno modulišući ekspresiju drugih ključnih transkripcionih faktora, posebno inducibilnog faktora hipoksije (HIF1), hepatocitnog nuklearnog faktora 4 α (HNF4 α) i GATA familije transkripcionih faktora (Tang i sar., 2011). Nakon aplikovanja deksametazona javlja se tendencija povećanja broja trombocita. Međutim, u akutnoj fazi "denga groznice" koju prati izražena trombocitopenija i krvarenje, niske kao i visoke doze deksametazona nisu bile efikasne u postizanju porasta broja trombocita (Shashidhara i sar., 2013).

Deksametazon utiče na metabolizam glukoze, proteina i lipida. On ima 50 puta veći afinitet za estrogene receptore u odnosu na kortizol i može da izazove neželjena dejstva kao što su povećani mišićni katabolizam, hiperfagija i povećanje rezistencije na insulin (Prelovsek i sar., 2006). Deksametazon indukuje hiperglikemiju, stimuliše glukoneogenezu i smanjuje unošenje i korišćenje glukoze u tkivima, što je praćeno povećanjem koncentracije insulina u plazmi, ali istovremeno, smanjuje osetljivost organizma na insulin, što može dovesti do pojave dijabetesa (Kusenda i sar., 2013). Dugotrajna primena deksametazona dovodi do insulinske rezistencije smanjenjem broja raspoloživih insulinskih receptora, inhibicijom lučenja insulina iz β ćelija pankreasa, inhibicijom GLUT4 translokacije, povećanjem aktivnosti lipoprotein lipaze u masnom tkivu i oštećenjem insulina usled smanjenja aktivnosti fosfatidil-inozitol-3kinaze (PI-3k) (Ghaisas i sar., 2011). Visoke koncentracije glukoze izazivaju stvaranje ROSa u mitohondrijama, koji potiskuju prvu fazu lučenja insulina izazvanu glukozom, preko supresije aktivnosti gliceraldehid-3fosfat dehidrogenaze (Bjelaković i sar., 2007). Nastali slobodni radikali mogu doprineti pojavi oksidativnog stresa, a on dalje indukuje ekspresiju NF- κ B, koji direktno ili indirektno doprinosi smanjenoj osetljivosti na insulin (Hegardt i sar., 2003). Insulinska rezistencija izaziva oslobađanje citokina TNF- α i IL-8, što dovodi do daljeg razvoja oksidativnog stresa u jetri, smanjenjem endogenog mitohondrijalnog nivoa Cu/Zn SOD i glutaciona i povećanjem produkcije H₂O₂ radikala (Baydas i sar., 2002). Kod miševa tretiranih deksametazonom je utvrđen pad aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, katalaze, GSH i povećanje lipidne peroksidacije u jetri (Ghaisas i sar., 2011).

Deksametazon smanjuje sintezu triglicerida (Napolitano i sar., 2013) i može da izazove lipolizu ispoljavanjem permisivnog efekta na lipolitičke hormone, kao što su

kateholamini (adrenalin, noradrenalin), glukagon i hormon rasta, a vrši i redistribuciju masti (Fain i sar., 2008; Macfarlane i sar., 2008). Mada deksametazon stimulira lipolizu, smanjenje koncentracije NEFA (nonesterified fatty acid) (Kusenda i sar., 2013) se može objasniti istovremenim povećanjem lipidne oksidacije u jetri (Tappy i sar., 1994) i korišćenjem NEFA od strane perifernih tkiva, da bi se zadovoljile energetske potrebe u stanjima smanjene insulinske osetljivosti i unosa glukoze u tkiva (Hue i Taegtmeyer, 2009).

Deksametazon vrši inhibiciju RUNX2, glavnog regulatora diferencijacije mezenhimskih pluripotentnih ćelija u osteoblaste i formiranja kostiju (Koromila i sar., 2013). Istovremeno, ovaj kortikosteroid smanjuje održivost i funkciju osteoklasta i njihovih prekursora (Madsen i sar., 2011).

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu podataka publikovanih u naučnoj i stručnoj literaturi o strukturi, biogenezi i primeni pojedinih frakcija i ukupnog ekstrakta rizoma i korena kukureka (*Helleborus L.*) u profilaktičke i terapijske svrhe kod životinja i ljudi, a koji zavisno od uslova ispoljavaju višestruke bioaktivne efekte i deluju u više pravaca, može se zaključiti da je još uvek nedovoljno ispitano i opisano njihovo delovanje na žive organizme (*in vivo* aktivnost). *Helleborus odorus W. et K.* je široko rasprostranjen u našoj zemlji i osnovni cilj ove disertacije je bio da se u eksperimentalnim uslovima ispita uticaj sastojaka ekstrakata podzemnih organa navedene biljne vrste, dobijenih ekstrakcijom pomoću rastvarača rastuće polarnosti, na vrednosti hematoloških parametara, koncentraciju proteina akutne faze i funkcije neutrofilnih granulocita Wistar pacova.

Osim delovanja sastojaka petroletarskog, hloroformskog, metanolnog i vodenog ekstrakta, ispitivan je i uticaj vodenog i metanolnog ekstrakta kukureka aplikovanih 24h nakon trokratnog tretmana pacova deksametazonom u dozi od 1 mg/kg (Dexamethasone 2 mg/ml, Alfasan Internacional B.V., Holandija), na uočene efekte.

Radi ostvarivanja postavljenog cilja definisani su sledeći istraživački zadaci:

1. Ispitati promene vrednosti sledećih hematoloških parametara: broja ukupnih leukocita, broja i procenta neutrofilnih granulocita, broja i procenta limfocita, neutrofilno/limfocitnog indeksa, broja i procenta monocita, broja eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti, 24h posle aplikacije različitih doza petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakata rizoma i korena kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM);

2. Ispitati promene parametara akutne zapaljenske reakcije: vrednosti sedimentacije eritrocita i koncentracije proteina akutne faze – albumina, fibrinogena i haptoglobina, 24h posle aplikacije pojedinačnih ekstrakata podzemnih organa kukureka u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM;
3. Ispitati promene navedenih parametara kod pacova tretiranih deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM tri dana uzastopno i kod pacova kojima je nakon ovog tretmana jednokratno, četvrtog dana aplikovan fiziološki rastvor u dozi 2,5 ml/kg TM ili vodeni ili metanolni ekstrakt podzemnih organa kukureka u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM;
4. Ispitati funkcije neutrofilnih granulocita (stepen fagocitoze i intenzitet oksidativnog praska) u grupama eksperimentalnih životinja kod kojih je ustanovljen najizraženiji proinflamatorni efekat 24h nakon aplikovanja ispitivanih ekstrakata;
5. Uporediti dobijene vrednosti hematoloških parametara, parametara akutne zapaljenske reakcije i funkcija neutrofilnih granulocita kod pacova kontrolne grupe kojima je aplikovan fiziološki rastvor i oglednih grupa kod kojih su primenjeni ekstrakti rizoma i korena kukureka u različitim dozama;
6. Uporediti dobijene vrednosti hematoloških parametara, parametara akutne zapaljenske reakcije i funkcija neutrofilnih granulocita kod pacova kod kojih su primenjeni fiziološki rastvor, vodeni ili metanolni ekstrakti podzemnih organa kukureka, a kojima je prethodno trokratno aplikovan deksametazon i pacova koji su tretirani deksametazonom tri dana uzastopno.

Ovako izvedeno istraživanje može biti od značaja i predstavljati osnovu za dalja ispitivanja bioaktivnog delovanja ekstrakata podzemnih organa kukureka i primenu (posebno vodenog i metanolnog ekstrakta) u kliničkoj veterinarskoj i etnoveterinarskoj praksi.

4. MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivanje uticaja sastojaka rizoma i korena kukureka (*Helleborus odorus* W. et K.) na vrednosti hematoloških parametara, koncentraciju proteina akutne faze i funkcije neutrofilnih granulocita Wistar pacova, izvršeno je serijom oglada, u kojima su intramuskularno aplikovani petroletarski, hloroformski, metanolni i vodeni ekstrakti, različitih doza, dobijeni postupkom ekstrakcije pomoću rastvarača rastuće polarnosti. Pri izradi plana oglada i izbora metoda uzeti su u obzir postavljeni ciljevi i zadaci rada, kao i podaci iz literature.

4.1. MATERIJAL

4.1. 1. Izbor materijala

Za oglede su korišćeni visokosrodni pacovi soja Wistar, oba pola, u uzrastu od 2 meseca, prosečne telesne mase 200-240 g. Životinje su bile podeljene u grupe od po 7 jedinki, smeštene u istom objektu i držane pod stabilnim mikroklimatskim uslovima (dvanaestočasovni svetlosni režim sa prosečnom temperaturom vazduha 24 ± 1 °C), u polipropilenskim kavezima na prostirci od strugotine. Hrana i voda su bili dostupni pacovima po volji (*ad libitum*), a hranjeni su komercijalnom peletiranom smešom za laboratorijske pacove (Potpuna smeša PA sa 20% proteina), VZ Subotica.

U cilju određivanja aktivnosti ekstrakata sa najefikasnijim proinflamatornim delovanjem, životinjama koje su sačinjavale ogleadne grupe (po 7 pacova u svakoj grupi), aplikovan je jednokratno, intramuskularno (IM) u zadnji ekstremitet petroletarski (PEK), hloroformski (HEK), metanolni (MEK) ili vodeni (EK) ekstrakt rizoma i korena kukureka (dobijeni postupkom ekstrakcije pomoću rastvarača rastuće

polarnosti) u dozi od 50 mg/kg TM, 100 mg/kg TM ili 200 mg/kg TM, a krv je uzorkovana nakon 24h. Ogladne grupe su obeležene oznakama: PEK 50, PEK 100, PEK 200, HEK 50, HEK 100, HEK 200, MEK 50, MEK 100, MEK 200, EK 50, EK 100 i EK 200.

Pacovima kontrolne grupe je na isti način aplikovan sterilan fiziološki rastvor u količini od 2,5 ml/kg TM, što je odgovaralo zapremini aplikovanog ekstrakta podzemnih organa kukureka, a grupa je obeležena oznakom FR. U preliminarnim ispitivanjima, u cilju određivanja uticaja inertne, površinski aktivne materije Tween 80 koja se dodaje u fiziološki rastvor pri rastvaranju petroletarskog, hloroformskog i metanolnog ekstrakta (0,5% rastvor Tween 80 u fiziološkom rastvoru), na efikasnost tretmana, vršena je i intramuskularna aplikacija 0,5% rastvora Tween 80 (grupa FR-Tween80) u dozi od 2,5 ml/kg TM, a analiza osnovnih hematoloških parametara i parametara akutne zapaljenske reakcije je izvršena posle 24h.

U drugom delu oglada, pacovi iz 8 eksperimentalnih grupa od po 7 životinja u svakoj, su tri dana uzastopno tretirani intramuskularno deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM (DM) (Dexamethasone 2 mg/ml, Alfasan Internacional B.V., Holandija). Četvrtog dana eksperimenta, jednoj grupi pacova je intramuskularno aplikovan fiziološki rastvor u količini od 2,5 ml/kg TM (grupa DM1+FR), po tri grupe pacova koje su u prvom delu oglada ispoljile najveću aktivnost, tretirane su metanolnim ili vodenim ili ekstraktom u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM (grupe DM1+MEK50, DM1+MEK100, DM1+MEK200, DM1+EK50, DM1+EK100 i DM1+EK200), a jedna grupa pacova nije dodatno tretirana (grupa DM1). Uzorci krvi za analize su uzimani petog dana, a kod grupe tretirane samo deksametazonom četvrtog dana oglada.

4.1.2. Priprema ekstrakata rizoma i korena *H. odorus* W. et K. (Postupak ekstrakcije pomoću rastvarača rastuće polarnosti)

Podzemni organi *H. odorus* W. et K. su iskopani u proleće, na području Konjuh planine BiH, detaljno oprani pod mlazom tekuće, hladne vode, a potom sušeni 48h u vakuum sušnici nad slojem CaCl₂ pri temperaturi od 40 °C, u zatamnjenoj prostoriji. Osušen rizom je tamno smeđe do crne boje, gusto obrastao tankim, tamno mrkim

korenovima, oštrog mirisa. Nakon sušenja, podzemni organi su samleveni, a dobijeni prašak je bio tamno sivozelene boje, sa tamno mrkim i crnim komadićima različite veličine, jakog mirisa, gorkog i ljutog ukusa, mastan i lepljiv na dodir. Prašina koja je nastala prilikom mlevenja imala je zagušljiv miris i izazvala je kihanje.

Biljni materijal (osušen rizom sa korenjem *H. odorus* W. et K.), prethodno usitnjen do konzistencije grubog praška (*Pulvis grossus*, stepen usitnjenosti 0,75), u količini od 200 g, ekstrahovan je u aparatu za kontinuiranu ekstrakciju prema Soxhlet-u. Patrona (hilzna) sa biljnim materijalom je uneta u srednji deo Soxhlet-ovog aparata, koji je zatim spojen sa hladnjakom i balonom sa ravnim dnom zapremine 1000 ml. Sa gornje strane hladnjaka, preko malog levka, ulivani su rastvarači u količini dovoljnoj da se ekstraktor napuni i rastvarač prelje u balon, a zatim i ispuni dve tečine njegove zapremine. Zagrevanje rastvarača u balonu vršeno je na magnetnoj mešalici (Tehtnica Železniki MM-530), pri čemu su pare rastvarača dolazile u hladnjak, kondenzovale se i padale na biljni materijal i iz njega ekstrahovale sastojke. Kada bi se ekstraktor do gornjeg nivoa sifonske cevi napunio rastvaračem, koji u sebi sadrži ekstrahovane biljne sastojke, rastvor se prelivao u balon. Na taj način je vršena kontinuirana ekstrakcija masnog ulja i lipofilnih sastojaka podzemnih organa kukureka, odnosno obezmašćivanje biljnog materijala sa istom količinom rastvarača rastuće polarnosti: najpre petroletrom (t.k. 40-65 °C), potom hloroformom (CHCl₃, Mr 119,38 g/mol), i na kraju metanolom (CH₃OH, Mr 32,04 g/mol) do potpunog iscrpljenja. Petroletarski, hlorofomski i metanolni ekstrakti su upareni u vakuum uparivaču Rotary Evaporator RE 50 049RPM, a neposredno pred aplikaciju su rastvarani u 0,5% rastvoru Tween 80 do potrebne koncentracije (50, 100 ili 200 mg u 2,5 ml 0,5% rastvora Tween 80).

Ekstrahovani biljni materijal je potom osušen u struji hladnog vazduha (oko 1h) do potpunog uklanjanja metanola, a zatim prenet u Erlenmajerovu tikvicu sa brušenim grlom i preleven sa 300 ml destilovane vode. Biljni materijal je ekstrahovan 60 minuta na temperaturi od 90 °C, uz povratni hladnjak i intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici (600 obrtaja/min).

Vodeni ekstrakt je od biljnog materijala odvojen filtriranjem pod sniženim pritiskom na Bihnerovom levku, a biljni materijal je ponovo ekstrahovan na isti način. Sjedinjeni vodeni ekstrakti su zatim upareni do suva strujom vazduha sobne

temperature. Kao krajnji proizvod ekstrakcije dobijen je suvi ekstrakt žuto-oker boje, koji je neposredno pred aplikaciju, rastvaran u fiziološkom rastvoru do potrebne koncentracije (50, 100 ili 200 mg u 2,5 ml fiziološkog rastvora).

4.1.3. Uzimanje uzoraka krvi

Po isteku predviđenog vremena od 24h, pacovi su uvedeni u kratkotrajnu etarsku anesteziju, tokom koje im je kardijalnom punkcijom uzimana krv za hematološke i biohemijske analize, a zatim su žrtvovani aplikovanjem po 0,1 ml T-61 (Intervet International B.V. Boxmeer. The Netherlands) sa antirespiratornim delovanjem. Uzorci heparinizirane krvi (15 IJ heparina po ml krvi) su podeljeni na dva dela, od kojih je jedan ostavljen kao puna krv, a drugi je centrifugovan 15 min na 2500 rpm radi izdvajanja krvne plazme. U punoj krvi su, neposredno po uzimanju, određivane vrednosti hematoloških parametara i brzina sedimentacije eritrocita. Krvna plazma je zamrzavana na -20 °C i čuvana do analiza, kojima su određivane koncentracije proteina akutne faze - albumina, fibrinogena i haptoglobina. Za određivanje funkcija neutrofilnih granulocita (stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska), krv je uzimana u BD Vacutainere sa 102 IJ litijum heparina.

4.2. METODE

4.2.1. Određivanje vrednosti hematoloških parametara

Vrednosti parametara krvne slike: broja ukupnih leukocita, broja i procenta neutrofilnih granulocita, broja i procenta limfocita, broja i procenta monocita, broja eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti, određivane su u punoj heparinizovanoj krvi na automatskom hematološkom analizatoru "Arcus Diatron[®]", Gmbh Wien, Austria.

Neutrofilno/limfocitni indeks je izračunavan pomoću formule: $I = (\text{broj neutrofilnih granulocita} : \text{broj limfocita}) \times 100$.

Brzina sedimentacije eritrocita u krvi je određivana metodom po Westergreen-u, na osnovu visine stuba krvne plazme iznad istaloženih eritrocita, koja je očitavana posle 15 min, 30 min, 45 min i 60 min. Brzina sedimentacije eritrocita je izražena u milimetrima razdaljine koju pređe gornji sloj eritrocita taloženjem u određenom vremenskom periodu.

4.2.2. Određivanje koncentracije proteina akutne faze – albumina, fibrinogena i haptoglobina u krvnoj plazmi

Koncentracije albumina i fibrinogena kao proteina akutne zapaljenske reakcije, su određivane u krvnoj plazmi pacova na automatskom biohemijskom analizatoru "Basic Secomam", BP 106, 95334 Domont Cedex, France, kolorimetrijskom metodom.

Za određivanje koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi pacova je korišćen komercijalni Rat Haptoglobin ELISA Test Kit, kataloški broj 40-374-130017 (GenWaybio Biotech, Inc. San Diego, CA) na čitaču Elx 800TM, BioTek Instruments, USA. Direktna imunoenzimski postupak dvostrukih antitela sendvič ELISA testa se zasniva na reakciji haptoglobina prisutnog u uzorcima plazme sa anti-haptoglobin antitelima, koja su adsorbovana na površini polietilenske mikrotitar ploče sa 96 bazena. Koncentrovani diluent u količini od 50 ml je razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:4, a zatim su uzorci plazme razblaženi ovim diluentom 10 000 puta u dva koraka (mešanjem 5 µl uzorka + 495 µl diluenta dobijen je uzorak 1/100; mešanjem 5 µl uzorka 1/100 + 495 µl diluenta dobijen je uzorak 1/10 000). Istovremeno sa uzorcima plazme su tretirani i standardi koji sadrže različite, ali tačno definisane koncentracije haptoglobina (0, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 65.5 i 125 ng/ml). Po 100 µl rastvora uzoraka i standarda je naneto u polja mikrotitar ploče, koja je prekrivena i inkubirana na 22 °C (sobna temperatura) 15 min. Nakon inkubacije, polja su isprana tri puta rastvorom za ispiranje radi uklanjanja nevezanih proteina, a zatim je u svako polje dodato po 100 µl rastvora konjugata peroksidaze i anti-haptoglobin antitela (dobijen razblaživanjem 10 µl koncentrovanog konjugata sa 990 µl diluenta). Ploča je prekrivena i inkubirana u mraku na 22 °C 15 min, pri čemu su enzimom označena antitela stvorila kompleks sa haptoglobinom prethodno vezanim za anti-haptoglobin antitela, tako da se molekuli haptoglobina nalaze u sendviču između imobilisanih i detektovanih antitela.

Ponovljeno je ispiranje tri puta rastvorom za ispiranje, a zatim je u svako polje dodato po 100 µl rastvora hromogenog supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin i vodonik peroksid u citratnom puferu, pH 3,3). Prekrivena ploča je nakon toga inkubirana u mraku još 10 min na 22 °C, što je rezultiralo pojavom plave boje. Reakcija je zaustavljena nanošenjem po 100 µl stop rastvora (0,3 M sumporne kiseline), pri čemu se boja promenila u žutu. Koncentracija haptoglobina je proporcionalna optičkoj gustini koja je očitavana spektrofotometrijski na 450 nm. Količina vezanog enzima zavisi direktno od koncentracije haptoglobina u ispitivanim uzorcima, tako da je absorbanca na 450 nm mera koncentracije haptoglobina. Na osnovu očitanih vrednosti standarda je formirana kalibraciona kriva pomoću koje su određivane koncentracije haptoglobina u uzorcima krvne plazme.

4.2.3. Određivanje funkcija neutrofilnih granulocita (stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska) u punoj krvi

Stepen fagocitoze i intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita u punoj heparinizovanoj krvi su određivani na aparatu za protočnu citometriju (FASC) "Guava EasyCyte" Guava Technologies, Hayward, California, upotrebom komercijalnih testova Phagotest i Phagoburst (Glycotope Biotechnology, GmbH, Heidelberg, Germany).

Phagotest omogućava kvantitativno određivanje fagocitozne aktivnosti neutrofilnih granulocita u heparinizovanoj punoj krvi, odnosno utvrđivanje procenta fagocita koji imaju unete bakterije (jednu ili više) i individualne ćelijske aktivnosti (broj bakterija po ćeliji). Heparinizirana puna krv je lagano izmešana i uzorci od po 100 µl su pipetirani na dno dve polipropilen (# 2053) ili polistiren (# 2152) epruvete (12×75 mm Falcon™) i inkubirani u ledenom kupatilu 10 min da bi se ohladili na 0 °C. Aktivacija je izvršena dodavanjem po 20 µl prethodno na 0 °C ohlađene suspenzije stabilizovanih i opsonizovanih, fluorescinom (FITC) označenih bakterija *E. coli* (*E. coli*-FITC, ~ 1 × 10⁹ bakterija/ml). Nakon laganog mešanja u trajanju od 2-3 sekunde, kontrolni uzorci su stavljeni na led, a test uzorci su inkubirani 10 min na 37 °C u vodenom kupatilu. Posle inkubacije, svi uzorci su stavljeni na led, dodato je po 100 µl ohlađenog rastvora za zaustavljanje fagocitoze (quenching solution) i sadržaj epruveta je

promešan. Uzorci su zatim ispirani u dva koraka sa po 3 ml rastvora za ispiranje (prvo se doda 1ml, lagano se izmeša, a zatim se doda 2 ml rastvora za ispiranje), centrifugirani (5 min, 250×g, 2-8 °C), aspiriran je supernatant i ostavljeno je oko 100 µl sadržaja. U cilju uklanjanja eritrocita i istovremenog fiksiranja leukocita, punoj krvi je na sobnoj temperaturi (20-25 °C) dodato 2 ml rastvora koji vrši lizu (lysing solution), epruvete su promešane, inkubirane 20 min na sobnoj temperaturi, centrifugirane (5 min, 250×g, 2-8 °C) i aspiriran je supranatant, pri čemu je ostavljeno oko 100 µl sadržaja. Uzorci su isprani još jednom sa 3 ml rastvora za ispiranje, centrifugirani (5 min, 250×g, 2-8 °C) i aspiriran je supranatant, a ostavljeno je oko 100 µl sadržaja. Neposredno pre analize protočnom citometrijom, dodato je 200 µl DNA bojenog rastvora koji isključuje objedinjavanje artefakata bakterija ili trombocita, sadržaj je izmešan i inkubiran 10 min na ledu zaštićen od svetla. Procenat ćelija koje su izvršile fagocitozu (uneta jedna ili više bakterija) je analiziran protočnom citometrijom primenom plavo-zelenog ekscitacionog svetla (488 nm argon-jonski laser).

Phagoburst test sadrži rastvor za ispiranje (hloracetamid i natrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline, reagens A), suspenziju neobeležanih opsonizovanih bakterija *E. coli* ($1-2 \times 10^9$ bakterija/ml, reagens B) kao podsticajne čestice, nizak fiziološki stimulans hemotaksni peptid N-formil-MetLeuPhe (fMLP, reagens C), visoki stimulans protein kinazu C ligand forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, reagens D), dihidrorodamin (DHR) 123 (reagens E) kao fluorescentnu podlogu, lizing rastvor (dietilenglikol i formaldehid, reagens F) i DNA bojeni rastvor (reagens G) za citometrijsko razlikovanje bakterija tokom analize rezultata. Uzorci od po 100 µl pune heparinizirane krvi su lagano izmešani u test epruvetama zapremine 5 ml (12×75 mm Falcon, Becton Dickinson No. 352052) i inkubirani u ledenom kupatilu 10 min da bi se ohladili na 0 °C. Aktivacija je izvršena na taj način što je u jednu epruvetu koja je služila kao negativna kontrola dodato 20 µl rastvora za ispiranje, u drugu 20 µl suspenzije bakterija *E. coli*, u treću 20 µl fMLP ("niska kontrola") i u četvrtu 20 µl PMA ("visoka kontrola"). Sadržaj u svim epruvetama je još jednom promešan, a zatim su inkubirane u vodenom kupatilu 10 min na 37 °C. Po isteku ovog vremena, u epruvete je dodato po 20 µl DHR 123, uzorci su ponovo promešani i inkubirani u vodenom kupatilu 10 min na 37 °C (faza oksidacije). Reakcija je zaustavljena dodavanjem u svaku epruvetu po 2 ml reagensa F koji vrši lizu eritrocita i delimičnu fiksaciju

leukocita. Uzorci su promešani, inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi, centrifugovani (5 min, $250 \times g$, 2-8 °C), a potom su dekantovani (supernatant je odbačen). Izvršeno je ispiranje dodavanjem po 3 ml rastvora za ispiranje, epruvete su ponovo centrifugovane i supernatant je aspiriran. Dodato je po 200 μ l DNA bojenog rastvora da bi se isključilo objedinjavanje artefakata bakterija ili ćelija. Sadržaj u epruvetama je promešan i one su inkubirane 10 min u ledenom kupatilu, zaštićene od svetla. Procenat ćelija koje proizvode reaktivne oksigene metabolite je analiziran protočnom citometrijom primenom plavo-zelenog ekscitacionog svetla (488 nm argon-jonski laser).

4.2.4. Statistička obrada rezultata

Svi dobijeni rezultati su statistički obrađeni pomoću softverskog paketa SPSS 8.0. Međugrupna poređenja i analiza stepena statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti ispitivanih parametara je izvršena Studentovim t - testom na nivou rizika od 5%, 1% i 0,1%, pa su i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnoćom (95%, 99% i 99,9%).

Dobijeni i statistički obrađeni rezultati su prikazani numerički u vidu tabela i grafički u vidu histograma, radi vizuelne komparacije eksperimentalno utvrđenih numeričkih vrednosti.

5. REZULTATI

Radi bolje preglednosti, dobijeni rezultati su grupisani i izloženi u nekoliko podpoglavlja u skladu sa definisanim ciljevima i zadacima istraživanja. Sve ogledne grupe su se sastojale od po 7 pacova soja Wistar, oba pola, u uzrastu od 2 meseca, prosečne telesne mase 200-240 g. Grupe pacova su obeležene na sledeći način:

FR - kontrolna grupa pacova kojima je intramuskularno (IM) aplikovan fiziološki rastvor u količini od 2,5 ml/kg TM, što odgovara zapremini aplikovanog ekstrakta kukureka

FR-Tween80 - kontrolna grupa pacova kojima je IM aplikovan 0,5% rastvor Tween 80 u fiziološkom rastvoru u količini od 2,5 ml/kg TM

Grupe kojima je IM aplikovan ekstrakt podzemnih organa kukureka:

Grupe PEK – grupe pacova kojima je aplikovan petroletarski ekstrakt rizoma i korena kukureka

PEK 50 50 mg/kg TM

PEK 100 100 mg/kg TM

PEK 200 200 mg/kg TM

Grupe HEK – grupe pacova kojima je aplikovan hloroformski ekstrakt rizoma i korena kukureka

HEK 50 50 mg/kg TM

HEK 100 100 mg/kg TM

HEK 200 200 mg/kg TM

Grupe MEK – grupe pacova kojima je aplikovan metanolni ekstrakt rizoma i korena kukureka

MEK 50 50 mg/kg TM

MEK 100 100 mg/kg TM

MEK 200 200 mg/kg TM

Grupe EK – grupe pacova kojima je aplikovan vodeni ekstrakt rizoma i korena kukureka

EK 50 50 mg/kg TM

EK 100 100 mg/kg TM

EK 200 200 mg/kg TM

DM1 – grupa pacova koji su 3 dana IM tretirani deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM

DM1+FR - grupa pacova koji su 3 dana IM tretirani deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM, a četvrtog dana IM fiziološkim rastvorom u količini od 2,5 ml/kg

Grupe DM+MEK – grupe pacova koje su 3 dana IM tretirane deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM, a četvrtog dana IM metanolnim ekstraktom u različitim dozama:

DM1+MEK50 50 mg/kg TM

DM1+MEK100 100 mg/kg TM

DM1+MEK200 200 mg/kg TM

Grupe DM+EK – grupe pacova koje su 3 dana IM tretirane deksametazonom u dozi od 1 mg/kg TM, a četvrtog dana IM vodenim ekstraktom u različitim dozama:

DM1+EK50 50 mg/kg TM

DM1+EK100 100 mg/kg TM

DM1+EK200 200 mg/kg TM

U ovom poglavlju su izneti rezultati dobijeni statističkom obradom vrednosti pojedinih parametara, dok su pojedinačne vrednosti prikazane u Prilogu disertacije.

5.1. REZULTATI HEMATOLOŠKIH ISPITIVANJA

5.1.1. Osnovni hematološki parametri i parametri akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikovanja fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80

Rezultati dobijeni ispitivanjem vrednosti osnovnih hematoloških parametara, kao i parametara akutne zapaljenske reakcije - sedimentacije eritrocita (posle 15, 30, 45 i 60 min), koncentracije albumina i fibrinogena, 24h nakon aplikacije sterilnog fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80 u fiziološkom rastvoru, u količini od 2,5 ml/kg TM, intramuskularno u zadnji ekstremitet pacova, su prikazani u tabelama 5.1.1.A. i 5.1.1.B. Rezultati analize statističke značajnosti utvrđenih razlika u srednjim vrednostima ovih parametara su dati u tabelama 5.1.1.a. i 5.1.1.b.

Tabela 5.1.1.A. Vrednosti osnovnih hematoloških parametara 24h nakon aplikacije fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80 u fiziološkom rastvoru (2,5 ml/kg)

Osnovni hematološki parametri	$\bar{x} \pm SD$	
	FR	FR-Tween80
Broj ukupnih leukocita ($10^9/L$)	8,61±0,57	7,93±0,63
Broj neutrofilnih granulocita ($10^9/L$)	2,43±0,26	2,47±0,68
Procenat neutrofilnih granulocita (%)	28,26±3,10	31,09±8,03
Broj limfocita ($10^9/L$)	5,67±0,47	5,04±0,75
Procenat limfocita (%)	65,90±4,28	63,61±9,20
Neutrofilno/limfocitni indeks	43,22±6,90	51,08±18,30
Broj monocita ($10^9/L$)	0,51±0,32	0,42±0,13
Procenat monocita (%)	5,84±3,24	5,30±1,77
Broj eritrocita ($10^{12}/L$)	6,90±0,18	6,36±0,67
Broj trombocita ($10^9/L$)	723,14±178,68	713,86±95,25
Koncentracija hemoglobina (g/L)	118,14±2,41	122,86±5,58
Hematokritska vrednost (%)	38,11±1,11	36,39±1,94

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.1.A. uočljivo je da su u krvi pacova 24 posle aplikacije fiziološkog rastvora u odnosu na grupu tretiranu sa 0,5% rastvora Tween 80, zabeležene veće prosečne vrednosti broja ukupnih leukocita (Le) ($8,61 \pm 0,57 \times 10^9/L$ vs $7,93 \pm 0,63 \times 10^9/L$), broja limfocita (Lym) ($5,67 \pm 0,47 \times 10^9/L$ vs $5,04 \pm 0,75 \times 10^9/L$), procenta limfocita (Lym%) ($65,90 \pm 4,28\%$ vs $63,61 \pm 9,20\%$), broja monocita (Mo)

($0,51 \pm 0,32 \times 10^9/L$ vs $0,42 \pm 0,13 \times 10^9/L$), procenta monocita (Mo%) ($5,84 \pm 3,24\%$ vs $5,30 \pm 1,77\%$), broja eritrocita (Er) ($6,90 \pm 0,18 \times 10^{12}/L$ vs $6,36 \pm 0,67 \times 10^{12}/L$), broja trombocita (Tr) ($723,14 \pm 178,68 \times 10^9/L$ vs $713,86 \pm 95,25 \times 10^9/L$), hematokritske vrednosti (Hct) ($38,11 \pm 1,11\%$ vs $36,39 \pm 1,94$) i niže prosečne vrednosti broja neutrofilnih granulocita (Gr) ($2,43 \pm 0,26 \times 10^9/L$ vs $2,47 \pm 0,68 \times 10^9/L$), procenta neutrofilnih granulocita (Gr%) ($28,26 \pm 3,10\%$ vs $31,09 \pm 8,03\%$), neutrofilno/limfocitnog indeksa (Ne/Lym) ($43,22 \pm 6,90$ vs $51,08 \pm 18,30$) i koncentracije hemoglobina (Hb) ($118,14 \pm 2,41$ g/L vs $122,86 \pm 5,58$ g/L).

Tabela 5.1.1.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti osnovnih hematoloških parametara 24h nakon aplikacije fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80 u fiziološkom rastvoru (2,5 ml/kg)

Grupa	Osnovni hematološki parametri											
	Le	Gr	Gr%	Lym	Lym%	Ne/Lym	Mo	Mo%	Er	Tr	Hb	Hct
FR : FR-Tween80	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti osnovnih hematoloških parametara prikazanih u tabeli 5.1.1.a., može se konstatovati da nisu postojale statistički signifikantne razlike ($P > 0,05$) ovih vrednosti registrovanih u pojedinim grupama životinja.

Tabela 5.1.1.B. Vrednosti parametara akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikacije fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80 u fiziološkom rastvoru (2,5 ml/kg)

Parametri akutne zapaljenske reakcije	$\bar{x} \pm SD$	
	FR	FR-Tween80
Vrednost sedimentacije posle 15 min (mm/15min)	$0,43 \pm 0,53$	$0,29 \pm 0,49$
Vrednost sedimentacije posle 30 min (mm/30min)	$1,86 \pm 0,90$	$1,57 \pm 0,53$
Vrednost sedimentacije posle 45 min (mm/45min)	$3,14 \pm 1,46$	$3,00 \pm 0,58$
Vrednost sedimentacije posle 60 min (mm/60min)	$4,57 \pm 1,62$	$4,43 \pm 0,98$
Koncentracija albumina (g/L)	$35,86 \pm 10,64$	$37,57 \pm 7,96$
Koncentracija fibrinogena (g/L)	$1,50 \pm 0,15$	$1,30 \pm 0,22$

Rezultati prikazani u tabeli 5.1.1.B. ukazuju da su prosečne vrednosti sedimentacije posle 15 min (SE – 15 min), 30 min (SE – 30 min), 45 min (SE – 45 min) i 60 min (SE – 60 min), u grupi pacova 24 posle aplikacije fiziološkog rastvora iznosile

0,43±0,53 mm, 1,86±0,90 mm, 3,14±1,46 mm i 4,57±1,62 mm, dok su u grupi tretiranoj sa 0,5% rastvorom Tween 80, zabeležene vrednosti bile 0,29±0,49 mm, 1,57±0,53 mm, 3,00±0,58 mm i 4,43±0,98 mm. Srednja vrednost koncentracije albumina u krvi pacova 24h posle aplikacije fiziološkog rastvora je iznosila 35,86±10,64 g/L, a fibrinogena 1,50±0,15 g/L, dok su u grupi kojoj je aplikovan 0,5% rastvor Tween 80 ove vrednosti bile 37,57±7,96 g/L i 1,30±0,22 g/L.

Tabela 5.1.1.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti parametara akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikacije fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80 u fiziološkom rastvoru (2,5 ml/kg)

Grupa	Parametri akutne zapaljenske reakcije					
	SE – 15 min	SE – 30 min	SE – 45 min	SE – 60 min	Koncentracija albumina	Koncentracija fibrinogena
FR : FR-Tween80	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Grupa pacova 24h nakon aplikacije 0,5% rastvora Tween 80 je imala manje srednje vrednosti svih parametara akutne zapaljenske reakcije, osim koncentracije albumina, u odnosu na kontrolnu grupu 24h posle aplikacije fiziološkog rastvora, ali između navedenih grupa nije uočena statistički značajna razlika u ovim vrednostima ($P>0,05$) (Tabela 5.1.1.b.).

5.1.2. Broj ukupnih leukocita (Le)

Rezultati ispitivanja broja ukupnih leukocita 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora pacovima kontrolne grupe i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50 mg/kg TM, 100 mg/kg TM ili 200 mg/kg TM pacovima oglednih grupa, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazani u tabeli 5.1.2. U tabelama 5.1.2.a., 5.1.2.b., 5.1.2.c., 5.1.2.d. i 5.1.2.e. su dati rezultati analize statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih leukocita.

Tabela 5.1.2. Osnovni statistički parametri za broj ukupnih Le ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	8,61	0,57	0,22	6,62	8,14-9,41
PEK 50	10,48	1,23	0,46	11,69	9,00-12,10
PEK 100	6,50	2,50	0,95	38,47	4,21-10,40
PEK 200	7,96	0,70	0,27	8,83	7,09-9,37
HEK 50	6,13	1,36	0,51	22,10	4,71-7,96
HEK 100	8,21	1,25	0,47	15,19	6,79-10,50
HEK 200	7,63	0,71	0,27	9,32	6,57-8,38
MEK 50	9,46	2,95	1,12	31,22	5,90-13,30
MEK 100	13,01	1,09	0,41	8,36	12,00-15,00
MEK 200	18,67	2,59	0,98	13,88	13,70-21,20
EK 50	10,09	3,59	1,36	35,58	5,97-15,10
EK 100	10,58	1,15	0,43	10,87	9,27-12,10
EK 200	13,81	3,62	1,37	26,21	9,04-17,70
DM1	7,73	1,04	0,39	13,46	6,50-9,13
DM1+FR	14,69	3,20	1,21	21,78	10,90-18,00
DM1+MEK50	22,49	5,68	2,15	25,27	17,60-30,90
DM1+MEK100	25,53	4,27	1,61	16,73	17,30-31,20
DM1+MEK200	17,14	5,23	1,98	30,50	11,00-22,80
DM1+EK50	18,17	4,61	1,74	25,38	11,00-23,10
DM1+EK100	14,17	4,73	1,79	33,35	8,51-18,80
DM1+EK200	14,35	4,79	1,81	33,38	8,33-18,60

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.2. zapaža se da je prosečan broj ukupnih leukocita u krvi kontrolne grupe pacova bio $8,61 \pm 0,57 \times 10^9/L$. Kod pacova tretiranih intramuskularno petroletarskim ekstraktom kukureka u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM, ova vrednost je nakon 24h iznosila: $10,48 \pm 1,23 \times 10^9/L$, $6,50 \pm 2,50 \times 10^9/L$ i $7,96 \pm 0,70 \times 10^9/L$. Nakon aplikacije hloroformskog ekstrakta utvrđene vrednosti su bile $6,13 \pm 1,36 \times 10^9/L$, $8,21 \pm 1,25 \times 10^9/L$ i $7,63 \pm 0,71 \times 10^9/L$, a posle primene metanolnog ekstrakta $9,46 \pm 2,95 \times 10^9/L$, $13,01 \pm 1,09 \times 10^9/L$ i $18,67 \pm 2,59 \times 10^9/L$. Srednje vrednosti broja leukocita posle tretmana vodenim EK su iznosile $10,09 \pm 3,59 \times 10^9/L$,

10,58±1,15×10⁹/L i 13,81±3,62×10⁹/L. Nakon trokratne intramuskularne aplikacije deksametazona broj ukupnih leukocita je bio 7,73±1,04×10⁹/L, dok 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene su vrednosti: 14,69±3,20×10⁹/L (FR), 22,49±5,68×10⁹/L, 25,53±4,27×10⁹/L i 17,14±5,23×10⁹/L (MEK), 18,17±4,61×10⁹/L, 14,17±4,73×10⁹/L i 14,35±4,79×10⁹/L (EK).

Tabela 5.1.2.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih Le u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,01	P<0,05	NSZ
PEK 50	-	P<0,01	P<0,01
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Srednja vrednost broja ukupnih Le u krvi pacova kontrolne grupe bila je statistički značajno niža u odnosu na srednju vrednost broja Le u krvi pacova 24h posle aplikacije PEK 50 mg/kg TM i to na nivou značajnosti od P<0,01, a značajno viša u odnosu na grupu tretiranu sa PEK 100 mg/kg TM (P<0,05). Između kontrolne grupe i grupe nakon aplikacije PEK 200 mg/kg TM nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti (P>0,05). Statistički značajno više srednje vrednosti broja ukupnih Le (P<0,01) su utvrđene kod grupe posle primene PEK 50mg/kg TM u odnosu na grupe koje su tretirane većim dozama petroletarskog ekstrakta kukureka. Srednje vrednosti broja leukocita posle aplikacije petroletarskog ekstrakta u dozama od 100 i 200 mg/kg TM su se razlikovale, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05) (Tabela 5.1.2.a.).

Tabela 5.1.2.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih Le u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,001	NSZ	P<0,05
HEK 50	-	P<0,01	P<0,05
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Utvrđeno je postojanje statistički značajno većeg broja Le u krvi pacova kontrolne grupe u odnosu na grupe 24h nakon aplikacije hloroformskog ekstrakta u dozama od 50 mg/kg TM (P<0,001) i 200 mg/kg TM (P<0,05). Između kontrolne i

ogledne grupa kojoj je aplikovan HEK 100 mg/kg TM nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$). Kod oglednih grupa, najveća srednja vrednost broja ukupnih Le je zabeležena kod grupe tretirane sa HEK 100 mg/kg TM, a ustanovljena razlika ove vrednosti je vrlo signifikantna ($P < 0,01$) u odnosu na grupu koja je primila ekstrakt u dozi od 50 mg/kg TM, a nije značajna ($P > 0,05$) u odnosu na grupu kojoj je aplikovana duplo veća doza (200 mg/kg TM). Grupa kojoj je aplikovano 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta je imala značajno veću vrednost ovog parametra nego grupa tretirana sa 50 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,05$) (Tabela 5.1.2.b.).

Tabela 5.1.2.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih Le u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	NSZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$
MEK 50	-	$P < 0,01$	$P < 0,001$
MEK 100	-	-	$P < 0,01$

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja Le prikazanih u tabeli 5.1.2.c., može se zaključiti da je postojala visoko signifikantna razlika ($P < 0,001$) između kontrolne grupe i grupa MEK 100 i MEK 200, dok u odnosu na grupu MEK 50 razlika nije bila statistički značajna, pri čemu je ukupan broj Le u krvi pacova grupa tretiranih metanolnim ekstraktom kukureka bio viši nego kod grupe kojoj je aplikovan sterilan fiziološki rastvor. Utvrđen je statistički značajno manji broj Le kod grupe MEK 50 u odnosu na grupe tretirane ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM ($P < 0,01$) ili 200 mg/kg TM ($P < 0,001$). Statistički vrlo signifikantna razlika ($P < 0,01$) je utvrđena između grupa MEK 100 i MEK 200, pri čemu je broj Le bio veći u krvi grupe koja je primila veću dozu metanolnog ekstrakta.

Tabela 5.1.2.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih Le u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	$P < 0,05$	$P < 0,001$
EK 50	-	NSZ	$P < 0,05$
EK 100	-	-	$P < 0,05$

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima broja ukupnih Le između pacova kontrolne grupe i oglednih grupa 24h nakon aplikacije EK je prikazana

u tabeli 5.1.2.d. Razlika u broju Le u krvi pacova posle aplikacije EK 50 mg/kg TM nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu ($P>0,05$), dok je značajno povećanje ukupnog broja leukocita u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđeno nakon aplikacije EK 100 mg/kg TM na nivou značajnosti od $P<0,05$ i EK 200 mg/kg TM, i to na nivou značajnosti od $P<0,001$. Statistički značajno manji broj Le je utvrđen u grupama EK 50 i EK 100 u odnosu na EK 200 ($P<0,05$), dok razlika u broju Le između grupa EK 50 i EK 100 nije bila signifikantna ($P>0,05$).

Tabela 5.1.2.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja ukupnih Le u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,01
	DM1+ FR	P<0,01	P<0,001	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	NSZ	P<0,05	P<0,05
			DM1+ MEK100	P<0,01	P<0,01	P<0,001	P<0,001
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.2.e., ukazuje da su statistički značajno veću srednju vrednosti broja ukupnih leukocita imale grupe koje su četvrtog dana nakon trokratne aplikacije deksametazona tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, vodenim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM (na nivou značajnosti od $P<0,001$) ili sa 100 i 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka ($P<0,01$) u odnosu na grupu koja je trokratno dobila deksametazon. Kod grupa koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka (osim DM1+EK100 i DM1+EK200) utvrđena je veća vrednost ovog parametra nego kod grupe kojoj je aplikovan fiziološki rastvor, pri čemu su signifikantne razlike postojale samo u odnosu na DM1+MEK50 ($P<0,01$) i DM1+MEK100 ($P<0,001$). Grupa DM1+MEK100 je imala veći broj leukocita u odnosu na ostale ogledne grupe, pri čemu je nivo značajnosti

iznosio $P < 0,01$ (za grupe DM1+MEK200 i DM1+EK50) i $P < 0,001$ (za grupe DM1+EK100 i DM1+EK200), a nije bilo značajne razlike u odnosu na DM1+MEK50. Kod poslednje navedene grupe je utvrđen značajno veći srednji broj leukocita u odnosu na grupe tretirane sa 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P < 0,05$), dok između pacova ostalih ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima ovog parametra ($P > 0,05$).

5.1.3. Broj neutrofilnih granulocita (Gr)

Vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi i mere varijacije ovog parametra, 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora pacovima kontrolne grupe i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50 mg/kg TM, 100 mg/kg TM ili 200 mg/kg TM pacovima oglednih grupa, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazane u tabeli 5.1.3. Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita je prikazana u tabelama 5.1.3.a., 5.1.3.b., 5.1.3.c., 5.1.3.d. i 5.1.3.e.

Tabela 5.1.3. Osnovni statistički parametri za broj neutrofilnih granulocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	2,43	0,26	0,10	10,85	2,01-2,74
PEK 50	4,94	0,61	0,23	12,30	4,06-5,73
PEK 100	2,03	1,04	0,39	51,16	1,10-4,10
PEK 200	2,35	0,41	0,16	17,60	1,83-3,11
HEK 50	1,89	0,32	0,12	17,11	1,54-2,44
HEK 100	2,83	0,42	0,16	14,77	2,26-3,28
HEK 200	2,48	0,33	0,12	13,19	1,92-2,99
MEK 50	4,99	1,71	0,64	34,15	3,22-8,18
MEK 100	8,06	1,08	0,41	13,38	6,61-9,29
MEK 200	15,31	2,79	1,06	18,23	11,30-18,20
EK 50	6,30	2,72	1,03	43,16	3,55-9,87
EK 100	7,76	0,83	0,31	10,67	6,07-8,37
EK 200	11,39	4,64	1,75	40,76	5,12-15,80
DM1	5,92	1,09	0,41	18,42	4,32-7,27
DM1+FR	10,49	2,34	0,88	22,29	7,25-12,80
DM1+MEK50	20,10	5,97	2,26	29,68	14,90-28,80
DM1+MEK100	22,24	3,64	1,37	16,35	15,50-26,60
DM1+MEK200	14,67	4,75	1,80	32,39	9,38-19,50
DM1+EK50	14,46	4,91	1,85	33,94	6,11-19,90
DM1+EK100	12,23	4,02	1,52	32,87	7,23-17,60
DM1+EK200	11,64	4,75	1,79	40,77	6,13-15,80

U tabeli 5.1.3. su prikazane srednje vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi pacova, koje su 24h nakon intramuskularnog aplikovanja petroletarskog ekstrakta kukureka u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM iznosile $4,94 \pm 0,61 \times 10^9/L$, $2,03 \pm 1,04 \times 10^9/L$ i $2,35 \pm 0,41 \times 10^9/L$. Ove vrednosti su nakon tretmana istim dozama hloroformskog ekstrakta bile $1,89 \pm 0,32 \times 10^9/L$, $2,83 \pm 0,42 \times 10^9/L$ i $2,48 \pm 0,33 \times 10^9/L$, metanolnog ekstrakta $4,99 \pm 1,71 \times 10^9/L$, $8,06 \pm 1,08 \times 10^9/L$ i $15,31 \pm 2,79 \times 10^9/L$, vodenog ekstrakta kukureka $6,30 \pm 2,72 \times 10^9/L$, $7,76 \pm 0,83 \times 10^9/L$ i $11,39 \pm 4,64 \times 10^9/L$. Srednja vrednost broja neutrofilnih granulocita je iznosila $2,43 \pm 0,26 \times 10^9/L$ kod kontrolne grupe

i $5,92 \pm 1,09 \times 10^9/L$ 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana. Posle trokratne primene deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene su vrednosti: $10,49 \pm 2,34 \times 10^9/L$ (FR), $20,10 \pm 5,97 \times 10^9/L$, $22,24 \pm 3,64 \times 10^9/L$ i $14,67 \pm 4,75 \times 10^9/L$ (MEK), $14,46 \pm 4,91 \times 10^9/L$, $12,23 \pm 4,02 \times 10^9/L$ i $11,64 \pm 4,75 \times 10^9/L$ (EK).

Tabela 5.1.3.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	NSZ	NSZ
PEK 50	-	P<0,001	P<0,001
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i 24h posle aplikacije petroletarskog ekstrakta različitih doza, prikazana u tabeli 5.1.3.a., ukazuje na visoko signifikantnu razliku ($P < 0,001$) između kontrolne grupe i grupe PEK 50, pri čemu je broj neutrofilnih granulocita bio značajno veći kod grupe tretirane ekstraktom. Kod ove ogledne grupe je utvrđen statistički značajno veći broja neutrofilnih granulocita u krvi u odnosu na grupe PEK 100 i PEK 200 i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Prosečne vrednosti broja neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i grupa kojima je aplikovano 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta vrlo malo su se razlikovale i ove razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.3.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,01	P<0,05	NSZ
HEK 50	-	P<0,001	P<0,01
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima broja neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i 24h posle aplikacije hloroformskog ekstrakta različitih doza, data u tabeli 5.1.3.b., ukazuje da su razlike između prosečnih vrednosti broja neutrofilnih granulocita posle aplikacije HEK 50 mg/kg TM i ostalih ispitivanih

grupa signifikantne, pri čemu je ta vrednost bila značajno niža posle tretmana sa HEK 50 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu i HEK 200 grupu ($P<0,01$), dok je u odnosu na grupu HEK 100 razlika visoko signifikantna ($P<0,001$). Srednja vrednost broja neutrofilnih granulocita u krvi ogledne grupe HEK 100 je bila statistički značajno viša ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu, a posle aplikacije ekstrakta u dozi 200 mg/kg TM utvrđena je relativno mala razlika ove vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu, koja nije statistički signifikantna ($P>0,05$). Između grupa kojima je aplikovano 100 i 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta razlika nije bila statistički značajna ($P>0,05$).

Tabela 5.1.3.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,01	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,01	P<0,001
MEK 100	-	-	P<0,001

Iz analize prikazane u tabeli 5.1.3.c., uočavaju se statistički značajne razlike između svih ispitivanih grupa, pri čemu je broj neutrofilnih granulocita veći u sve tri ogledne grupe 24h posle aplikovanja metanolnog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu. U grupi MEK 50 vrednost ovog parametra je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,01$) i značajno niža u odnosu na grupu MEK 100 na nivou značajnosti od $P<0,01$ i grupu MEK 200 na nivou značajnosti $P<0,001$. Razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i grupa tretiranih metanolnim ekstraktom u dozi 100 i 200 mg/kg TM je visoko značajna ($P<0,001$). Značajno veći broj neutrofilnih granulocita je utvrđen u krvi grupe tretirane ekstraktom u dozi od 200 mg/kg TM u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta ($P<0,001$).

Tabela 5.1.3.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,01	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	NSZ	P<0,05
EK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Tabela 5.1.3.d. sadrži podatke o nivou značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i oglednih grupa 24h posle aplikacije vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. U odnosu na kontrolnu grupu, postojao je statistički značajno veći broj neutrofilnih granulocita u krvi pacova 24h posle aplikacije EK 100 mg/kg TM ili EK 200 mg/kg TM i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Grupa pacova koja je tretirana sa EK 50 mg/kg TM je imala signifikantno veću vrednost ovog parametra od kontrolne grupe, ali je stepen značajnosti bio manji ($P < 0,01$). Utvrđen je statistički značajno veći broj neutrofilnih granulocita ($P < 0,05$) kod grupe EK 200 u odnosu na grupe EK 50 i EK 100 između kojih nema statistički signifikantne razlike, pri čemu je broj neutrofilnih granulocita veći u krvi grupe koja je primila veću dozu vodenog ekstrakta (100 mg/kg TM).

Tabela 5.1.3.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja neutrofilnih granulocita u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana FR, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
	DM1+ FR	$P < 0,01$	$P < 0,001$	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	NSZ	$P < 0,05$	$P < 0,05$
			DM1+ MEK100	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika prikazana u tabeli 5.1.3.e., ukazuje da su u odnosu na grupu koja je tri dana dobijala deksametazon, značajno veću srednju vrednosti broja neutrofilnih granulocita imale grupe koje su četvrtog dana dobile metanolni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM ili 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta, pri čemu su razlike bile visoko signifikantne ($P < 0,001$), dok su razlike bile na nivou $P < 0,01$ kod grupa koje su tretirane fiziološkim rastvorom ili sa 100 i 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka. Veća vrednost ovog parametra je utvrđena kod svih grupa koje su nakon

deksametazona dobile ekstrakt kukureka, u odnosu na grupu kojoj je četvrtog dana aplikovan fiziološki rastvor, ali su značajne razlike postojale samo u odnosu na DM1+MEK50 ($P<0,01$) i DM1+MEK100 ($P<0,001$). Grupa DM1+MEK100 je imala veću srednju vrednosti broja neutrofilnih granulocita u odnosu na ostale ogledne grupe, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P<0,01$ (za grupe DM1+MEK200 i DM1+EK50) i $P<0,001$ (za grupe DM1+EK100 i DM1+EK200), a nije bilo značajne razlike u odnosu na DM1+MEK50. Značajno veća vrednost ovog parametra je utvrđena kod grupe koja je nakon deksametazona tretirana sa 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta u odnosu na grupu tretirane sa 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P<0,05$), dok između ostalih ispitivanih grupa pacova nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima ovog parametra ($P>0,05$).

5.1.4. Procenat neutrofilnih granulocita (Gr %)

U tabeli 5.1.4. su prikazani rezultati određivanja procenta neutrofilnih granulocita u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50 mg/kg TM, 100 mg/kg TM ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM). Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita je data u tabelama: 5.1.4.a., 5.1.4.b., 5.1.4.c., 5.1.4.d. i 5.1.4.e.

Tabela 5.1.4. Osnovni statistički parametri za procenat neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	28,26	3,10	1,17	10,97	24,10-32,20
PEK 50	47,49	7,32	2,77	15,42	33,60-54,10
PEK 100	30,69	6,22	2,35	20,26	22,10-39,40
PEK 200	29,31	2,83	1,07	9,67	25,80-33,10
HEK 50	31,20	2,03	0,77	6,51	28,20-33,10
HEK 100	34,63	4,13	1,56	11,92	28,20-40,00
HEK 200	32,56	3,62	1,37	11,11	29,20-38,20
MEK 50	52,83	4,90	1,85	9,28	46,40-61,30
MEK 100	62,21	10,50	3,97	16,88	47,70-75,60
MEK 200	81,91	7,38	2,79	9,01	67,00-88,60
EK 50	61,53	9,50	3,59	15,44	50,60-75,90
EK 100	73,77	10,23	3,87	13,87	59,00-86,70
EK 200	79,79	17,24	6,52	21,61	48,60-91,70
DM1	76,51	9,39	3,55	12,28	61,80-85,20
DM1+FR	71,37	3,64	1,38	5,10	66,00-76,90
DM1+MEK50	88,64	4,90	1,85	5,53	81,90-95,90
DM1+MEK100	87,33	5,18	1,96	5,93	77,50-92,60
DM1+MEK200	85,09	2,61	0,99	3,07	82,00-89,40
DM1+EK50	77,83	11,04	4,17	14,19	55,10-87,60
DM1+EK100	86,57	4,57	1,73	5,28	80,50-93,60
DM1+EK200	79,20	8,30	3,14	10,48	67,30-88,70

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.4. se može zapaziti da je procenat neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe iznosio $28,26 \pm 3,10$ i da je ta vrednost približna procentima neutrofilnih granulocita u krvi pacova kojima je aplikovan petroletarski ekstrakt u dozi 100 odn. 200 mg/kg TM ($30,69 \pm 6,22$ odn. $29,31 \pm 2,83\%$) ili hloroformski ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM ($31,20 \pm 2,03$, $34,63 \pm 4,13$ odn. $32,56 \pm 3,62\%$). Vrednost ovog parametra 24h posle aplikacije PEK 50 mg/kg TM je bila $47,49 \pm 7,32\%$, nakon aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je iznosila $52,83 \pm 4,90$, $62,21 \pm 10,50$ i $81,91 \pm 7,38\%$, i posle tretmana vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM je bila $61,53 \pm 9,50$, $73,77 \pm 10,23$ i $79,79 \pm 17,24\%$. Tri

dana nakon aplikacije deksametazona zabeležen je procenat neutrofilnih granulocita od $76,51 \pm 9,39$, dok kod grupa koje su četvrtog dana primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM vrednosti ovog parametra su iznosile: $71,37 \pm 3,64$ (FR), $88,64 \pm 4,90$, $87,33 \pm 5,18$ i $85,09 \pm 2,61$ (MEK), $77,83 \pm 11,04$, $86,57 \pm 4,57$ i $79,20 \pm 8,30\%$ (EK).

Tabela 5.1.4.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	NSZ	NSZ
PEK 50	-	P<0,001	P<0,001
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.4.a., ukazuje da je statistički značajno veći procenat neutrofilnih granulocita zapažen 24h posle aplikovanja PEK 50 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu i grupe PEK 100 i PEK 200 (P<0,001). Utvrđene su relativno male razlike u srednjim vrednostima procenta neutrofilnih granulocita grupa PEK 100 i PEK 200 u odnosu na kontrolnu grupu, kao i između ovih oglednih grupa, pri čemu te razlike nisu bile statistički signifikantne (P>0,05).

Tabela 5.1.4.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	P<0,05	P<0,05
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita kontrolne grupe, 24h posle primene 50, 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta prikazana u tabeli 5.1.4.b., ukazuje da nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (P>0,05), osim između kontrolne grupe i oglednih grupa kojima je aplikovano po 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta, pri čemu je procenat neutrofilnih granulocita u krvi pacova tretiranih ekstraktom bio statistički značajno viši nego kod kontrolne grupe (P<0,05).

Tabela 5.1.4.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,05	P<0,001
MEK 100	-	-	P<0,01

Iz rezultata ispitivanja statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita, prikazanih u tabeli 5.1.4.c., uočava se da je ta vrednost bila značajno niža u kontrolnoj grupi u odnosu na ogledne grupe tretirane različitim dozama metanolnog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM), i to na nivou značajnosti od P<0,001. Ustanovljena razlika srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi pacova 24h posle primene 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je bila visoko signifikantna u odnosu na MEK 50 (P<0,001) i vrlo signifikantna u odnosu na MEK 100 (P<0,01), pri čemu je vrednost ovog parametra najveća kod grupe kojoj je aplikovana najveća doza ekstrakta. Procenat neutrofilnih granulocita u krvi pacova grupe MEK 100 je značajno viši u odnosu na grupu MEK 50 (P<0,05).

Tabela 5.1.4.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,05	P<0,05
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije različitih doza vodenog ekstrakta, prikazana u tabeli 5.1.4.d., ukazuje da su razlike između prosečnih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita 24h posle aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i tretmana ekstraktom ostalih ispitivanih grupa bile visoko signifikantne (P<0,001), pri čemu je ta vrednost značajno niža posle primene fiziološkog rastvora u odnosu na sve navedene grupe. Srednja vrednost broja neutrofilnih granulocita u krvi ogledne grupe 24h posle aplikacije 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta je statistički značajno niža u odnosu na grupe kod kojih je primenjen ekstrakt u dozi 100 ili 200 mg/kg TM, i to na

nivou značajnosti od $P < 0,05$. Između grupa kojima je aplikovano po 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta, razlika nije bila statistički značajna ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.4.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana FR, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$	NSZ
	DM1+ FR	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NSZ	$P < 0,001$	$P < 0,05$
	DM1+ MEK50		NSZ	NSZ	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$
	DM1+ MEK100			NSZ	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$
	DM1+ MEK200				NSZ	NSZ	NSZ
	DM1+ EK50					NSZ	NSZ
	DM1+ EK100						NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.4.e., ukazuje da je u odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, srednja vrednost procenta neutrofilnih granulocita bila značajno veća kod grupa koje su nakon deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM ili vodenim ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM ($P < 0,05$), dok razlika nije bila signifikantna kod grupa koje su dobile fiziološki rastvor ili 50 i 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka ($P > 0,05$). Kod svih grupa koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka, utvrđena je veća vrednost ovog parametra nego kod grupe kojoj je aplikovan fiziološki rastvor, pri čemu su visoko signifikantne razlike postojale u odnosu na grupe tretirane metanolnim ekstraktom različitih doza i vodenim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,001$), razlika je bila značajna u odnosu na DM1+EK200 ($P < 0,05$), a nije značajna u odnosu na DM1+EK50 ($P > 0,05$). Grupe DM1+MEK50 i DM1+MEK100, između kojih su utvrđene vrlo male razlike ($P > 0,05$), su imale veću srednju vrednost procenta neutrofilnih granulocita u odnosu na ostale ogledne grupe, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,05$ (za DM1+EK50 i DM1+EK200), a nije bilo značajne razlike

u odnosu na DM1+MEK200 i DM1+EK100. Između ostalih ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima ovog parametra ($P > 0,05$).

5.1.5. Broj limfocita (Lym)

Rezultati određivanja broja limfocita u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50 mg/kg TM, 100 mg/kg TM ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazani u tabeli 5.1.5. U tabelama 5.1.5.a., 5.1.5.b., 5.1.5.c., 5.1.5.d. i 5.1.5.e. je prikazana analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti broja limfocita ispitivanih grupa.

Tabela 5.1.5. Osnovni statistički parametri za broj limfocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	5,67	0,47	0,18	8,21	5,09-6,50
PEK 50	4,81	1,39	0,52	28,83	3,71-7,47
PEK 100	3,93	1,43	0,54	36,31	2,60-6,58
PEK 200	5,14	0,53	0,20	10,22	4,30-5,68
HEK 50	3,89	1,14	0,43	29,35	2,75-5,33
HEK 100	4,92	1,05	0,40	21,42	3,97-7,04
HEK 200	4,69	0,73	0,27	15,50	3,59-5,63
MEK 50	4,05	1,34	0,51	33,19	2,45-6,32
MEK 100	4,15	1,52	0,57	36,55	2,05-6,22
MEK 200	2,09	0,80	0,30	38,09	1,12-3,46
EK 50	2,96	1,24	0,47	42,06	1,87-5,44
EK 100	2,13	1,09	0,41	51,21	0,90-3,38
EK 200	1,69	1,36	0,51	80,62	0,68-4,25
DM1	1,34	0,67	0,25	50,00	0,79-2,68
DM1+FR	3,34	0,80	0,30	24,06	2,40-4,29
DM1+MEK50	1,53	0,46	0,17	30,22	0,80-1,95
DM1+MEK100	1,93	0,67	0,25	34,81	1,38-3,29
DM1+MEK200	1,65	0,46	0,17	27,91	1,15-2,40
DM1+EK50	2,74	1,03	0,39	37,54	1,75-4,53
DM1+EK100	1,41	0,91	0,35	64,94	0,69-2,81
DM1+EK200	1,80	0,35	0,13	19,40	1,29-2,32

Rezultati prikazani u tabeli 5.1.5. ukazuju da je srednja vrednost broja limfocita kod kontrolne grupe iznosila $5,67 \pm 0,47 \times 10^9/L$ krvi. Posle aplikacije ekstrakta kukureka u dozi od 50, 100 i 200 mg/kg TM, ispitivane vrednosti limfocita u krvi pacova su bile: $4,81 \pm 1,39 \times 10^9/L$, $3,93 \pm 1,43 \times 10^9/L$ i $5,14 \pm 0,53 \times 10^9/L$ nakon primene petrolearskog ekstrakta, $3,89 \pm 1,14 \times 10^9/L$, $4,92 \pm 1,05 \times 10^9/L$ i $4,69 \pm 0,73 \times 10^9/L$ nakon tretmana hloroformskim ekstraktom, $4,05 \pm 1,34 \times 10^9/L$, $4,15 \pm 1,52 \times 10^9/L$ i $2,09 \pm 0,80 \times 10^9/L$ posle aplikacije metanolnog ekstrakta i $2,96 \pm 1,24 \times 10^9/L$, $2,13 \pm 1,09 \times 10^9/L$ i $1,69 \pm 1,36 \times 10^9/L$ nakon aplikacije vodenog ekstrakta kukureka. Posle trokratne aplikacije deksametazona

broj limfocita je bio $1,34 \pm 0,67 \times 10^9/L$, dok 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su utvrđene vrednosti: $3,34 \pm 0,80 \times 10^9/L$ (FR), $1,53 \pm 0,46 \times 10^9/L$, $1,93 \pm 0,67 \times 10^9/L$ i $1,65 \pm 0,46 \times 10^9/L$ (MEK), $2,74 \pm 1,03 \times 10^9/L$, $1,41 \pm 0,91 \times 10^9/L$ i $1,80 \pm 0,35 \times 10^9/L$ (EK).

Tabela 5.1.5.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	P<0,01	NSZ
PEK 50	-	NSZ	NSZ
PEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize izložene u tabeli 5.1.5.a., zapaža se odsustvo statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima broja limfocita u krvi pacova kontrolne grupe u odnosu na grupe PEK 50 i PEK 200, kao i prisustvo značajno većeg broja limfocita kod kontrolne u odnosu na grupu PEK 100 (P<0,01). Utvrđen je veći broj limfocita u grupi PEK 200 nego u grupama koje su primile manje doze ekstrakta, pri čemu je ta razlika bila značajna u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 100 mg/kg TM ekstrakta (P<0,05), a nije statistički signifikantna u odnosu na grupu koja je primila 50 mg/kg TM ekstrakta (P>0,05). Broj limfocita u krvi grupe PEK 50 bio je veći nego kod grupe PEK 100, ali razlika ovih vrednosti nije statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.1.5.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,01	NSZ	P<0,05
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita kontrolne grupe i 24h posle aplikacije hloroformskog ekstrakta u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM prikazana u tabeli 5.1.5.b., ukazuje da nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (P>0,05), osim između kontrolne grupe i oglednih grupa kojima je aplikovano po 50 mg/kg (P<0,01) ili 200 mg/kg HEK (P<0,05), pri

čemu je broj limfocita u krvi pacova tretiranih ekstraktom bio značajno niži nego kod kontrolne grupe.

Tabela 5.1.5.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,05	P<0,05	P<0,001
MEK 50	-	NSZ	P<0,01
MEK 100	-	-	P<0,01

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata ispitivanja statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita, prikazanih u tabeli 5.1.5.c., uočava se da je ta vrednost bila značajno veća u kontrolnoj grupi u odnosu na ogledne grupe 24h posle aplikacije metanolnog ekstrakta u dozi od 50 i 100 mg/kg TM i to na nivou značajnosti od P<0,05, kao i u odnosu na grupu tretiranu visokom dozom od 200 mg/kg TM, ali na nivou značajnosti od P<0,001. Ustanovljena razlika srednje vrednosti broja limfocita u krvi pacova MEK 200 je bila vrlo signifikantna (P<0,01) u odnosu na grupe MEK 50 i MEK 100, pri čemu je broj limfocita značajno niži kod grupe kojoj je aplikovan ekstrakt u dozi 200 mg/kg TM. Prosečan broj limfocita u krvi pacova grupa MEK 50 i MEK 100 se vrlo malo razlikovao i ova razlika nije bila statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.1.5.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	NSZ	NSZ
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima broja limfocita u krvi kontrolne grupe i 24h posle aplikacije EK različitih doza, prikazana u tabeli 5.1.5.d., ukazuje da su razlike između prosečnih vrednosti broja limfocita kontrolne i ostalih ispitivanih grupa bile visoko signifikantne (P<0,001), pri čemu je ta vrednost značajno viša kod kontrolne grupe pacova u odnosu na sve navedene grupe. Između grupa kojima je aplikovan vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05).

Tabela 5.1.5.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja limfocita u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,001	NSZ	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ	NSZ
DM1+ FR		P<0,001	P<0,01	P<0,001	NSZ	P<0,001	P<0,001
DM1+ MEK50			NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ	NSZ
DM1+ MEK100				NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ MEK200					P<0,05	NSZ	NSZ
DM1+ EK50						P<0,05	P<0,05
DM1+ EK100							NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Tabela 5.1.5.e. sadrži podatke o nivou značajnosti razlika srednjih vrednosti broja limfocita između grupe kojoj je tri dana aplikovan deksametazon i grupa koje su četvrtog dana tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka. Vrednost ovog parametra je bila značajno veća kod grupa koje su nakon deksametazona dobile fiziološki rastvor ($P<0,001$) ili vodeni ekstrakt u dozi 50 mg/kg TM ($P<0,05$), a veća vrednost je zabeležena i kod ostalih ispitivanih grupa, ali utvrđene razlike nisu bile signifikantne ($P>0,05$). Kod grupe kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor utvrđena je veća vrednost broja limfocita nego kod grupa kojima je aplikovan metanolni ili vodeni ekstrakt kukureka različitih doza, pri čemu su razlike bile visoko signifikantne ($P<0,001$), a samo je u odnosu na grupu DM1+MEK100 razlika bila na nivou $P<0,01$ ali nije bila značajna u odnosu na DM1+EK 50 ($P>0,05$). U grupi DM1+EK50 srednja vrednost ovog parametra je bila značajno veća nego kod ostalih grupa tretiranih ekstraktom ($P<0,05$), pri čemu nije bilo značajne razlike samo u odnosu na grupu DM1+MEK100. Između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene različite srednje vrednosti broja limfocita, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

5.1.6. Procenat limfocita (Lym %)

U tabeli 5.1.6. su prikazani rezultati određivanja procenta limfocita u krvi pacova 24h nakon IM aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon IM aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita je prikazana u tabelama: 5.1.6.a., 5.1.6.b., 5.1.6.c., 5.1.6.d. i 5.1.6.e.

Tabela 5.1.6. Osnovni statistički parametri za procenat limfocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	65,90	4,28	1,62	6,50	58,20-70,50
PEK 50	45,19	8,15	3,08	18,30	38,50-61,80
PEK 100	61,49	8,59	3,24	13,96	47,60-73,10
PEK 200	64,83	7,25	2,74	11,18	56,10-73,60
HEK 50	62,51	4,80	1,81	7,67	57,80-70,60
HEK 100	59,50	4,94	1,87	8,30	53,20-66,60
HEK 200	61,37	6,04	2,28	9,84	52,20-68,90
MEK 50	42,79	4,67	1,77	10,92	39,90-49,10
MEK 100	31,37	9,77	3,69	31,15	16,70-44,90
MEK 200	11,27	4,63	1,75	41,12	7,30-20,40
EK 50	30,24	8,18	3,09	27,05	15,40-39,00
EK 100	19,44	8,64	3,27	44,43	9,30-28,50
EK 200	14,77	15,00	5,67	101,57	5,10-40,30
DM1	17,40	7,90	2,99	45,40	9,30-29,40
DM1+FR	22,77	2,65	1,00	11,65	17,20-25,10
DM1+MEK50	7,23	2,78	1,05	38,44	2,70-9,70
DM1+MEK100	7,57	2,44	0,92	32,20	5,70-12,80
DM1+MEK200	10,40	3,78	1,43	36,36	5,30-13,90
DM1+EK50	17,10	11,36	4,29	66,41	7,80-40,90
DM1+EK100	9,67	3,98	1,50	41,15	3,90-14,90
DM1+EK200	14,24	6,28	2,37	44,09	7,20-21,20

Iz rezultata određivanja procenta limfocita, prikazanih u tabeli 5.1.6., može se videti da su srednje vrednosti procenta limfocita u krvi ispitivanih pacova iznosile: 65,90±4,28 kod kontrolne grupe, 45,19±8,15, 61,49±8,59 i 64,83±7,25 posle tretiranja petroletarskim ekstraktom, 62,51±4,80, 59,50±4,94 i 61,37±6,04 posle aplikacije hloroformskog ekstrakta, 42,79±4,67, 31,37±9,77 i 11,27±4,63 nakon aplikacije metanolnog ekstrakta, 30,24±8,18, 19,44±8,64 i 14,77±15,00 posle primene vodenog ekstrakta kukureka. Posle trokratne primene deksametazona, prosečan procenat limfocita je bio 17,40±7,90, dok kod grupa koje su četvrtog dana dobile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene su vrednosti: 22,77±2,65% (FR), 7,23±2,78, 7,57±2,44 i 10,40±3,78% (MEK), 17,10±11,36, 9,67±3,98 i 14,24±6,28% (EK).

Tabela 5.1.6.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	NSZ	NSZ
PEK 50	-	P<0,01	P<0,001
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.6.a., ukazuje na visoko signifikantnu razliku (P<0,001) između kontrolne grupe i grupe 24h posle aplikacije 50 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta, i odsustvo statističke značajnosti između kontrolne grupe i grupa PEK 100 i PEK 200 (P>0,05), pri čemu je procenat limfocita bio veći kod kontrolne grupe. Kod grupe pacova PEK 50 je utvrđen statistički značajno manji procenat limfocita u krvi u odnosu na grupe posle tretiranja ekstraktom kukureka u dozi od 100 mg/kg TM (P<0,01) i 200 mg/kg TM (P<0,001). Srednje vrednosti procenta limfocita u grupama PEK 100 i PEK 200 su se vrlo malo razlikovale i ova razlika nije bila statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.1.6.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	P<0,05	NSZ
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi pacova kontrolne grupe i 24h posle aplikacije različitih doza HEK, prikazanih u tabeli 5.1.6.b., ustanovljena je statistički značajna razlika jedino između srednjih vrednosti procenta limfocita ogledne grupe tretirane ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou značajnosti od P<0,05, pri čemu je grupa HEK 100 imala statistički značajno veću vrednost.

Tabela 5.1.6.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,05	P<0,001
MEK 100	-	-	P<0,001

Iz rezultata ispitivanja statističke značajnosti između srednjih vrednosti procenta limfocita, prikazanih u tabeli 5.1.6.c., uočava se da je ta vrednost bila značajno veća u kontrolnoj grupi u odnosu na ogledne grupe tretirane različitim dozama metanolnog ekstrakta, i to na nivou značajnosti od P<0,001. Ustanovljena razlika srednje vrednosti procenta limfocita u krvi pacova grupe MEK 50 je bila signifikantna (P<0,05) u odnosu na grupu MEK 100 i visoko signifikantna u odnosu na grupu MEK 200 (P<0,001), pri čemu je procenat limfocita značajno veći kod grupe kojoj je aplikovana najniža doza metanolnog ekstrakta. Procenat limfocita u krvi pacova posle aplikovanja ekstrakta u dozi 200 mg/kg TM bio je značajno niži u odnosu na grupu tretiranu sa 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta (P<0,001).

Tabela 5.1.6.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,05	P<0,05
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima procenta limfocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije različitih doza vodenog ekstrakta, prikazana u tabeli 5.1.6.d., ukazuje da su razlike između prosečnih vrednosti procenta limfocita 24h posle aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i tretmana ekstraktom ostalih ispitivanih grupa bile visoko signifikantne (P<0,001), pri čemu je ta vrednost značajno veća posle primene fiziološkog rastvora u odnosu na sve druge navedene grupe. Srednja vrednost procenta limfocita u krvi ogleadne grupe posle aplikacije 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta bila je statistički značajno veća u odnosu na grupe kod kojih je primenjen ekstrakt u dozi 100 ili 200 mg/kg TM, i to na nivou značajnosti od P<0,05. Između grupa kojima je aplikovano po 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta, razlika nije bila statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.1.6.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta limfocita u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	P<0,01	P<0,01	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
	DM1+ FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NSZ	P<0,001	P<0,01
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ	P<0,05
			DM1+ MEK100	NSZ	P<0,05	NSZ	P<0,05
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.6.e., ukazuje da je srednja vrednost procenta limfocita bila značajno veća kod grupe kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom u dozi 50 ili 100 mg/kg TM ($P < 0,01$) ili vodenim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,05$), dok razlika nije bila signifikantna u odnosu na grupe koje su dobile fiziološki rastvor, 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta, 50 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka ($P > 0,05$). Grupa kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor, imala je veću vrednost ovog parametra nego grupe koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka, a pri tom su visoko signifikantne razlike postojale u odnosu na grupe tretirane metanolnim ekstraktom različitih doza i vodenim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,001$). Razlika je bila vrlo značajna u odnosu na DM1+EK200 ($P < 0,01$), a nije značajna u odnosu na DM1+EK50 ($P > 0,05$). Prosečne vrednosti procenta limfocita su najniže kod grupa DM1+MEK50 i DM1+MEK100, a između njih nisu utvrđene značajne razlike ($P > 0,05$). One su bile značajno niže u odnosu na ove vrednosti kod DM1+EK50 i DM1+EK200. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima ovog parametra između pacova ostalih ispitivanih grupa ($P > 0,05$).

5.1.7. Neutrofilno/limfocitni indeks (Ne/Lym indeks)

Rezultati određivanja Ne/Lym indeksa 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazani u tabeli 5.1.7. Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti Ne/Lym indeksa ispitivanih grupa je izneta u tabelama: 5.1.7.a., 5.1.7.b., 5.1.7.c, 5.1.7.d. i 5.1.7.e.

Tabela 5.1.7. Osnovni statistički parametri neutrofilno/limfocitnog indeksa kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	43,22	6,90	2,61	15,96	34,07-51,47
PEK 50	108,97	31,13	11,77	28,57	54,35-140,44
PEK 100	52,47	18,79	7,10	35,80	31,31-86,57
PEK 200	41,71	12,31	4,65	29,51	21,98-56,74
HEK 50	50,32	6,78	2,56	13,47	40,71-57,54
HEK 100	59,02	11,50	4,35	19,49	43,97-75,06
HEK 200	54,01	11,24	4,25	20,81	42,42-71,03
MEK 50	125,96	27,69	10,46	21,98	94,30-180,97
MEK 100	229,53	120,89	45,69	52,67	106,27-453,17
MEK 200	759,08	344,37	130,16	45,37	326,59-1189,54
EK 50	232,53	128,06	48,40	55,07	129,77-491,04
EK 100	497,77	316,93	119,79	63,67	206,46-922,22
EK 200	1117,92	690,58	261,01	61,77	120,47-1779,41
DM1	541,26	269,04	101,69	49,71	210,45-920,25
DM1+FR	318,52	60,48	22,86	18,99	262,68-444,45
DM1+MEK50	1539,13	1005,71	380,12	65,34	846,59-3600,00
DM1+MEK100	1239,07	338,47	127,93	27,32	604,86-1630,14
DM1+MEK200	965,25	483,20	182,63	50,06	587,43-1652,54
DM1+EK50	628,21	351,44	132,83	55,94	134,88-1124,29
DM1+EK100	1093,36	637,09	240,80	58,27	537,37-2410,95
DM1+EK200	685,90	357,95	135,29	52,19	320,26-1224,81

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.7. uočljivo je povećanje neutrofilno /limfocitnog indeksa kod svih oglednih grupa tretiranih ekstraktom kukureka, osim u grupi PEK 200, u odnosu na kontrolnu grupu, kod koje je Ne/Lym indeks iznosio $43,22 \pm 6,90$. Od grupa kojima je aplikovan samo ekstrakt kukureka, najvišu srednju vrednost Ne/Lym indeksa je imala grupa 24h posle aplikacije EK u dozi 200 mg/kg TM ($1117,92 \pm 690,58$), zatim grupa MEK 200 tretirana sa 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta ($759,08 \pm 344,37$). Slede grupe kojima je aplikovan vodeni ekstrakt u dozi 100 i 50 mg/kg TM ($497,77 \pm 316,93$ i $232,53 \pm 128,06$), grupe koje su primile 100 i 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta ($229,53 \pm 120,89$ i $125,96 \pm 27,69$). U odnosu na navedene

ogledne grupe, utvrđene vrednosti Ne/Lym indeksa su bile niže kod grupa kojima je aplikovan petroletarski ekstrakt PEK 50 (108,97±31,13), PEK 100 (52,47±18,79), PEK 200 (41,71±12,31) i hloroformski ekstrakt HEK 50 (50,32±6,78), HEK 100 (59,02±11,50) i HEK 200 (54,01±11,24). Nakon trokratne aplikacije deksametazona je zabeležen neutrofilno/limfocitni indeks od 541,26±269,04, dok kod grupa koje su četvrtog dana primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM vrednosti ovog parametra su iznosile: 318,52±60,48 (FR), 1539,13±1005,71, 1239,07±338,47 i 965,25±483,20 (MEK), 628,21±351,44, 1093,36±637,09 i 685,90±357,95 (EK).

Tabela 5.1.7.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	NSZ	NSZ
PEK 50	-	P<0,01	P<0,001
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Ne/Lym indeksi grupa PEK 50 i PEK 100 su imali veće vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu, ali je statistički visoko značajna razlika postojala samo između ogledne grupe 24h nakon aplikacije 50 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta i kontrolne grupe (P<0,001). Između srednjih vrednosti Ne/Lym indeksa kontrolne grupe i grupe PEK 200, kao i grupa tretiranih sa 100 i 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta nije utvrđena statistička signifikantnost razlika (P>0,05). Vrednost Ne/Lym indeksa kod grupe 24h nakon primene PEK 50 mg/kg TM je bila značajno veća u odnosu na ogledne grupe PEK 100 (P<0,01) i PEK 200 (P<0,001) (Tabela 5.1.7.a.).

Tabela 5.1.7.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	P<0,01	P<0,05
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i 24h posle primene 50, 100 ili 200

mg/kg TM hloroformskog ekstrakta prikazana u tabeli 5.1.7.b., ukazuje da nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($P > 0,05$), osim između kontrolne grupe i oglednih grupa kojima je aplikovano po 100 mg/kg TM ($P < 0,01$) ili 200 mg/kg TM ($P < 0,05$) hloroformskog ekstrakta, pri čemu je vrednost neutrofilno/limfocitnih indeksa pacova tretiranih ekstraktom bila statistički značajno viša nego kod kontrolne grupe.

Tabela 5.1.7.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,05	P<0,001
MEK 100	-	-	P<0,01

Iz analize prikazane u tabeli 5.1.7.c. uočava se da je u odnosu na kontrolnu grupu, postojao statistički značajno veći neutrofilno/limfocitni indeks kod pacova oglednih grupa tretiranih različitim dozama metanolnog ekstrakta, i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Utvrđen je statistički značajno veći neutrofilno/limfocitni indeks kod grupe MEK 200 u odnosu na grupe MEK 50 ($P < 0,001$) i MEK 100 ($P < 0,01$), kao i grupe MEK 100 u odnosu na grupu MEK 50 ($P < 0,05$).

Tabela 5.1.7.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,01	P<0,01	P<0,001
EK 50	-	P<0,05	P<0,01
EK 100	-	-	P<0,05

U tabeli 5.1.7.d. je prikazana statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa kontrolne grupe i 24h posle aplikacije EK različitih doza. Uočava se statistički značajno veći Ne/Lym indeks oglednih grupa EK 50 i EK 100 u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou značajnosti od $P < 0,01$, i ogledne grupe kojoj je aplikovano 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu, na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Grupa pacova EK 200 je imala signifikantno veći Ne/Lym indeks u odnosu na grupe tretirane manjim dozama EK, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,01$ (za grupu tretiranu sa 50 mg/kg TM ekstrakta) i $P < 0,05$ (za

grupu tretiranu sa 100 mg/kg TM ekstrakta). Statistički značajno veći Ne/Lym indeks ($P < 0,05$) je utvrđen kod grupe pacova EK 100 u odnosu na grupu EK 50.

Tabela 5.1.7.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$	NSZ
	DM1+ FR	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,05$	$P < 0,01$	$P < 0,05$
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$
			DM1+ MEK100	NSZ	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,05$
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika prikazana u tabeli 5.1.7.e., ukazuje da su u odnosu na grupu koja je tri dana dobijala deksametazon, značajno veću srednju vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa imale grupe koje su četvrtog dana dobile metanolni ekstrakt u dozi 50 ili 100 mg/kg TM ($P < 0,01$), 200 mg/kg TM metanolnog ili 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P < 0,05$), dok razlike nisu bile značajne u odnosu na grupe DM1+EK50 i DM1+EK200, kao i grupu tretiranu fiziološkim rastvorom koja je imala manju vrednost ovog parametra ($P > 0,05$). Veća vrednost ovog parametra je utvrđena kod svih grupa koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka, u odnosu na grupu kojoj je četvrtog dana aplikovan fiziološki rastvor, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,001$ (za grupe DM1+MEK50 i DM1+MEK100), $P < 0,01$ (za grupe DM1+MEK200 i DM1+EK100) i $P < 0,05$ (za grupe DM1+EK50 i DM1+EK200). Prosečne vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa su najviše kod grupa DM1+MEK50 i DM1+MEK100, i između njih nisu utvrđene značajne razlike ($P > 0,05$). One su bile značajno više u odnosu na ove vrednosti kod DM1+EK50 i DM1+EK200. Kod ostalih ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$).

5.1.8. Broj monocita (Mo)

U tabeli 5.1.8. su prikazani rezultati određivanja broja monocita u krvi pacova 24h nakon IM aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon IM aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. U tabelama 5.1.8.a., 5.1.8.b., 5.1.8.c., 5.1.8.d. i 5.1.8.e. je prikazana analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti ovog parametra.

Tabela 5.1.8. Osnovni statistički parametri za broj monocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	0,51	0,32	0,12	61,93	0,21-1,19
PEK 50	0,76	0,16	0,06	20,60	0,55-0,98
PEK 100	0,54	0,43	0,16	79,18	0,03-1,36
PEK 200	0,47	0,38	0,15	81,71	0,05-0,97
HEK 50	0,35	0,15	0,06	41,54	0,05-0,45
HEK 100	0,48	0,16	0,06	34,52	0,33-0,78
HEK 200	0,46	0,27	0,10	58,73	0,15-0,86
MEK 50	0,43	0,20	0,07	45,53	0,20-0,64
MEK 100	0,84	0,31	0,12	37,20	0,37-1,32
MEK 200	1,25	0,56	0,21	45,35	0,36-2,13
EK 50	0,84	0,48	0,18	56,91	0,27-1,71
EK 100	0,82	0,28	0,12	33,53	0,56-1,29
EK 200	0,71	0,25	0,09	35,09	0,43-1,17
DM1	0,48	0,18	0,07	37,31	0,28-0,80
DM1+FR	0,86	0,28	0,11	32,83	0,39-1,16
DM1+MEK50	0,85	0,43	0,16	50,25	0,35-1,56
DM1+MEK100	1,36	0,94	0,35	68,90	0,44-2,49
DM1+MEK200	0,83	0,50	0,19	59,78	0,23-1,62
DM1+EK50	0,96	0,45	0,17	46,64	0,45-1,67
DM1+EK100	0,54	0,25	0,09	45,49	0,20-0,86
DM1+EK200	0,90	0,35	0,13	38,80	0,43-1,42

U tabeli 5.1.8. su prikazane srednje vrednosti broja monocita u krvi pacova kojima je aplikovano 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta ($0,76 \pm 0,16 \times 10^9/L$, $0,54 \pm 0,43 \times 10^9/L$ i $0,47 \pm 0,38 \times 10^9/L$), hloroformskog ekstrakta ($0,35 \pm 0,15 \times 10^9/L$, $0,48 \pm 0,16 \times 10^9/L$ i $0,46 \pm 0,27 \times 10^9/L$), metanolnog ekstrakta ($0,43 \pm 0,20 \times 10^9/L$, $0,84 \pm 0,31 \times 10^9/L$ i $1,25 \pm 0,56 \times 10^9/L$) i vodenog ekstrakta kukureka ($0,84 \pm 0,48 \times 10^9/L$, $0,82 \pm 0,28 \times 10^9/L$ i $0,71 \pm 0,25 \times 10^9/L$). Srednja vrednost broja monocita kontrolne grupe kojoj je aplikovan fiziološki rastvor je iznosila $0,51 \pm 0,32 \times 10^9/L$, a grupe kojoj je trokratno aplikovan deksametazon $0,48 \pm 0,18 \times 10^9/L$. Kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su bile: $0,86 \pm 0,28 \times 10^9/L$ (FR), $0,85 \pm 0,43 \times 10^9/L$, $1,36 \pm 0,94 \times 10^9/L$ i $0,83 \pm 0,50 \times 10^9/L$ (MEK), $0,96 \pm 0,45 \times 10^9/L$, $0,54 \pm 0,25 \times 10^9/L$ i $0,90 \pm 0,35 \times 10^9/L$ (EK).

Tabela 5.1.8.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
PEK 50	-	NSZ	NSZ
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Na onovu rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita prikazanih u tabeli 5.1.8.a., može se konstatovati da nisu postojale statistički značajne razlike ($P > 0,05$) ovih vrednosti kako između kontrolne grupe i grupa posle aplikovanja PEK u dozama 50, 100 ili 200 mg/kg TM, tako niti između samih grupa tretiranih petroletarskim ekstraktom kukureka.

Tabela 5.1.8.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi kontrolne grupe i 24h posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog

ekstrakta, ukazala je da razlike između ispitivanih grupa nisu bile statistički signifikantne ($P>0,05$) (Tabela 5.1.8.b.).

Tabela 5.1.8.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	NSZ	NSZ	$P<0,05$
MEK 50	-	$P<0,05$	$P<0,01$
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Grupa MEK 50 je imala manju, a grupe MEK 100 i MEK 200 su imale veće srednje vrednosti broja monocita u odnosu na kontrolnu grupu, ali je statistički značajna razlika postojala samo između ogledne grupe MEK 200 i kontrolne grupe ($P<0,05$). Vrednost broja monocita kod grupe tretirane sa 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je bila značajno niža u odnosu na ogledne grupe kojima je aplikovan ekstrakt u dozi 100 mg/kg TM ($P<0,05$) i 200 mg/kg TM ($P<0,01$). Između srednjih vrednosti broja monocita grupa MEK 100 i MEK 200 nije postojala statistička signifikantnost razlike ($P>0,05$) (Tabela 5.1.8.c.).

Tabela 5.1.8.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
EK 50	-	NSZ	NSZ
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Rezultati analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita 24h posle aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, prikazani u tabeli 5.1.8.d., ukazuju da nije utvrđena statistička značajnost razlika ($P>0,05$) između navedenih vrednosti za pojedine grupe pacova.

Tabela 5.1.8.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja monocita u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,05	P<0,05	NSZ	P<0,05
DM1+ FR		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
DM1+ MEK50			NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ MEK100				NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
DM1+ MEK200					NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ EK50						P<0,05	NSZ
DM1+ EK100							P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.8.e., ukazuje da je u odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, srednja vrednost broja monocita bila značajno veća kod grupa koje su nakon deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P<0,01$), fiziološkim rastvorom ili metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50 ili 200 mg/kg TM ($P<0,05$), dok razlika nije bila signifikantna u odnosu na grupu koja je dobila 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka ($P>0,05$). Vrednost ovog parametra kod grupe kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor, malo se razlikovala u odnosu na ostale grupe, tako da utvrđene razlike nisu bile signifikantne, osim u odnosu na DM1+EK100 ($P<0,05$) koja je imala nižu vrednost. Grupe koje su posle deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su imale sličan prosečan broj monocita, tako da nisu utvrđene statistički značajne razlike kako između ovih grupa, tako i u odnosu na grupe tretirane istim dozama vodenog ekstrakta ($P>0,05$), sa izuzetkom signifikantno veće vrednosti kod DM1+MEK100 nego kod DM1+EK100 ($P<0,05$). Najniža prosečna vrednost broja monocita, zabeležena kod grupe DM1+EK100, je bila značajno niža ($P<0,05$) u odnosu na ove vrednosti kod DM1+EK50 i DM1+EK200, između kojih nisu utvrđene signifikantne razlike ($P>0,05$).

5.1.9. Procenat monocita (Mo %)

Rezultati određivanja procenta monocita u krvi pacova 24h nakon IM aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka, u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, MEK ili EK u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazani u tabeli 5.1.9. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi je data u tabelama 5.1.9.a., 5.1.9.b., 5.1.9.c., 5.1.9.d. i 5.1.9.e.

Tabela 5.1.9. Osnovni statistički parametri za procenat monocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe, tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	5,84	3,24	1,23	55,49	2,60-12,70
PEK 50	7,33	1,45	0,55	19,74	4,60-8,70
PEK 100	7,43	5,12	1,93	68,89	0,60-13,00
PEK 200	5,84	4,85	1,83	83,07	0,60-12,30
HEK 50	6,27	3,12	1,18	49,78	0,60-9,10
HEK 100	5,87	1,95	0,74	33,14	3,10-8,80
HEK 200	6,07	3,60	1,36	59,22	1,80-10,80
MEK 50	4,37	1,07	0,40	24,41	3,10-5,80
MEK 100	6,40	2,31	0,87	36,07	3,00-10,20
MEK 200	6,77	3,27	1,24	48,26	1,90-12,60
EK 50	8,23	3,01	1,14	36,54	3,90-11,30
EK 100	7,66	3,03	1,36	39,58	4,70-12,50
EK 200	5,46	2,63	0,99	48,17	3,20-11,10
DM1	6,10	1,91	0,72	31,26	4,40-8,80
DM1+FR	5,84	1,76	0,67	30,15	3,50-8,90
DM1+MEK50	4,13	2,55	0,96	61,70	1,40-8,50
DM1+MEK100	5,10	3,17	1,20	62,16	1,70-9,70
DM1+MEK200	4,50	1,67	0,63	37,10	2,10-7,40
DM1+EK50	5,11	1,42	0,54	27,82	3,50-7,20
DM1+EK100	3,77	1,08	0,41	28,67	2,20-5,20
DM1+EK200	6,57	2,71	1,02	41,19	4,10-11,80

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.9. se vidi da je prosečna vrednost procenta monocita u krvi kontrolne grupe pacova iznosila $5,84 \pm 3,24$. Posle 24h od aplikacije ekstrakata u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM ove vrednosti su bile: $7,33 \pm 1,45$, $7,43 \pm 5,12$ i $5,84 \pm 4,85\%$ (petroletarski ekstrakt), $6,27 \pm 3,12$, $5,87 \pm 1,95$ i $6,07 \pm 3,60\%$ (hloroformski ekstrakt), $4,37 \pm 1,07$, $6,40 \pm 2,31$ i $6,77 \pm 3,27\%$ (metanoli ekstrakt) i $8,23 \pm 3,01$, $7,66 \pm 3,03$ i $5,46 \pm 2,63\%$ (vodeni ekstrakt). Zabeležene vrednosti procenta monocita su 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona iznosile $6,10 \pm 1,91$, a 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana i četvrtog dana fiziološkog rastvora $5,84 \pm 1,76$, metanolnog ekstrakta kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: $4,13 \pm 2,55$, $5,10 \pm 3,17$ i $4,50 \pm 1,67$ i vodenog ekstrakta u prethodno navedenim dozama: $5,11 \pm 1,42$, $3,77 \pm 1,08$ i $6,57 \pm 2,71$.

Tabela 5.1.9.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
PEK 50	-	NSZ	NSZ
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

U tabeli 5.1.9.a. su prikazani rezultati analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa 24h posle aplikacije PEK u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Nisu ustanovljene statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupa posle aplikacije petroletarskog ekstrakta kukureka, kao ni između oglednih grupa ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.9.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize prikazane u tabeli 5.1.9.b., može se videti da utvrđene razlike između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa

24h posle aplikacije hloroformskog ekstrakta različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM), kao ni između navedenih oglednih grupa, nisu bile signifikantne ($P>0,05$).

Tabela 5.1.9.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
MEK 50	-	NSZ	NSZ
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Rezultati analize statističke značajnosti prikazani u tabeli 5.1.9.c., potvrđuju da se srednje vrednosti procenta monocita između kontrolne grupe i oglednih grupa 24h posle aplikacije MEK u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, kao ni između samih oglednih grupa, nisu statistički značajno razlikovale ($P>0,05$).

Tabela 5.1.9.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
EK 50	-	NSZ	NSZ
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa posle aplikacije različitih doza EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM) data u tabeli 5.1.9.d., ukazuje da nisu postojale statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($P>0,05$).

Tabela 5.1.9.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
DM1+ FR		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
DM1+ MEK50			NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ MEK100				NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ MEK200					NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ EK50						NSZ	NSZ
DM1+ EK100							P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Statistička značajnost razlika prikazana u tabeli 5.1.9.e., ukazuje da nisu utvrđene signifikantne razlike u srednjim vrednostima procenta monocita između ispitivanih grupa ($P>0,05$), osim grupe DM1+EK100 koja je imala značajno nižu vrednost ovog parametra u odnosu na grupe DM1, DM1+FR i DM1+EK200 ($P<0,05$).

5.1.10. Broj eritrocita (Er)

Rezultati određivanja broja eritrocita u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su dati u tabeli 5.1.10. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi ispitivanih grupa je prikazana u tabelama 5.1.10.a., 5.1.10.b., 5.1.10.c., 5.1.10.d. i 5.1.10.e.

Tabela 5.1.10. Osnovni statistički parametri za broj eritrocita ($10^{12}/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	6,90	0,18	0,07	2,58	6,51-7,01
PEK 50	7,34	0,58	0,22	7,89	6,56-8,23
PEK 100	7,07	0,32	0,12	4,59	6,67-7,56
PEK 200	6,72	0,81	0,31	12,06	5,42-7,50
HEK 50	6,42	0,53	0,20	8,32	5,64-7,01
HEK 100	7,08	0,21	0,08	3,00	6,82-7,44
HEK 200	6,95	0,52	0,20	7,45	6,05-7,36
MEK 50	6,21	0,30	0,11	4,78	5,80-6,61
MEK 100	6,63	0,94	0,36	14,21	5,50-7,86
MEK 200	7,86	1,34	0,51	17,03	5,99-9,19
EK 50	7,38	0,50	0,19	6,82	6,69-8,13
EK 100	7,50	0,74	0,28	9,81	6,41-8,47
EK 200	8,52	0,84	0,32	9,84	7,34-9,69
DM1	7,50	0,85	0,32	11,34	5,66-8,06
DM1+FR	7,98	1,06	0,40	13,31	6,61-9,72
DM1+MEK50	7,27	1,82	0,69	25,07	5,33-9,27
DM1+MEK100	6,85	0,98	0,37	14,26	5,86-8,18
DM1+MEK200	8,02	1,04	0,39	13,00	6,31-9,15
DM1+EK50	8,29	0,59	0,22	7,15	7,42-9,23
DM1+EK100	7,37	1,18	0,45	15,98	5,02-8,67
DM1+EK200	7,94	0,93	0,35	11,75	6,38-8,84

Iz rezultata iznetih u tabeli 5.1.10. može se zapaziti da je prosečna vrednost broja eritrocita u krvi pacova kontrolne grupe iznosila $6,90 \pm 0,18 \times 10^{12}/L$ krvi. U većini oglednih grupa je zabeleženo povećanje broja eritrocita, tako da su prosečne vrednosti ovog parametra u krvi pacova iznosile: $7,34 \pm 0,58 \times 10^{12}/L$ kod PEK 50, $7,07 \pm 0,32 \times 10^{12}/L$ kod PEK 100, $7,08 \pm 0,21 \times 10^{12}/L$ kod HEK 100, $6,95 \pm 0,52 \times 10^{12}/L$ kod HEK 200, $7,86 \pm 1,34 \times 10^{12}/L$ kod MEK 200 i $7,38 \pm 0,50 \times 10^{12}/L$, $7,50 \pm 0,74 \times 10^{12}/L$ i $8,52 \pm 0,84 \times 10^{12}/L$ posle primene vodenog ekstrakta kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Pad broja eritrocita u odnosu na kontrolnu grupu utvrđen je kod grupa PEK

200 ($6,72 \pm 0,81 \times 10^{12}/L$), HEK 50 ($6,42 \pm 0,53 \times 10^{12}/L$), MEK 50 ($6,21 \pm 0,30 \times 10^{12}/L$) i MEK 100 ($6,63 \pm 0,94 \times 10^{12}/L$). Grupa kojoj je trokratno aplikovan deksametazon je imala prosečnu vrednost eritrocita $7,50 \pm 0,85 \times 10^{12}/L$, a kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su bile: $7,98 \pm 1,06 \times 10^{12}/L$ (FR), $7,27 \pm 1,82 \times 10^{12}/L$, $6,85 \pm 0,98 \times 10^{12}/L$ i $8,02 \pm 1,04 \times 10^{12}/L$ (MEK), $8,29 \pm 0,59 \times 10^{12}/L$, $7,37 \pm 1,18 \times 10^{12}/L$ i $7,94 \pm 0,93 \times 10^{12}/L$ (EK).

Tabela 5.1.10.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
PEK 50	-	NSZ	NSZ
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Rezultati analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i 24h posle aplikacije različitih doza petroletarskog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM), prikazani u tabeli 5.1.10.a., ukazuju da nije bilo statistički značajnih razlika između oglednih grupa i kontrolne grupe, kao niti između samih oglednih grupa ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.10.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	$P < 0,05$	NSZ	NSZ
HEK 50	-	$P < 0,05$	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između prosečnih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta, prikazana u tabeli 5.1.10.b., ukazuje da su statistički značajne razlike postojale samo između grupe HEK 50 u odnosu na kontrolnu grupu i grupu HEK 100, pri čemu je niža vrednost utvrđena kod grupe tretirane ekstraktom kukureka u dozi 50 mg/kg TM ($P < 0,05$).

Tabela 5.1.10.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,05	NSZ	NSZ
MEK 50	-	NSZ	P<0,01
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Srednja vrednost broja eritrocita u krvi pacova grupe MEK 50 je bila statistički značajno niža nego u krvi pacova kontrolne grupe (P<0,05), kao i u odnosu na grupu tretiranu sa MEK 200 mg/kg TM i to na nivou značajnosti od P<0,01. Vrednosti ovog parametra posle aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i metanolnog ekstrakta u dozama od 100 i 200 mg/kg TM oglednim grupama su se razlikovale, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05). Prosečan broj eritrocita zabeležen kod grupe MEK 100 je bio veći nego kod MEK 50 i manji nego kod MEK 200, ali utvrđene razlike nisu bile signifikantne (P>0,05) (Tabela 5.1.10.c.).

Tabela 5.1.10.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,05	P<0,05	P<0,01
EK 50	-	NSZ	P<0,05
EK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi kontrolne grupe i 24h posle aplikacije EK (Tabela 5.1.10.d.), zapaža se da je u odnosu na kontrolnu grupu povećanje broja eritrocita bilo statistički signifikantno kod grupa kojima je aplikovano po 50 i 100 mg/kg TM ekstrakta (P<0,05) i statistički vrlo značajno posle tretmana pacova ekstraktom kukureka u dozi od 200 mg/kg TM (P<0,01). Ogledna grupa EK 200, kod koje je zabeležen najveći prosečan broj eritrocita, imala je statistički značajno veći broj eritrocita u odnosu na grupe EK 50 i EK 100 (P<0,05), kod kojih su se vrednosti ovog parametra razlikovale, ali te razlike nisu bile statistički značajne (P>0,05).

Tabela 5.1.10.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
	DM1+ FR	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
			DM1+ MEK100	P<0,05	P<0,01	NSZ	NSZ
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz ocene statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima broja eritrocita u krvi pacova prikazane u tabeli 5.1.10.e., zapaža se da utvrđene razlike između ispitivanih grupa nisu bile signifikantne, osim niže vrednosti ovog parametra zabeležene u grupi DM1+MEK100 u odnosu na DM1+MEK200 (na nivou značajnosti $P<0,05$) i DM1+EK50 (na nivou značajnosti $P<0,01$).

5.1.11. Broj trombocita (Tr)

Rezultati određivanja broja trombocita u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg petrolearskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su prikazani u tabeli 5.1.11. U tabelama 5.1.11.a., 5.1.11.b., 5.1.11.c., 5.1.11.d. i 5.1.11.e. su dati rezultati analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi ispitivanih grupa.

Tabela 5.1.11. Osnovni statistički parametri za broj trombocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	723,14	178,68	67,53	24,71	485-933
PEK 50	762,29	93,11	35,19	12,21	619-887
PEK 100	1198,57	110,36	41,71	9,21	1060-1387
PEK 200	897,43	118,41	44,76	13,19	723-1071
HEK 50	681,00	66,41	25,10	9,75	606-774
HEK 100	657,57	85,35	32,26	12,98	583-842
HEK 200	651,57	54,72	20,68	8,40	575-710
MEK 50	1018,43	94,10	35,57	9,24	887-1142
MEK 100	710,14	113,48	42,89	15,98	520-858
MEK 200	705,00	127,61	48,23	18,10	579-889
EK 50	370,57	139,85	52,86	37,74	153-541
EK 100	560,29	191,60	72,42	34,20	329-772
EK 200	824,29	180,69	68,29	21,92	418-922
DM1	618,57	169,92	64,22	27,47	347-842
DM1+FR	536,14	82,94	31,35	15,47	390-642
DM1+MEK50	831,14	116,65	44,09	14,03	679-967
DM1+MEK100	394,29	140,55	53,12	35,65	263-611
DM1+MEK200	571,14	237,36	89,71	41,56	315-859
DM1+EK50	641,00	105,28	39,79	16,42	448-753
DM1+EK100	420,86	60,95	23,04	14,48	323-526
DM1+EK200	560,57	78,39	29,63	13,98	485-701

Rezultati dobijeni određivanjem broja trombocita, prikazani su u tabeli 5.1.11. i ukazuju da je najmanji broj trombocita registrovan kod ogleadne grupe pacova EK 50, $370,57 \pm 139,85 \times 10^9/L$ krvi, a najveći kod grupe PEK 100, $1198,57 \pm 110,36 \times 10^9/L$. Kod kontrolne grupe broj trombocita je iznosio $723,14 \pm 178,68 \times 10^9/L$ krvi, dok je porast broja trombocita zabeležen u grupama: PEK 50 i PEK 200 ($762,29 \pm 93,11 \times 10^9/L$ odn. $897,43 \pm 118,41 \times 10^9/L$), MEK 50 ($1018,43 \pm 94,10 \times 10^9/L$) i EK 200 ($824,29 \pm 180,69 \times 10^9/L$). U ostalim grupama tretiranim ekstraktom kukureka, ova vrednost u krvi je bila niža i iznosila je: $681,00 \pm 66,41 \times 10^9/L$ kod HEK 50, $657,57 \pm 85,35 \times 10^9/L$ kod HEK 100, $651,57 \pm 54,72 \times 10^9/L$ kod HEK 200,

710,14±113,48×10⁹/L kod MEK 100, 705,00±127,61×10⁹/L kod MEK 200 i 560,29±191,60×10⁹/L kod EK 100. Zabeležene vrednosti broja trombocita su iznosile 618,57±169,92×10⁹/L nakon trokratne aplikacije deksametazona, a 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana i četvrtog dana fiziološkog rastvora 536,14±82,94×10⁹/L, metanolnog ekstrakta kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: 831,14±116,65×10⁹/L, 394,29±140,55×10⁹/L i 571,14±237,36×10⁹/L i vodenog ekstrakta u prethodno navedenim dozama: 641,00±105,28×10⁹/L, 420,86±60,95×10⁹/L i 560,57±78,39×10⁹/L.

Tabela 5.1.11.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	P<0,001	P<0,05
PEK 50	-	P<0,001	P<0,05
PEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima trombocita između pacova kontrolne grupe i oglednih grupa nakon aplikacije petroletarskog ekstrakta različitih doza, prikazana je u tabeli 5.1.11.a. Razlika u broju trombocita u krvi pacova 24h posle aplikacije 50 mg/kg TM ekstrakta nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu (P>0,05), dok je značajno povećanje broja trombocita u odnosu na kontrolnu grupu utvrđeno nakon primene ekstrakta u dozi od 100 mg/kg TM (P<0,001) i 200 mg/kg TM (P<0,05). Statistički značajno veći broj trombocita je bio u grupi PEK 100 u odnosu na grupe PEK 50 (P<0,001) i PEK 200 (P<0,05), kao i u grupi PEK 200 u odnosu na grupu PEK 50 (P<0,05).

Tabela 5.1.11.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi pacova kontrolne grupe i posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg

TM hloroformskog ekstrakta, prikazanih u tabeli 5.1.11.b., zapaža se da nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.11.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,01	NSZ	NSZ
MEK 50	-	P<0,001	P<0,001
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Utvrđene su niže vrednosti broja trombocita u grupama MEK 100 i MEK 200 u odnosu na kontrolnu grupu, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Vrednost ovog parametra nakon primene MEK 50 mg/kg TM bila je značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,01$) i ogleadne grupe MEK 100 i MEK 200 na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Između srednjih vrednosti broja trombocita grupa tretiranih sa 100 i 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta nije postojala statistički signifikantna razlika ($P > 0,05$) (Tabela 5.1.11.c.).

Tabela 5.1.11.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,01	NSZ	NSZ
EK 50	-	P<0,05	P<0,001
EK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.11.d., zapaža se odsustvo statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita grupa EK 100 i EK 200 u odnosu na kontrolnu grupu ($P > 0,05$) i značajno smanjenje ove vrednosti posle aplikacije 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,01$). Pacovi kojima je krv uzorkovana 24h posle tretmana ekstraktom u dozi od 200 mg/kg TM su imali značajno veći broj trombocita u odnosu na grupu tretiranu sa 50 mg/kg TM ekstrakta, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,001$, dok u odnosu na grupu tretiranu sa 100 mg/kg ekstrakta, razlika je bila statistički značajna na nivou $P < 0,05$. Između grupa kojima je aplikovan vodeni ekstrakt u dozi 50 i 100 mg/kg TM utvrđena je statistički signifikantna razlika ($P < 0,05$), pri čemu je veća vrednost broja trombocita zabeležena posle aplikovanja veće doze.

Tabela 5.1.11.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti broja trombocita u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	P<0,05	P<0,05	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
	DM1+ FR	P<0,001	P<0,05	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ
		DM1+ MEK50	P<0,001	P<0,01	P<0,01	P<0,001	P<0,001
			DM1+ MEK100	P<0,05	P<0,01	NSZ	P<0,05
				DM1+ MEK200	NSZ	P<0,01	NSZ
					DM1+ EK50	P<0,01	NSZ
						DM1+ EK100	P<0,01

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.1.11.e., ukazuje da u odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, srednja vrednost broja trombocita je bila značajno veća kod grupe koja je nakon deksametazona tretirana metanolnim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM ($P<0,05$) i signifikantno niža kod grupa koje su dobile po 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta ($P<0,05$), dok utvrđene razlike nisu bile signifikantne u odnosu na ostale ispitivane grupe ($P>0,05$). Vrednost ovog parametra kod grupe kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor, je bila značajno niža nego kod grupe DM1+MEK50 (na nivou značajnosti od $P>0,001$) i viša nego kod DM1+MEK100 i DM1+EK100 ($P<0,05$), a malo se razlikovala u odnosu na ostale grupe, tako da utvrđene razlike nisu bile značajne. Grupa koja je posle deksametazona tretirana metanolnim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM je imala najveći prosečan broj trombocita, tako da su razlike bile visoko signifikantne u odnosu na DM1+MEK100, DM1+EK100 i DM1+EK200 ($P<0,001$) i vrlo signifikantne u odnosu na DM1+MEK200 i DM1+EK50 ($P<0,01$). Najniže vrednosti ovog parametra zabeležene kod grupa DM1+MEK100 i DM1+EK100 bile su značajno niže nego kod DM1+MEK200 (na nivou značajnosti od $P<0,05$ i $P<0,01$), DM1+EK50 ($P<0,01$) i DM1+EK200 (na nivou značajnosti od $P<0,05$ i $P<0,01$). Između ostalih oglednih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima broja trombocita ($P>0,05$).

5.1.12. Koncentracija hemoglobina (Hb g/L)

U tabeli 5.1.12. je dat prikaz rezultata dobijenih određivanjem koncentracije hemoglobina u krvi pacova 24h nakon IM aplikacije FR kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog i vodenog ekstrakta kukureka, u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM ogleđnim grupama, kao i 24h nakon IM aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, MEK ili EK u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika u srednjim vrednostima ovog parametra je data u tabelama 5.1.12.a., 5.1.12.b., 5.1.12.c., 5.1.12.d. i 5.1.12.e.

Tabela 5.1.12. Osnovni statistički parametri za koncentraciju hemoglobina (g/L) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	118,14	2,41	0,91	2,04	115-121
PEK 50	121,43	4,93	1,86	4,06	114-129
PEK 100	147,71	7,04	2,66	4,77	139-156
PEK 200	137,14	18,79	7,10	13,70	109-158
HEK 50	124,86	6,52	2,46	5,22	115-134
HEK 100	133,71	4,42	1,67	3,31	130-143
HEK 200	131,43	9,11	3,44	6,93	114-141
MEK 50	135,43	7,74	2,93	5,72	124-146
MEK 100	138,00	12,18	4,60	8,83	123-156
MEK 200	133,29	18,65	7,05	13,99	104-154
EK 50	147,71	7,70	2,91	5,21	139-161
EK 100	135,86	10,32	3,90	7,60	124-151
EK 200	137,71	12,75	4,82	9,26	114-155
DM1	125,29	14,01	5,29	11,18	95-136
DM1+FR	122,29	10,36	3,91	8,47	113-141
DM1+MEK50	123,14	15,04	5,68	12,21	104-140
DM1+MEK100	116,00	14,71	5,56	12,68	104-138
DM1+MEK200	135,71	12,46	4,71	9,18	113-148
DM1+EK50	132,00	7,21	2,73	5,46	125-147
DM1+EK100	118,29	8,90	3,36	7,53	109-130
DM1+EK200	120,86	10,96	4,14	9,07	102-132

Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe pacova je iznosila 118,14±2,41 g/L, a niža vrednost je zabeležena samo u grupi koja je tri dana primala deksametazon, a četvrtog dana je tretirana sa 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta (116,00±14,71 g/L krvi). Porast koncentracije hemoglobina u krvi pacova je registrovan kod svih grupa 24h posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta: petroletarskog (121,43±4,93 g/L, 147,71±7,04 g/L i 137,14±18,79 g/L), hloroformskog (124,86±6,52 g/L, 133,71±4,42 g/L i 131,43±9,11 g/L), metanolnog (135,43±7,74 g/L, 138,00±12,18 g/L i 133,29±18,65 g/L) i vodenog (147,71±7,70 g/L, 135,86±10,32 g/L i 137,71±12,75 g/L). Povećanje vrednosti ovog parametra je zabeleženo i nakon trokratnog aplikovanja deksametazona (125,29±14,01 g/L) i kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor (122,29±10,36 g/L), metanolni ekstrakta u dozi 50 mg/kg TM (123,14±15,04 g/L) ili 200 mg /kg TM (135,71±12,46 g/L), vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM (132,00±7,21 g/L, 118,29±8,90 g/L i 120,86±10,96 g/L) (Tabela 5.1.12.).

Tabela 5.1.12.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	P<0,01	P<0,05
PEK 50	-	P<0,01	P<0,05
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina, izložena u tabeli 5.1.12.a., ukazuje da su pacovi kontrolne grupe imali statistički značajno nižu koncentraciju hemoglobina u odnosu na grupe PEK 100 (P<0,01) i PEK 200 (P<0,05), dok u odnosu na grupu PEK 50 nije utvrđena statistički značajna razlika (P>0,05). Grupa kojoj je aplikovan ekstrakt u dozi od 50 mg/kg TM je imala signifikantno nižu vrednost koncentracije hemoglobina u odnosu na grupe 24h posle aplikacije 100 mg/kg TM ekstrakta (P<0,01) i 200 mg/kg TM ekstrakta (P<0,05). Između grupa PEK 100 i PEK 200 nije utvrđena statistički značajna razlika (P>0,05).

Tabela 5.1.12.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	P<0,05	P<0,05
HEK 50	-	P<0,05	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize prikazane u tabeli 5.2.12.b. se zapaža značajno povećanje srednje vrednosti koncentracije hemoglobina kod oglednih grupa HEK 100 i HEK 200 u odnosu na kontrolnu grupu (P<0,05), dok veća vrednost ovog parametra kod grupe HEK 50 u odnosu na kontrolu, nije signifikantna (P>0,05). Vrednost ovog parametra je značajno niža kod grupe kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta, nego kod grupe tretirane sa 100 mg/kg TM (P<0,05), a niža vrednost u odnosu na grupu koja je dobila 200 mg/kg TM ekstrakta nije statistički značajna (P>0,05). Razlika u prosečnoj koncentraciji hemoglobina između grupa HEK 100 i HEK 200 nije bila signifikantna (P>0,05).

Tabela 5.1.12.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,05	P<0,05	P<0,05
MEK 50	-	NSZ	NSZ
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe pacova je bila niža nego kod oglednih grupa kod kojih aplikovan metanolni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, pri čemu su razlike bile na nivou značajnosti P<0,05. Između oglednih grupa 24h posle aplikacije različitih doza metanolnog ekstrakta nije utvrđena statistička značajnost razlika (P>0,05) (Tabela 5.1.12.c.).

Tabela 5.1.12.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,01	P<0,05	P<0,05
EK 50	-	P<0,05	NSZ
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize prikazane u tabeli 5.1.12.d., zapažaju se statistički značajne razlike u srednjim vrednostima koncentracije hemoglobina između kontrolne i oglednih grupa, pri čemu je grupa 24h posle primene 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta imala značajno veću vrednost koncentracije hemoglobina na nivou značajnosti od $P < 0,01$, a grupe tretirane ekstraktom u dozi od 100 ili 200 mg/kg TM na nivou značajnosti od $P < 0,05$. Uočena je statistički značajno niža vrednost koncentracije hemoglobina kod grupe EK 100 u odnosu na grupu EK 50 ($P < 0,05$) i niža vrednost ovog parametra u odnosu na grupu EK 200 koja nije i statistički značajna ($P > 0,05$). Razlika u srednjim vrednostima koncentracije hemoglobina kod grupa koje su tretirane sa 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta nije bila signifikantna ($P > 0,05$).

Tabela 5.1.12.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije hemoglobina u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana FR, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
	DM1+ FR	NSZ	NSZ	$P < 0,05$	NSZ	NSZ	NSZ
		DM1+ MEK50	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
			DM1+ MEK100	$P < 0,05$	$P < 0,05$	NSZ	NSZ
				DM1+ MEK200	NSZ	$P < 0,05$	$P < 0,05$
					DM1+ EK50	$P < 0,05$	$P < 0,05$
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize date u tabeli 5.1.12.e., uočava se da su grupe sa najvećom prosečnom vrednošću koncentracije hemoglobina, DM1+MEK200 i DM1+EK50, između kojih je utvrđena mala, nesignifikantna razlika ($P > 0,05$), imale statistički značajno veće vrednosti ovog parametra u odnosu na grupe DM1+MEK100, DM1+EK100 i DM1+EK200 ($P < 0,05$), a na istom nivou značajnosti je i veća vrednost sadržaja hemoglobina kod grupe DM1+MEK200 u odnosu na grupu koja je nakon trokratne aplikacije deksametazona tretirana fiziološkim rastvorom. Ove vrednosti su se između ostalih ispitivanih grupa razlikovale, ali te razlike nisu bile signifikantne ($P > 0,05$).

5.1.13. Hematokritska vrednost (Hct %)

U tabeli 5.1.13. su dati rezultati određivanja hematokritske vrednosti u krvi pacova 24h nakon IM aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog i vodenog ekstrakta kukureka ogleđnim grupama, kao i 24h nakon IM aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, MEK ili EK u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM). Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti hematokrita je prikazana u tabelama 5.1.13.a., 5.1.13.b., 5.1.13.c., 5.1.13.d. i 5.1.13.e.

Tabela 5.1.13. Osnovni statistički parametri za hematokritsku vrednost (%) pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	38,11	1,11	0,42	2,90	37,00-40,00
PEK 50	33,09	2,01	0,76	6,09	30,60-36,70
PEK 100	41,99	2,28	0,86	5,43	39,00-45,30
PEK 200	37,60	4,65	1,76	12,35	31,20-42,70
HEK 50	35,46	1,74	0,66	4,90	32,40-38,00
HEK 100	36,17	1,09	0,41	3,00	35,10-38,00
HEK 200	36,57	2,31	0,87	6,33	32,00-38,70
MEK 50	37,74	1,72	0,65	4,56	35,50-40,50
MEK 100	37,97	3,74	1,41	9,84	32,70-43,20
MEK 200	41,20	6,16	2,33	14,94	33,10-47,80
EK 50	38,36	2,22	0,84	5,78	35,70-41,90
EK 100	37,81	3,34	1,26	8,84	31,90-41,80
EK 200	44,57	4,16	1,57	9,32	38,50-49,40
DM1	41,20	5,09	1,92	12,35	30,90-44,90
DM1+FR	35,10	3,39	1,28	9,66	30,30-40,10
DM1+MEK50	38,84	4,48	1,69	11,52	32,30-45,40
DM1+MEK100	30,13	4,53	1,71	15,04	26,60-37,60
DM1+MEK200	40,60	4,83	1,82	11,89	33,40-45,10
DM1+EK50	45,01	2,82	1,07	6,26	41,30-50,40
DM1+EK100	36,37	2,92	1,11	8,04	33,70-41,60
DM1+EK200	41,20	3,38	1,28	8,20	35,20-43,70

Rezultati ispitivanja hematokritske vrednosti prikazani u tabeli 5.1.13., ukazuju da je prosečna hematokritska vrednost kod kontrolne grupe pacova iznosila $38,11 \pm 1,11\%$, a od grupa kojima je aplikovan samo ekstrakt kukureka, najviša srednja vrednost je zabeležena kod grupe koja je primila vodeni ekstrakt u dozi od 200 mg/kg TM ($44,57 \pm 4,16\%$). Kod ostalih oglednih grupa 24h posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta ove vrednosti su bile: $33,09 \pm 2,01\%$, $41,99 \pm 2,28\%$ i $37,60 \pm 4,65\%$ posle primene petroletarskog ekstrakta, $35,46 \pm 1,74\%$, $36,17 \pm 1,09\%$ i $36,57 \pm 2,31\%$ posle tretmana hloroformskim ekstraktom, $37,74 \pm 1,72\%$, $37,97 \pm 3,74\%$ i $41,20 \pm 6,16\%$ nakon tretmana metanolnim ekstraktom. Kod grupe EK 50 je zabeležena hematokritska vrednost od $38,36 \pm 2,22\%$, a kod grupe EK 100 od $37,81 \pm 3,34\%$. Grupa kojoj je trokratno aplikovan deksametazon je imala prosečnu vrednost hematokrita $41,20 \pm 5,09\%$, a kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su bile: $35,10 \pm 3,39\%$ (FR), $38,84 \pm 4,48\%$, $30,13 \pm 4,53\%$ i $40,60 \pm 4,83\%$ (MEK), $45,01 \pm 2,82\%$, $36,37 \pm 2,92\%$ i $41,20 \pm 3,38\%$ (EK).

Tabela 5.1.13.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti hematokrita kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	P<0,05	NSZ
PEK 50	-	P<0,001	P<0,05
PEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih hematokritskih vrednosti prikazana u tabeli 5.1.13.a., ukazuje na postojanje statistički značajno veće vrednosti hematokrita u grupi PEK 100 u odnosu na kontrolnu i grupu PEK 200 ($P<0,05$), kao i grupu PEK 50 ($P<0,001$). Veća hematokritska vrednost je registrovana kod kontrolne grupe u odnosu na grupu tretiranu sa 50 mg/kg TM ekstrakta i to na nivou visoko signifikantne razlike ($P<0,001$), i u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 200 mg/kg ekstrakta ali razlika nije bila statistički značajna ($P>0,05$). Ustanovljena je značajno manja vrednost ovog parametra kod grupe PEK 50 u odnosu na grupu PEK 200 ($P<0,05$).

Tabela 5.1.13.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti hematokrita kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,05	P<0,05	P<0,05
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Srednja vrednost hematokrita kontrolne grupe pacova je bila veća nego kod oglednih grupa kod kojih aplikovan hloroformski ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, pri čemu su razlike bile statistički značajne na nivou značajnosti P<0,05. Između oglednih grupa 24h posle aplikacije različitih doza hloroformskog ekstrakta nije utvrđena statistička značajnost razlika (P>0,05) (Tabela 5.1.13.b.).

Tabela 5.1.13.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti hematokrita kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	NSZ	NSZ	P<0,05
MEK 50	-	NSZ	P<0,05
MEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Nisu zapažene statistički značajne razlike srednjih hematokritskih vrednosti između oglednih grupa MEK 50 i MEK 100 u odnosu na kontrolnu grupu, kao niti između samih navedenih oglednih grupa (P>0,05). Grupa kojoj je aplikovano 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala statistički značajno veću vrednost hematokrita nego kontrolna grupa i grupe tretirane sa 50 ili 100 mg/kg TM ekstrakta (P<0,05) (Tabela 5.1.13.c.).

Tabela 5.1.13.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti hematokrita kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	NSZ	P<0,01
EK 50	-	NSZ	P<0,01
EK 100	-	-	P<0,01

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.1.13.d., zapaža se da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti hematokrita oglednih grupa EK 50 i EK 100 u odnosu na kontrolnu grupu, kao niti između samih navedenih oglednih grupa

($P > 0,05$). Statistički značajno veća vrednost hematokrita je registrovana u grupi EK 200 u odnosu na kontrolnu grupu i grupe tretirane sa 50 ili 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta i to na nivou vrlo signifikantne razlike ($P < 0,01$).

Tabela 5.1.13.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti hematokrita 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	$P < 0,05$	NSZ	$P < 0,01$	NSZ	NSZ	$P < 0,05$	NSZ
	DM1+ FR	NSZ	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,001$	NSZ	$P < 0,05$
		DM1+ MEK50	$P < 0,01$	NSZ	$P < 0,01$	NSZ	NSZ
			DM1+ MEK100	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,05$	$P < 0,01$
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	$P < 0,001$	NSZ
						DM1+ EK100	$P < 0,05$

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize date u tabeli 5.1.13.e., uočava se statistički značajno veća vrednost hematokrita posle trokratne aplikacije deksametazona pacovima, u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona jednokratno tretirane fiziološkim rastvorom ($P < 0,05$), sa 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta ($P < 0,01$ odn. $P < 0,05$). Prosečna vrednost ovog parametra kod pacova koji su nakon deksametazona dobili fiziološki rastvor, je bila značajno viša u odnosu na grupu DM1+MEK100 ($P < 0,05$), a niža nego kod grupa DM1+MEK200 i DM1+EK200 (na nivou značajnosti $P < 0,05$) i DM1+EK50 (na nivou značajnosti $P < 0,001$). Najveća hematokritska vrednost je utvrđena u grupi DM1+EK50, pri čemu je razlika između ove i grupe DM1+MEK50 bila vrlo signifikantna ($P < 0,01$), a u odnosu na grupe tretirane sa po 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka razlika je bila na višem nivou značajnosti ($P < 0,001$). Najniži hematokrit je registrovan u grupi DM1+MEK100 i ta vrednost je bila značajno niža u odnosu na utvrđene vrednosti kod DM1+MEK50, DM1+MEK200 i DM1+EK200 ($P < 0,01$) i DM1+EK100 ($P < 0,05$). Grupa DM1+EK200 je imala značajno veću hematokritsku vrednost nego DM1+EK100 ($P < 0,05$).

5.2. REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA AKUTNE ZAPALJENSKE REAKCIJE

5.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita u krvi (SE)

Rezultati određivanja brzine sedimentacije eritrocita posle 15 min, 30 min, 45 min i 60 min u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su prikazani u tabelama 5.2.1.A., 5.2.1.B., 5.2.1.C. i 5.2.1.D. Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti sedimentacije posle 15 min je data u tabelama 5.2.1.a., 5.2.1.b., 5.2.1.c., 5.2.1.d., 5.2.1.e., posle 30 min u tabelama 5.2.1.f., 5.2.1.g., 5.2.1.h., 5.2.1.i., 5.2.1.j., nakon 45 min u tabelama 5.2.1.k., 5.2.1.l., 5.2.1.lj., 5.2.1.m., 5.2.1.n. i nakon 60 min u tabelama 5.2.1.nj., 5.2.1.o., 5.2.1.p., 5.2.1.r. i 5.2.1.s.

Tabela 5.2.1.A. Osnovni statistički parametri za brzinu sedimentacije posle 15 min (mm/15min) u krvi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) i deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	0,43	0,53	0,20	124,72	0-1
PEK 50	0,86	0,38	0,14	44,10	0-1
PEK 100	0,29	0,49	0,18	170,78	0-1
PEK 200	1,00	0,00	0,00	0,00	1-1
HEK 50	2,57	1,27	0,48	49,48	1-5
HEK 100	0,43	0,53	0,20	124,72	0-1
HEK 200	1,57	1,13	0,43	72,16	0-3
MEK 50	5,86	2,27	0,86	38,72	3-10
MEK 100	2,29	1,11	0,42	48,68	1-4
MEK 200	1,71	0,76	0,29	44,10	1-3
EK 50	1,14	1,07	0,40	93,54	0-3
EK 100	3,14	1,68	0,63	53,33	2-6
EK 200	1,43	0,53	0,20	37,42	1-2
DM1	0,14	0,38	0,00	0,00	0-0
DM1+FR	0,71	0,49	0,18	68,31	0-1
DM1+MEK50	4,86	4,91	1,86	101,16	0-15
DM1+MEK100	1,29	0,49	0,18	37,95	1-2
DM1+MEK200	0,86	0,69	0,26	80,51	0-2
DM1+EK50	2,43	2,15	0,81	88,50	0-5
DM1+EK100	2,86	0,38	0,14	13,23	2-3
DM1+EK200	3,00	1,83	0,69	60,86	1-6

U tabeli 5.2.1.A. su prikazani rezultati brzine sedimentacije eritrocita u krvi kontrolne i oglednih grupa posle 15 min. Najniže srednje vrednosti brzine sedimentacije posle 15 min su imale grupa kojoj je tri dana aplikovan deksametazon $0,14 \pm 0,38$ mm, grupa PEK 100 $0,29 \pm 0,49$ mm, kontrolna grupa i grupa HEK 100 po $0,43 \pm 0,53$ mm. Kod ostalih oglednih grupa 24h posle aplikacije ekstrakta, zabeleženo je povećanje brzine sedimentacije, a prosečne vrednosti su bile: $0,86 \pm 0,38$ mm i $1,00 \pm 0,00$ mm posle primene petroletarskog ekstrakta u dozi 50 i 200 mg/kg TM, $2,57 \pm 1,27$ mm i $1,57 \pm 1,13$ mm posle aplikacije 50 i 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta, $5,86 \pm 2,27$ mm, $2,29 \pm 1,11$ mm i $1,71 \pm 0,76$ mm nakon primene 50, 100 i 200 mg/kg metanolnog

ekstrakta i $1,14 \pm 1,07$ mm, $3,14 \pm 1,68$ mm i $1,43 \pm 0,53$ mm posle aplikacije 50, 100 i 200 mg/kg vodenog ekstrakta. Vrednosti ovog parametra kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor su iznosile $0,71 \pm 0,49$ mm, metanolni ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: $4,86 \pm 4,91$ mm, $1,29 \pm 0,49$ mm i $0,86 \pm 0,69$ mm, vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: $2,43 \pm 2,15$ mm, $2,86 \pm 0,38$ mm i $3,00 \pm 1,83$ mm.

Tabela 5.2.1.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE - 15 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	NSZ	P<0,05
PEK 50	-	P<0,05	NSZ
PEK 100	-	-	P<0,01

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize prikazane u tabeli 5.2.1.a., zapaža se povećanje brzine sedimentacije posle 15 min kod ogledne grupe PEK 50 i smanjenje ove vrednosti kod grupe PEK 100 koje nije bilo signifikantno u odnosu na kontrolnu grupu ($P > 0,05$), dok je veća vrednost ovog parametra kod grupe PEK 200 u odnosu na kontrolu statistički značajna ($P < 0,05$). Uočena je statistički značajno niža vrednost sedimentacije posle 15 min nakon aplikacije 100 mg/kg TM ekstrakta u odnosu na grupe kojima je aplikovan ekstrakt u dozi 50 mg/kg TM ($P < 0,05$) i 200 mg/kg TM ($P < 0,01$). Razlika u vrednostima ovog parametra kod grupa PEK 50 i PEK 200 nije bila signifikantna ($P > 0,05$).

Tabela 5.2.1.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 15 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,01	NSZ	P<0,05
HEK 50	-	P<0,01	NSZ
HEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Statistički značajno brža sedimentacija posle 15 min u odnosu na kontrolnu grupu je zapažena u grupama HEK 50 (nivo značajnosti $P < 0,01$) i HEK 200 (nivo značajnosti $P < 0,05$). Nije utvrđena statistički značajna razlika ove vrednosti kod grupe HEK 100 u odnosu na kontrolnu grupu, kao niti između grupa HEK 50 i HEK 200 ($P > 0,05$). Statistički signifikantno nižu vrednost sedimentacije posle 15 min u krvi je imala grupa tretirana sa 100 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta u odnosu na grupu

kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta ($P<0,01$), kao i u odnosu na grupu koja je dobila 200 mg/kg TM ekstrakta i to na nivou značajnosti od $P<0,05$ (Tabela 5.2.1.b.).

Tabela 5.2.1.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 15 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,01	P<0,01
MEK 50	-	P<0,01	P<0,001
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.2.1.c., ukazuje da su statistički značajno veću brzinu sedimentacije eritrocita posle 15 min u odnosu na kontrolnu grupu, imali pacovi ogleadne grupe MEK 50 i to na nivou značajnosti od $P<0,001$, kao i grupa MEK 100 i MEK 200, ali na nivou značajnosti od $P<0,01$. Grupa koja je tretirana sa 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala statistički značajno veću brzinu sedimentacije u odnosu na grupe tretirane ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM ($P<0,01$) i 200 mg/kg TM ($P<0,001$). Između grupa MEK 100 i MEK 200 nije utvrđena statistički signifikantna razlika u vrednostima ovog parametra ($P>0,05$).

Tabela 5.2.1.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 15 min kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	P<0,01	P<0,05
EK 50	-	P<0,05	NSZ
EK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

U tabeli 5.2.1.d. su prikazani rezultati analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 15 min kod kontrolne grupe pacova i posle aplikacije vodenog ekstrakta kukureka. Uočena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod grupa EK 100 ($P<0,01$) i EK 200 ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu, dok veća vrednost SE – 15 min grupe EK 50 nije bila statistički značajna u odnosu na grupu kojoj je aplikovan fiziološki rastvor ($P>0,05$). Zabeležena je statistički značajno veća brzina sedimentacije posle 15 min kod grupe tretirane ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM u odnosu na grupe kojima je aplikovano 50 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P>0,05$). Utvrđena razlika ovih vrednosti između grupa EK 50 i EK 200 nije bila statistički signifikantna ($P>0,05$).

Tabela 5.2.1.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 15 min 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+FR	DM1+MEK50	DM1+MEK100	DM1+MEK200	DM1+EK50	DM1+EK100	DM1+EK200
DM1 (3 dana)	P<0,05	P<0,001	P<0,01	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001
DM1+FR		P<0,001	P<0,05	NSZ	P<0,01	P<0,01	P<0,01
DM1+MEK50			P<0,01	P<0,001	P<0,05	P<0,05	P<0,05
DM1+MEK100				NSZ	P<0,05	P<0,01	P<0,01
DM1+MEK200					P<0,05	P<0,01	P<0,01
DM1+EK50						NSZ	NSZ
DM1+EK100							NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Statistički značajno brža SE - 15 min u odnosu na grupe DM1 i DM1+FR je konstatovana u grupama koje su nakon trokratne aplikacije deksametazona, četvrtog dana dobile 50 mg/kg metanolnog ekstrakta (P<0,001), 100 mg/kg TM metanolnog (P<0,01 odn. P<0,05) ili vodenog ekstrakta u dozama 50, 100 ili 200 mg/kg TM (P<0,001 odn. P<0,01). Razlika u vrednostima sedimentacije između grupa DM1+FR i DM1+MEK200 nije bila statistički značajna (P>0,05), a brža sedimentacije je zabeležena kod ovih grupa u odnosu na DM1 (P<0,05). Najveća vrednost ovog parametra je utvrđena kod grupe DM1+MEK50, a razlika je bila vrlo signifikantna i visoko signifikantna u odnosu na grupe DM1+MEK100 (P<0,01) i DM1+MEK200 (P<0,001) i značajna u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona tretirane različitim dozama vodenog ekstrakta (P<0,05). Između grupa DM1+MEK100 i DM1+MEK200 nije utvrđena statistički značajna razlika, a SE - 15 min u ovim grupama je bila sporija nego u grupama DM1+EK50 (P<0,05), DM1+EK100 i DM1+EK200 (P<0,01). Razlike u brzini sedimentacije eritrocita kod grupa koje su primile različite doze vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM) nisu bile signifikantne (P>0,05) (Tabela 5.2.1.e.).

Tabela 5.2.1.B. Osnovni statistički parametri za brzinu sedimentacije posle 30 min (mm/30min) u krvi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) i deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	1,86	0,90	0,34	48,45	1-3
PEK 50	3,29	0,76	0,29	23,01	2-4
PEK 100	1,29	0,49	0,18	37,95	1-2
PEK 200	3,86	1,21	0,46	31,50	2-6
HEK 50	5,43	1,90	0,72	35,04	3-9
HEK 100	2,86	1,21	0,46	42,52	2-5
HEK 200	4,57	2,44	0,92	53,37	2-8
MEK 50	15,00	6,14	2,32	40,92	9-27
MEK 100	6,43	1,90	0,72	29,59	4-10
MEK 200	3,93	0,93	0,35	23,73	2-5
EK 50	7,29	3,59	1,36	49,31	2-12
EK 100	14,00	5,77	2,18	41,24	10-25
EK 200	10,71	0,95	0,36	8,88	10-12
DM1	1,14	0,38	0,14	33,07	1-2
DM1+FR	1,86	0,38	0,14	20,35	1-2
DM1+MEK50	22,43	11,16	4,22	49,77	10-35
DM1+MEK100	13,29	2,87	1,08	21,60	9-17
DM1+MEK200	8,57	2,88	1,09	33,58	5-13
DM1+EK50	8,86	5,76	2,18	65,00	2-17
DM1+EK100	6,00	1,83	0,69	30,43	5-10
DM1+EK200	13,00	7,39	2,79	56,87	5-25

Najniže vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 30 min su zabeležene kod grupe kojoj je trokratno aplikovan deksametazon ($1,14 \pm 0,38$ mm), grupe koja je dobila 100 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta ($1,29 \pm 0,49$ mm), kod kontrolne grupe i grupe koja je posle deksametazona tretirana fiziološkim rastvorom ($1,86 \pm 0,90$ mm odn. $1,86 \pm 0,38$ mm). Ostale ogledne grupe 24h posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta kukureka su u odnosu na kontrolnu grupu imale veće vrednosti brzine sedimentacije posle 30 min u krvi: $5,43 \pm 1,90$ mm, $2,86 \pm 1,21$ mm i $4,57 \pm 2,44$ mm posle primene hloroformskog ekstrakta, $15,00 \pm 6,14$ mm, $6,43 \pm 1,90$ mm i $3,93 \pm 0,93$ mm posle tretmana metanolnim ekstraktom, $7,29 \pm 3,59$ mm, $14,00 \pm 5,77$ mm i $10,71 \pm 0,95$

mm nakon aplikovanja vodenog ekstrakta. Kod grupe PEK 50 zabeležena vrednost SE – 15 min je $3,29 \pm 0,76$ mm, a kod grupe PEK 200 $3,86 \pm 1,21$ mm. Vrednosti ovog parametra kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile metanolni ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su iznosile: $22,43 \pm 11,16$ mm, $13,29 \pm 2,87$ mm i $8,57 \pm 2,88$ mm ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: $8,86 \pm 5,76$ mm, $6,00 \pm 1,83$ mm i $13,00 \pm 7,39$ mm (Tabela 5.2.1.B.).

Tabela 5.2.1.f. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 30 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,01	NSZ	P<0,01
PEK 50	-	P<0,001	NSZ
PEK 100	-	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Brzina sedimentacije eritrocita posle 30 min u krvi kontrolne grupe pacova je bila niža nego kod oglednih grupa kod kojih je aplikovan petroletarski ekstrakt u dozi 50 i 200 mg/kg TM, pri čemu su razlike bile statistički značajne na nivou značajnosti od P<0,01. Veće vrednosti SE - 30 min u krvi kontrolne grupe u odnosu na grupu PEK 100, kao i grupe PEK 200 u odnosu na grupu PEK 50 nisu bile signifikantne (P>0,05). Statistički visoko signifikantna razlika je registrovana između grupa PEK 50 i PEK 100, kao i PEK 100 i PEK 200 (P<0,001), pri čemu je grupa PEK 100 imala manju brzinu sedimentacije eritrocita posle 30 min u odnosu na druge dve navedene grupe (Tabela 5.2.1.f.).

Tabela 5.2.1.g. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 30 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,001	NSZ	P<0,01
HEK 50	-	P<0,01	NSZ
HEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Statistički značajno veće brzina sedimentacije eritrocita posle 30 min u odnosu na kontrolnu grupu, zabeležena je u oglednoj grupi posle aplikacije 50 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta (P<0,001) i u grupi nakon aplikacije 200 mg/kg TM HEK i to na nivou značajnosti od P<0,01. Grupa HEK 100 je imala veću vrednost SE – 30 min u odnosu na kontrolnu grupu, ali ta razlika nije bila statistički signifikantna (P>0,05), dok

je niža srednja vrednost sedimentacije u ovoj oglednoj grupi u odnosu na druge dve ogledne grupe bila statistički značajna, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,01$ (za grupu HEK 50) i $P < 0,05$ (za grupu HEK 200). Između srednjih vrednosti SE - 30 min grupa HEK 50 i HEK 200 nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$) (Tabela 5.2.1.g.).

Tabela 5.2.1.h. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 30 min kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$
MEK 50	-	$P < 0,01$	$P < 0,001$
MEK 100	-	-	$P < 0,05$

Iz analize prikazane u tabeli 5.2.1.h., zapaža se povećanje brzine sedimentacije posle 30 min u krvi pacova oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu su razlike bile statistički značajne na nivou značajnosti $P < 0,001$ posle tretmana ekstraktom kukureka u dozi 50 ili 100 mg/kg TM i na nivou značajnosti $P < 0,01$ nakon aplikovanja 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta. Grupa MEK 200 je imala statistički značajno nižu vrednost sedimentacije u odnosu na grupe MEK 50 ($P < 0,001$) i MEK 100 ($P < 0,05$), kao i grupa MEK 100 u odnosu na grupu MEK 50 ($P < 0,01$).

Tabela 5.2.1.i. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 30 min kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
EK 50	-	$P < 0,01$	$P < 0,05$
EK 100	-	-	$P < 0,05$

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 30 min u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM EK, prikazana u tabeli 5.2.1.i., ukazuje da su statistički značajno veću vrednost sedimentacije imali pacovi navedenih oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Grupa EK 100 je imala statistički značajno veću srednju vrednost SE – 30 min u odnosu na grupe tretirane sa 50 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,01$) i 200 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,05$). Uočena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod grupe EK 200 u odnosu na grupu EK 50 ($P < 0,05$) (Tabela 5.2.1.i.).

Tabela 5.2.1.j. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 30 min 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
DM1+ FR		P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
DM1+ MEK50			P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,001	P<0,05
DM1+ MEK100				P<0,05	P<0,05	P<0,01	NSZ
DM1+ MEK200					NSZ	NSZ	P<0,05
DM1+ EK50						NSZ	P<0,05
DM1+ EK100							P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima SE - 30 min prikazana u tabeli 5.2.1.j., ukazuje da je brža sedimentacija eritrocita utvrđena kod grupe DM1+FR nego kod DM1 (P<0,05), kao i da je u odnosu na prethodno navedene grupe značajno povećanje ove vrednosti konstatovano kod grupa kojima je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana po 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta (P<0,001). Brža SE – 30 min je utvrđena i kod DM1+MEK50 nego kod DM1+MEK100 (P<0,05), a vrednosti zabeležene kod ove dve grupe su bile veće u odnosu na ostale ispitivane grupe, ali na različitim nivoima značajnosti: P<0,01 odn. P<0,05 za DM1+MEK200 i DM1+EK50, P<0,001 odn. P<0,01 za DM1+EK100 i P<0,05 odn. nije značajno za DM1+EK200. Signifikantno veća vrednost brzine sedimentacije eritrocita posle 30 min (P<0,05) je bila u krvi pacova koji su nakon deksametazona dobili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka, u odnosu na grupe DM1+MEK200, DM1+EK50 i DM1+EK100, između kojih su zabeležene male razlike koje nisu bile statistički značajne (P>0,05).

Tabela 5.2.1.C. Osnovni statistički parametri za brzinu sedimentacije posle 45 min (mm/45min) u krvi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) i deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	3,14	1,46	0,55	46,58	2-5
PEK 50	4,29	0,76	0,29	17,64	3-5
PEK 100	2,29	0,76	0,29	33,07	1-3
PEK 200	7,71	2,14	0,81	27,72	4-10
HEK 50	8,57	2,76	1,04	32,20	5-14
HEK 100	6,43	3,36	1,27	52,26	3-10
HEK 200	6,61	3,23	1,22	48,85	3-11
MEK 50	23,00	6,14	2,32	26,68	14-34
MEK 100	9,86	2,12	0,80	21,46	8-14
MEK 200	10,00	3,27	1,23	32,66	7-15
EK 50	13,57	6,95	2,63	51,20	5-23
EK 100	23,43	7,57	2,86	32,31	15-36
EK 200	21,71	1,38	0,52	6,36	20-24
DM1	2,36	0,75	0,28	31,73	2-4
DM1+FR	2,71	0,76	0,29	27,85	2-4
DM1+MEK 50	38,71	10,89	4,12	28,13	24-50
DM1+MEK100	25,71	6,50	2,46	25,27	16-32
DM1+MEK200	18,43	6,08	2,30	32,99	12-28
DM1+EK50	26,43	10,52	3,98	39,80	15-45
DM1+EK100	12,00	3,56	1,35	29,66	8-18
DM1+EK200	24,43	11,21	4,24	45,88	15-45

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2.1.C. se može videti da su srednje vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 45 min bile najniže kod grupa PEK 100 ($2,29 \pm 0,76$ mm), DM1 ($2,36 \pm 0,75$ mm), DM1+FR ($2,71 \pm 0,76$ mm) i kontrolne grupe ($3,14 \pm 1,46$ mm). Zabeležene vrednosti SE – 45 min posle primene petroletarskog ekstrakta u dozi 50 i 200 mg/kg TM su bile $4,29 \pm 0,76$ mm i $7,71 \pm 2,14$ mm. Kod ostalih oglednih grupa 24h posle primene 50, 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta kukureka, utvrđeno je povećanje brzine sedimentacije, a prosečne vrednosti su iznosile: $8,57 \pm 2,76$ mm, $6,43 \pm 3,36$ mm i $6,61 \pm 3,23$ mm posle aplikacije hloroformskog ekstrakta, $23,00 \pm 6,14$ mm, $9,86 \pm 2,12$ mm i $10,00 \pm 3,27$ mm nakon primene metanolnog ekstrakta i $13,57 \pm 6,95$ mm,

23,43±7,57 mm i 21,71±1,38 mm posle aplikacije vodenog ekstrakta. Vrednosti ovog parametra kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile metanolni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su iznosile: 38,71±10,89 mm, 25,71±6,50 mm i 18,43±6,08 mm ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM: 26,43±10,52 mm, 12,00±3,56 mm i 24,43±11,21 mm.

Tabela 5.2.1.k. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 45 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	NSZ	NSZ	P<0,001
PEK 50	-	P<0,001	P<0,01
PEK 100	-	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2.1.k. se zapaža da nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolne i oglednih grupa PEK 50 i PEK 100 ($P>0,05$), dok je kod grupe PEK 200 zabeležena statistički značajno veća vrednost brzine sedimentacije eritrocita nakon 45 min u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou značajnosti $P<0,001$. Grupa kojoj je aplikovano 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta je imala signifikantno veću vrednost SE - 45 min u odnosu na grupe tretirane sa 50 mg/kg TM ($P<0,01$) i 100 mg/kg TM ekstrakta ($P<0,001$). Razlika između srednjih vrednosti ovog parametra kod grupa PEK 50 i PEK 100 je bila visoko značajna ($P>0,001$), pri čemu je veća vrednost utvrđena kod grupe koja je tretirana ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM.

Tabela 5.2.1.l. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 45 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,001	P<0,05	P<0,05
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

U tabeli 5.2.1.l. je prikazano prisustvo statistički značajno veće vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 45 min u krvi pacova ogledne grupe kojoj je aplikovan hloroformski ekstrakt u dozi od 50 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou značajnosti od $P<0,001$, kao i u krvi životinja posle primene ekstrakta u dozi 100 ili 200 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,05$). Između grupa kojima su

aplikovane različite doze hloroformskog ekstrakta nije zapažena statistički značajna razlika ($P>0,05$).

Tabela 5.2.1.lj. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 45 min kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,001	P<0,001
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Ogledne grupe tretirane sa 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta su imale statistički značajno veću vrednost brzine sedimentacije eritrocita posle 45 min u odnosu na kontrolnu grupu, kao i grupa kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta u odnosu na preostale dve ogledne grupe, i to na nivou značajnosti od $P<0,001$. Razlika u ovim vrednostima između grupa MEK 100 i MEK 200 nije bila statistički značajna ($P>0,05$) (Tabela 5.2.1.lj.).

Tabela 5.2.1.m. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 45 min kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,01	P<0,01
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2.1.m. se može zapaziti da su statistički značajno veće vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 45 min bile kod oglednih grupa 24h posle primene 50, 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,001$). Statistički vrlo značajne razlike su postojale između grupe EK 50 u odnosu na grupe EK 100 i EK 200 ($P<0,01$), pri čemu je grupa EK 50 imala nižu vrednost ovog parametra. Utvrđena razlika u srednjim vrednostima sedimentacije posle 45 min između oglednih grupa EK 100 i EK 200 nije bila statistički signifikantna ($P>0,05$).

Tabela 5.2.1.n. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 45 min 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
DM1+ FR		P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
DM1+ MEK50			P<0,05	P<0,01	P<0,05	P<0,001	P<0,05
DM1+ MEK100				P<0,05	NSZ	P<0,01	NSZ
DM1+ MEK200					P<0,05	P<0,05	P<0,05
DM1+ EK50						P<0,01	NSZ
DM1+ EK100							P<0,01

NSZ – nije statistički značajno

Statistički značajno brža SE - 45 min ($P<0,001$) je konstatovana u grupama koje su nakon trokratne aplikacije deksametazona, četvrtog dana dobile metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, u odnosu na grupu DM1 i DM1+FR, između kojih razlika nije značajna ($P>0,05$). Najveća vrednost ovog parametra je utvrđena kod grupe DM1+MEK50, a razlike ove u odnosu na ostale ispitivane grupe su bile na različitim nivoima značajnosti: $P<0,05$ za DM1+MEK100, DM1+EK50 i DM1+EK200, $P<0,01$ za DM1+MEK200 i $P<0,001$ za DM1+EK100. Grupa pacova kojoj je nakon deksametazona, aplikovano 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala značajno bržu sedimentaciju u odnosu na DM1+MEK200 ($P<0,05$) i DM1+EK100 ($P<0,01$), a vrednosti su slične kao kod DM1+EK50 i DM1+EK200, tako da razlike nisu bile značajne ($P>0,05$). Srednja vrednost SE – 45 min kod grupe DM1+MEK200 je bila veća nego kod DM1+EK100, a manja nego kod DM1+EK50 i DM1+EK200, pri čemu su sve razlike bile na nivou značajnosti $P<0,05$. Najniža vrednost ovog parametra je zabeležena kod grupe koja je nakon trokratne aplikacije deksametazona, dobila 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka, a razlike ove vrednosti u odnosu na SE – 45 min kod grupa koje su nakon deksametazona dobile vodeni ekstrakt u dozi 50 ili 200 mg/kg TM su bile vrlo signifikantne ($P<0,01$). Između grupa DM1+EK50 i DM1+EK200 nije utvrđena statistički značajna razlika ($P>0,05$) (Tabela 5.2.1.n.).

Tabela 5.2.1.D. Osnovni statistički parametri za brzinu sedimentacije posle 60 min (mm/60min) u krvi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) i deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	4,57	1,62	0,61	35,40	3-7
PEK 50	8,00	1,53	0,58	19,09	6-10
PEK 100	4,00	1,41	0,53	35,36	2-6
PEK 200	13,00	2,94	1,11	22,65	8-16
HEK 50	10,71	3,59	1,36	33,53	7-18
HEK 100	9,86	4,30	1,62	43,61	6-16
HEK 200	8,57	3,64	1,38	42,52	4-14
MEK 50	27,14	6,77	2,56	24,94	17-39
MEK 100	14,57	2,44	0,92	16,74	12-18
MEK 200	20,43	5,86	2,21	28,66	14-29
EK 50	21,00	10,54	3,98	50,17	10-36
EK 100	31,86	7,76	2,93	24,34	20-42
EK 200	31,71	3,15	1,19	9,92	29-37
DM1	3,86	0,69	0,26	17,89	3-5
DM1+FR	4,14	0,69	0,26	16,66	3-5
DM1+MEK50	52,86	10,46	3,95	19,80	38-65
DM1+MEK100	45,43	2,37	0,90	5,22	43-50
DM1+MEK200	32,29	5,25	1,98	16,26	26-40
DM1+EK50	39,43	12,09	4,57	30,68	25-60
DM1+EK100	18,86	5,37	2,03	28,46	11-28
DM1+EK200	37,00	14,45	5,46	39,04	25-60

Srednje vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 60 min u krvi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su prikazane u tabeli 5.2.1.D.: $4,57 \pm 1,62$ mm kod kontrolne grupe, $8,00 \pm 1,53$ mm, $4,00 \pm 1,41$ mm i $13,00 \pm 2,94$ mm posle aplikacije petroletarskog ekstrakta, $10,71 \pm 3,59$ mm, $9,86 \pm 4,30$ mm i $8,57 \pm 3,64$ mm posle primene hloroformsog ekstrakta, $27,14 \pm 6,77$ mm, $14,57 \pm 2,44$ mm i $20,43 \pm 5,86$ mm posle tretmana metanolnim ekstraktom i $21,00 \pm 10,54$ mm, $31,86 \pm 7,76$ mm i $31,71 \pm 3,15$ mm posle aplikacije vodenog ekstrakta. Iz rezultata prikazanih u ovoj tabeli se može videti da su najniže vrednosti ovog parametra zabeležene kod grupe koja je trokratno tretirana

deksametazonom ($3,86 \pm 0,69$ mm) i grupe kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor ($4,14 \pm 0,69$ mm). Vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 60 min kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su iznosile: $52,86 \pm 10,46$ mm, $45,43 \pm 2,37$ mm i $32,29 \pm 5,25$ mm (MEK), $39,43 \pm 12,09$ mm, $18,86 \pm 5,37$ mm i $37,00 \pm 14,45$ mm (EK).

Tabela 5.2.1.nj. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 60 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,01	NSZ	P<0,001
PEK 50	-	P<0,001	P<0,01
PEK 100	-	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize prikazane u tabeli 5.2.1.nj., uočava se da je u odnosu na kontrolnu grupu, statistički značajno veća vrednost brzine sedimentacije eritrocita posle 60 min bila u krvi pacova posle primene 50 mg/kg TM (P<0,01) i 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta (P<0,001), dok vrednost zabeležena u grupi PEK 100 nije signifikantno niža (P>0,05). Visoko signifikantne razlike (P<0,001) su ustanovljene između vrednosti sedimentacije grupa PEK 50 i PEK 200 u odnosu na grupu PEK 100, pri čemu je poslednja navedena grupa imala statistički značajno nižu vrednost. Posle aplikacije 200 mg/kg TM ekstrakta je zabeležena veća vrednost SE - 60 min nego nakon aplikacije 50 mg/kg TM (P<0,01).

Tabela 5.2.1.o. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 60 min u krvi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,01	P<0,01	P<0,01
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize date u tabeli 5.2.1.o. se vidi da su sve ogledne grupe posle aplikacije hloroformskog ekstrakta imale statistički značajno veće vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 60 min u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu su razlike bile vrlo značajne (P<0,01). Utvrđene razlike u srednjim vrednostima sedimentacije posle 60 min

između oglednih grupa posle primene 50, 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta nisu bile statistički signifikantne ($P > 0,05$).

Tabela 5.2.1.p. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 60 min kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,001	NSZ
MEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Vrednosti brzine sedimentacije eritrocita posle 60 min u krvi pacova oglednih grupa posle aplikacije metanolnog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su bile statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Grupa MEK 100 je imala statistički značajno nižu vrednost sedimentacije u krvi u odnosu na druge dve ogledne grupe, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,001$ (za grupu MEK 50) i $P < 0,05$ (za grupu MEK 200). Između pacova tretiranih ekstraktom u dozi 50 i 200 mg/kg TM nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima sedimentacije posle 60 min ($P > 0,05$) (Tabela 5.2.1.p.).

Tabela 5.2.1.r. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 60 min kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,05	P<0,05
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti sedimentacije posle 60 min u krvi kontrolne grupe i oglednih grupa nakon primene različitih doza vodenog ekstrakta kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM), data je u tabeli 5.2.1.r. i ukazuje na postojanje statistički značajnih razlika ($P < 0,001$), pri čemu su veće vrednosti sedimentacije zabeležene kod oglednih grupa. Ustanovljena je signifikantno veća vrednost SE – 60 min u krvi pacova grupa EK 100 i EK 200 u odnosu na grupu EK 50 ($P < 0,05$), dok mala razlika u vrednosti ovog parametra između prve dve navedene grupe nije bila statistički značajna ($P > 0,05$).

Tabela 5.2.1.s. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti SE – 60 min 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	NSZ	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
	DM1+ FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
		DM1+ MEK50	NSZ	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,05
			DM1+ MEK100	P<0,001	NSZ	P<0,001	NSZ
				DM1+ MEK200	NSZ	P<0,001	NSZ
					DM1+ EK50	P<0,001	NSZ
						DM1+ EK100	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima SE – 60 min, prikazana u tabeli 5.2.1.s., ukazuje da brina sedimentacije eritrocita utvrđena kod grupe DM1+FR nije signifikantno veća nego kod DM1 ($P>0,05$), kao i da je u odnosu na navedene grupe, značajno povećanje ove vrednosti konstatovano kod grupa kojima je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana po 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta ($P<0,001$). Brža SE - 60 je utvrđena i kod DM1+MEK50 nego kod DM1+MEK100, ali razlika nije bila značajna ($P>0,05$). Vrednosti zabeležene kod ove dve grupe su bile signifikantno veće u odnosu na DM1+MEK200 ($P<0,001$). Grupa pacova kojoj je nakon deksametazona aplikovano 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala veću vrednost ovog parametra u odnosu na grupe koje su četvrtog dana ogleda dobile 50 ili 200 mg/kg TM ($P<0,05$) ili 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P<0,001$). Najsporija sedimentacija nakon 60 min je zabeležena u grupi DM1+EK100, a razlika je bila visoko signifikantna ($P<0,001$) u odnosu na grupe DM1+MEK100, DM1+MEK200, DM1+EK50 i DM1+EK200. Između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene male razlike u brzini sedimentacije, koje nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

5.2.2. Koncentracija albumina u krvnoj plazmi (Alb g/L)

U tabeli 5.2.2. su prikazani rezultati određivanja koncentracije albumina u krvnoj plazmi (g/L) pacova 24h nakon IM aplikacije FR kontrolnoj grupi i 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog, hloroformskog, metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon IM aplikacije DM tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije DM, a četvrtog dana FR, MEK ili EK u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM). Analiza statističke značajnosti razlika u srednjim vrednostima koncentracije albumina je data u tabelama 5.2.2.a., 5.2.2.b. i 5.2.2.c., 5.2.2.d. i 5.2.2.e.

Tabela 5.2.2. Osnovni statistički parametri za koncentraciju albumina (g/L) u krvnoj plazmi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	35,86	10,64	4,02	29,66	23-51
PEK 50	26,00	4,97	1,88	19,10	20-32
PEK 100	39,86	12,01	4,54	30,12	23-55
PEK 200	37,14	5,87	2,22	15,81	28-45
HEK 50	38,71	5,59	2,11	14,44	30-47
HEK 100	33,57	3,60	1,36	10,72	28-40
HEK 200	44,29	3,68	1,39	8,32	37-48
MEK 50	25,29	5,56	2,10	21,99	21-37
MEK 100	32,29	4,11	1,55	12,73	26-37
MEK 200	24,71	5,85	2,21	23,68	16-30
EK 50	34,43	6,29	2,38	18,28	28-45
EK 100	26,71	3,15	1,19	11,78	21-30
EK 200	25,00	3,00	1,13	12,00	21-29
DM1	37,86	5,21	1,97	13,76	29-45
DM1+FR	31,43	2,15	0,81	6,84	28-34
DM1+MEK50	31,29	4,50	1,70	14,38	25-36
DM1+MEK100	22,57	8,02	3,03	35,52	13-37
DM1+MEK200	28,57	4,43	1,67	15,50	20-33
DM1+EK50	32,57	6,80	2,57	20,89	21-39
DM1+EK100	28,71	5,02	1,90	17,50	21-35
DM1+EK200	29,57	1,90	0,72	6,43	27-32

Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.2.2., uočava se da je prosečna vrednost koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe pacova bila $35,86 \pm 10,64$ g/L. Ova vrednost je kod grupa tretiranih ekstraktom kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM iznosila: $26,00 \pm 4,97$ g/L, $39,86 \pm 12,01$ g/L i $37,14 \pm 5,87$ g/L posle primene petroletarskog ekstrakta, $38,71 \pm 5,59$ g/L, $33,57 \pm 3,60$ g/L i $44,29 \pm 3,68$ g/L nakon aplikacije hloroformskog ekstrakta, $25,29 \pm 5,56$ g/L, $32,29 \pm 4,11$ g/L i $24,71 \pm 5,85$ g/L nakon aplikacije metanolnog ekstrakta i $34,43 \pm 6,29$ g/L, $26,71 \pm 3,15$ g/L i $25,00 \pm 3,00$ g/L posle tretmana vodenim ekstraktom. Prosečna koncentracija albumina u krvnoj plazmi pacova koji su tri dana dobijali deksametazon je iznosila $37,86 \pm 5,21$ g/L, a kod grupa kojima je tri dana aplikovan deksametazonom, a četvrtog dana su tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su bile: $31,43 \pm 2,15$ g/L (FR), $31,29 \pm 4,50$ g/L, $22,57 \pm 8,02$ g/L i $28,57 \pm 4,43$ g/L (MEK), $32,57 \pm 6,80$ g/L, $28,71 \pm 5,02$ g/L i $29,57 \pm 1,90$ g/L (EK).

Tabela 5.2.2.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,05	NSZ	NSZ
PEK 50	-	P<0,01	P<0,05
PEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Veće srednje vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi su utvrđene kod oglednih grupa PEK 100 i PEK 200 u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$), dok je PEK 50 imala signifikantno nižu koncentraciju albumina u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,05$). Grupa kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta je imala statistički značajno nižu vrednost ovog parametra u odnosu na druge dve ogledne grupe, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,01$ (za grupu tretiranu sa 100 mg/kg TM ekstrakta) i $P < 0,05$ (za grupu tretiranu sa 200 mg/kg TM ekstrakta). Nije utvrđena statistički značajna razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi oglednih grupa PEK 100 i PEK 200 ($P > 0,05$) (Tabela 5.2.2.a.).

Tabela 5.2.2.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	NSZ	NSZ	NSZ
HEK 50	-	P<0,05	P<0,05
HEK 100	-	-	P<0,001

Analiza rezultata prikazana u tabeli 5.2.2.b., ukazuje na odsustvo statističke značajnosti utvrđenih razlika ($P>0,05$) između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i oglednih grupa nakon aplikovanja hloroformskog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Ogledna grupa HEK 50 je imala signifikantno veću vrednost koncentracije albumina u odnosu na grupu HEK 100 i nižu vrednost ovog parametra u odnosu na grupu HEK 200 ($P<0,05$). Utvrđena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra u grupi koja je primila ekstrakt u dozi 200 mg/kg TM u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 100 mg/kg TM ekstrakta, i to na nivou značajnosti od $P<0,001$.

Tabela 5.2.2.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,05	NSZ	P<0,05
MEK 50	-	P<0,05	NSZ
MEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Statistički značajno niže srednje vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi u odnosu na kontrolnu grupu, zabeležene su u oglednim grupama MEK 50 i MEK 200 ($P<0,05$). Grupa MEK 100 je takođe imala nižu koncentraciju albumina u odnosu na kontrolnu grupu, ali ta razlika nije bila statistički signifikantna ($P>0,05$), dok je veća vrednost ovog parametra navedene ogledne grupe u odnosu na druge dve grupe tretirane metanolnim ekstraktom (MEK 50 i MEK 200) bila statistički značajna, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P<0,05$. Mala razlika između prosečnih koncentracija albumina u grupama kojima je aplikovan ekstrakt u dozi 50 i 200 mg/kg TM, nije bila signifikantna ($P<0,05$) (Tabela 5.2.2.c.).

Tabela 5.2.2.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	P<0,05	P<0,05
EK 50	-	P<0,05	P<0,01
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i oglednih grupa nakon aplikacije različitih doza vodenog ekstrakta kukureka, prikazane u tabeli 5.2.2.d., može se zapaziti da je statistički značajno veća koncentracija albumina zabeležena u krvnoj plazmi pacova kontrolne grupe u odnosu na grupe posle primene 100 i 200 mg/kg TM ekstrakta (P<0,05), dok veća koncentracija albumina u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta nije bila statistički značajna (P>0,05). Utvrđena je statistički značajno veća koncentracija albumina u grupi EK 50 u odnosu na grupe EK 100 (P<0,05) i EK 200 (P<0,01), između kojih nije utvrđena signifikantna razlika (P>0,05).

Tabela 5.2.2.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije albumina 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,05	P<0,01	P<0,01
	DM1+ FR	NSZ	P<0,05	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
		DM1+ MEK50	P<0,05	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
			DM1+ MEK100	NSZ	P<0,05	NSZ	P<0,05
				DM1+ MEK200	NSZ	NSZ	NSZ
					DM1+ EK50	NSZ	NSZ
						DM1+ EK100	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Ocena statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.2.2.e., ukazuje da je veća srednja vrednost koncentracije albumina u krvnoj plazmi utvrđena kod grupe pacova koja je tri dana dana dobijala deksametazon, u odnosu na grupe kojima je tri

dana aplikovan deksametazonom, a četvrtog dana su tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM ($P < 0,05$), 100 ili 200 mg/kg TM ($P < 0,01$). Vrednost ovog parametra kod grupe DM1+FR je bila niža nego kod DM1+EK50, a veća nego kod ostalih ispitivanih grupa, ali je razlika bila značajna samo u odnosu na DM1+MEK100 ($P < 0,05$). Najmanja koncentracija albumina je zabeležena u grupi DM1+MEK100, a razlika između ove i vrednosti zabeleženih kod grupa DM1+MEK50, DM1+EK50 i DM1+EK200 je bila signifikantna ($P < 0,05$). Između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene male razlike, koje nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$).

5.2.3. Koncentracija fibrinogena u krvnoj plazmi (Fb g/L)

Rezultati određivanja koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi (g/L) pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i petroletarskog, hloroformskog, metanolnog i vodenog ekstrakta kukureka, u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokратne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) su prikazani u tabeli 5.2.3. U tabelama 5.2.3.a., 5.2.3.b., 5.2.3.c., 5.2.3.d. i 5.2.3.e. su prikazani rezultati analize statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena.

Tabela 5.2.3. Osnovni statistički parametri za koncentraciju fibrinogena (g/L) u krvnoj plazmi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	1,50	0,15	0,06	10,18	1,30-1,70
PEK 50	0,96	0,27	0,10	28,20	0,70-1,50
PEK 100	1,40	0,32	0,12	22,96	1,10-2,00
PEK 200	1,84	0,21	0,08	11,23	1,60-2,10
HEK 50	0,84	0,21	0,08	25,50	0,60-1,20
HEK 100	0,74	0,19	0,07	25,61	0,50-1,00
HEK 200	0,79	0,36	0,14	46,14	0,50-1,50
MEK 50	0,81	0,18	0,07	21,77	0,60-1,10
MEK 100	2,77	0,43	0,16	15,69	2,20-3,50
MEK 200	2,99	0,38	0,15	12,89	2,50-3,50
EK 50	1,60	0,23	0,09	14,43	1,30-1,90
EK 100	2,69	0,09	0,03	3,35	2,60-2,80
EK 200	3,91	0,48	0,18	12,20	3,40-4,60
DM1	1,36	0,24	0,09	17,47	1,00-1,60
DM1+FR	1,91	0,29	0,11	15,21	1,60-2,40
DM1+MEK50	4,03	1,02	0,39	25,38	3,00-5,90
DM1+MEK100	4,37	1,12	0,42	25,53	3,30-5,80
DM1+MEK200	2,43	0,43	0,16	17,90	1,80-3,00
DM1+EK50	4,64	0,93	0,35	20,08	3,70-6,30
DM1+EK100	2,80	0,35	0,13	12,54	2,50-3,50
DM1+EK200	3,76	1,00	0,38	26,65	3,00-5,80

Rezultati ispitivanja koncentracije fibrinogena (g/L) u krvnoj plazmi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom su prikazani u tabeli 5.2.3. Od grupa kojima je aplikovan samo različit ekstrakt kukureka, najniže vrednosti su utvrđene kod grupa tretiranih hloroformskim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM i iznosile su $0,84 \pm 0,21$ g/L, $0,74 \pm 0,19$ g/L i $0,79 \pm 0,36$ g/L, a najviše kod oglednih grupa 24h posle aplikacije po 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta ($2,99 \pm 0,38$ g/L) i vodenog ekstrakta ($3,91 \pm 0,48$ g/L). Vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi ostalih oglednih

grupa tretiranih ekstraktom kukureka su bile: $0,96 \pm 0,27$ g/L, $1,40 \pm 0,32$ g/L i $1,84 \pm 0,21$ g/L posle aplikacije 50, 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta, $0,81 \pm 0,18$ g/L i $2,77 \pm 0,43$ g/L nakon tretmana metanolnim ekstraktom u dozi 50 ili 100 mg/kg TM i $1,60 \pm 0,23$ g/L i $2,69 \pm 0,09$ g/L posle primene 50 ili 100 mg /kg TM vodenog ekstrakta. Grupa kojoj je trokratno aplikovan deksametazon je imala prosečnu koncentraciju fibrinogena $1,36 \pm 0,24$ g/L, a kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su iznosile: $1,91 \pm 0,29$ g/L (FR), $4,03 \pm 1,02$ g/L, $4,37 \pm 1,12$ g/L i $2,43 \pm 0,43$ g/L (MEK), $4,64 \pm 0,93$ g/L, $2,80 \pm 0,35$ g/L i $3,76 \pm 1,00$ g/L (EK).

Tabela 5.2.3.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije PEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	PEK 50	PEK 100	PEK 200
FR	P<0,001	NSZ	P<0,01
PEK 50	-	P<0,05	P<0,001
PEK 100	-	-	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Iz statističke analize prikazane u tabeli 5.2.3.a., može se zapaziti da je kontrolna grupa imala statistički značajno veću koncentraciju fibrinogena u plazmi u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,001$) i nižu vrednost u odnosu na grupu tretiranu sa 200 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,01$), dok viša koncentracija u odnosu na grupu koja je primila petroletarski ekstrakt u dozi od 100 mg/kg TM nije bila i statistički signifikantna ($P > 0,05$). Kod grupe PEK 200 je zabeležena statistički značajno veća vrednost ovog parametra u odnosu na ostale grupe tretirane petroletarskim ekstraktom, pri čemu je nivo značajnosti iznosio $P < 0,001$ (za grupu tretiranu sa 50 mg/kg TM ekstrakta) i $P < 0,05$ (za grupu tretiranu sa 100 mg/kg TM ekstrakta). Signifikantna razlika ($P < 0,05$) je ustanovljena između grupa PEK 50 i PEK 100, pri čemu je druga navedena grupa imala statistički značajno veću vrednost koncentracije fibrinogena u plazmi.

Tabela 5.2.3.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije HEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	HEK 50	HEK 100	HEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
HEK 50	-	NSZ	NSZ
HEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.2.3.b., ukazuje da je kontrolna grupa pacova imala statistički značajno veću srednju vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi u odnosu na grupe kojima su aplikovane različite doze hloroformskog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM), pri čemu je nivo značajnosti iznosio P<0,001. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između srednjih vrednosti ovog parametra u krvnoj plazmi oglednih grupa 24 posle primene hloroformskog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM (P>0,05).

Tabela 5.2.3.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	P<0,001	P<0,001
MEK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Vrednost koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe je bila statistički značajno manja u odnosu na ogledne grupa 24h posle aplikacije metanolnog ekstrakta u dozi od 100 ili 200 mg/kg TM i veća u poređenju sa grupom kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM ekstrakta, i to na nivou značajnosti od P<0,001. Ogledne grupe MEK 100 i MEK 200 su imale statistički signifikantno višu vrednost koncentracije fibrinogena u odnosu na grupu MEK 50 (P<0,001), dok mala razlika u vrednosti ovog parametra između prve dve navedene grupe nije bila značajna (P>0,05) (Tabela 5.2.3.c.).

Tabela 5.2.3.d. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	NSZ	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,001	P<0,001
EK 100	-	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Statistički visoko značajne razlike (P<0,001) u srednjim vrednostima koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi su uočene između oglednih grupa 24h posle aplikacije 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta u odnosu na kontrolnu grupu i grupu posle tretmana sa 50 mg/kg TM ekstrakta, pri čemu su veću vrednost imale prve dve navedene ogledne grupa, dok veća vrednost koncentracije fibrinogena u grupi EK 50 nije bila signifikantna u odnosu na kontrolnu grupu pacova (P>0,05). Grupa EK 200 je imala statistički značajno višu vrednost koncentracije fibrinogena u odnosu na grupu EK 100 (Tabela 5.2.3.d.).

Tabela 5.2.3.e. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
	DM1+ FR	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,01	P<0,001
		DM1+ MEK50	NSZ	P<0,01	NSZ	P<0,01	NSZ
			DM1+ MEK100	P<0,01	NSZ	P<0,01	NSZ
				DM1+ MEK200	P<0,001	NSZ	P<0,01
					DM1+ EK50	P<0,001	NSZ
						DM1+ EK100	P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize datih u tabeli 5.2.3.e. uočavaju se statistički značajno veće srednje vrednosti koncentracije fibrinogena kod grupa koje su nakon trokratne aplikacije deksametazona, tretirane fiziološkim rastvorom (P<0,01), metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM (P<0,001). Prosečna vrednost

ovog parametra kod pacova koji su nakon deksametazona dobili fiziološki rastvor, je bila značajno niža u odnosu na grupe koje su dobile ekstrakt kukureka, ali na različitom nivou značajnosti: $P < 0,001$ za DM1+MEK50, DM1+MEK100, DM1+EK50 i DM1+EK200, $P < 0,01$ za DM1+EK100 i $P < 0,05$ za DM1+MEK200. Grupa pacova kojoj je nakon deksametazona aplikovano 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala nešto veću koncentraciju fibrinogena u odnosu na grupu kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM istog ekstrakta ($P > 0,05$), a utvrđene vrednosti kod ove dve grupe su bile značajno više nego kod grupa DM1+MEK200 i DM1+EK100 (na nivou značajnosti $P < 0,01$), dok veće koncentracije u odnosu na DM1+EK200 i niže u odnosu na DM1+EK50 nisu bile signifikantne ($P > 0,05$). Najniža vrednost ovog parametra zabeležena u grupi DM1+MEK200 je bila značajno niža u odnosu na utvrđene vrednosti kod DM1+EK50 ($P < 0,001$) i DM1+EK200 ($P < 0,01$), dok razlika nije bila značajna u poređenju sa DM1+EK100 ($P > 0,05$). Najveća koncentracija fibrinogena je utvrđena u grupi DM1+EK50, pri čemu je razlika između ove i grupe DM1+EK100 bila visoko signifikantna ($P < 0,001$), a nije bila značajna u odnosu na DM1+EK200 ($P > 0,05$). Grupa DM1+EK200 je imala značajno veću prosečnu vrednost fibrinogena nego DM1+EK100 ($P < 0,05$).

5.2.4. Koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi (Hap g/L)

Vrednosti koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi (g/L) i mere varijacije ovog parametra, 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi pacova i 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne aplikacije deksametazona tri dana i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM), su prikazane u tabeli 5.2.4. Rezultati analize statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti koncentracije haptoglobina su dati u tabelama 5.2.4.a., 5.2.4.b. i 5.2.4.c.

Tabela 5.2.4. Osnovni statistički parametri za koncentraciju haptoglobina (g/L) u krvnoj plazmi kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	0,31	0,06	0,02	18,67	0,25-0,42
MEK 50	1,08	0,49	0,19	45,37	0,51-2,04
MEK 100	1,26	0,48	0,18	37,95	0,74-2,04
MEK 200	2,85	0,83	0,31	29,10	1,90-4,00
EK 50	1,61	0,49	0,18	30,18	0,83-2,22
EK 100	2,97	0,63	0,24	21,17	1,89-3,82
EK 200	3,12	0,56	0,21	17,94	2,34-4,11
DM1	2,13	1,34	0,51	63,17	0,53-4,12
DM1+FR	0,88	0,50	0,19	57,66	0,49-1,86
DM1+MEK50	2,81	1,06	0,40	37,93	1,72-4,30
DM1+MEK100	2,05	1,05	0,40	51,20	0,64-3,59
DM1+MEK200	0,74	0,44	0,17	58,90	0,21-1,23
DM1+EK50	3,05	0,96	0,36	31,48	1,60-4,60
DM1+EK100	1,69	0,48	0,18	28,18	1,05-2,49
DM1+EK200	2,86	1,37	0,52	48,01	1,72-5,60

U tabeli 5.2.4. su prikazane srednje vrednosti koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi pacova koje su 24h nakon aplikovanja 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta kukureka iznosile $1,08 \pm 0,49$ g/L, $1,26 \pm 0,48$ g/L i $2,85 \pm 0,83$ g/L, a $1,61 \pm 0,49$ g/L, $2,97 \pm 0,63$ g/L i $3,12 \pm 0,56$ g/L posle tretmana vodenim ekstraktom, dok je najniža koncentracija haptoglobina od $0,31 \pm 0,06$ g/L zabeležena kod kontrolne grupe. Ova vrednost je bila $2,13 \pm 1,34$ g/L posle trokratne primene deksametazona, a 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) prosečne vrednosti koncentracije haptoglobina su iznosile: $0,88 \pm 0,50$ g/L (FR), $2,81 \pm 1,06$ g/L, $2,05 \pm 1,05$ g/L i $0,74 \pm 0,44$ g/L (MEK), $3,05 \pm 0,96$ g/L, $1,69 \pm 0,48$ g/L i $2,86 \pm 1,37$ g/L (EK).

Tabela 5.2.4.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije MEK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	MEK 50	MEK 100	MEK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
MEK 50	-	NSZ	P<0,001
MEK 100	-	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Ogledne grupe kojima je aplikovan metanolni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su imale statistički značajno veću koncentraciju haptoglobina u krvnoj plazmi u odnosu na kontrolnu grupu (P<0,001). Uočena je veća koncentracija haptoglobina kog grupe MEK 100 u odnosu na grupu MEK 50, ali ta razlika nije bila statistički signifikantna (P>0,05). Zabeležena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod grupe tretirane sa 200 mg/kg TM ekstrakta u odnosu na grupe kojima je aplikovano 50 ili 100 mg/kg TM metanolnog ekstrakta kukureka i to na nivou značajnosti od P<0,001 (Tabela 5.2.4.a.).

Tabela 5.2.4.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi kontrolne grupe i posle aplikacije EK (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	EK 50	EK 100	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001	P<0,001
EK 50	-	P<0,001	P<0,001
EK 100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije haptoglobina ispitivanih grupa, prikazanih u tabeli 5.2.4.b., uočava se da je ta vrednost bila značajno veća u oglednim grupama 24h posle aplikacije vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu fiziološkim rastvorom, i to na nivou značajnosti od P<0,001. Niža prosečna koncentracije haptoglobina u krvnoj plazmi pacova, ustanovljena je 24h nakon primene 50 mg/kg TM ekstrakta u odnosu na ovu vrednost kod pacova tretiranih sa 100 ili 200 mg/kg TM ekstrakta, a razlika je bila visoko signifikantna (P<0,001). Mala razlika u vrednostima ovog parametra između grupa EK 100 i EK 200 nije bila statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.2.4.c. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti koncentracije haptoglobina 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM)

	DM1+ FR	DM1+ MEK50	DM1+ MEK100	DM1+ MEK200	DM1+ EK50	DM1+ EK100	DM1+ EK200
DM1 (3 dana)	P<0,05	NSZ	NSZ	P<0,05	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ FR		P<0,001	P<0,01	NSZ	P<0,001	P<0,05	P<0,001
DM1+ MEK50			NSZ	P<0,001	NSZ	P<0,05	NSZ
DM1+ MEK100				P<0,01	NSZ	NSZ	NSZ
DM1+ MEK200					P<0,001	P<0,01	P<0,01
DM1+ EK50						P<0,01	NSZ
DM1+ EK100							P<0,05

NSZ – nije statistički značajno

Rezultati analize prikazani u tabeli 5.2.4.c. ukazuju na statistički značajno veću koncentraciju haptoglobina u krvnoj plazmi pacova posle trokratne aplikacije deksametazona, u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona jednokratno tretirane fiziološkim rastvorom ili sa 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta (P<0,05). Grupa DM1 je imala veću vrednost ovog parametra nego grupe DM1+MEK100 i DM1+EK100, a nižu vrednost nego grupe DM1+MEK50, DM1+EK50 i DM1+EK200, ali razlike nisu bile signifikantne (P>0,05). Prosečna koncentracija haptoglobina kod pacova koji su nakon deksametazona dobili fiziološki rastvor, bila je značajno niža u odnosu na grupe DM1+MEK50, DM1+EK50 i DM1+EK200 (na nivou značajnosti od P<0,001), DM1+MEK100 (na nivou značajnosti od P<0,01) i DM1+EK100 (na nivou značajnosti od P<0,05), a viša nego kod grupe DM1+MEK200, ali razlika nije bila značajna. Najveća srednja vrednost koncentracije haptoglobina je utvrđena u grupi DM1+EK50, pri čemu je razlika između ove i grupe DM1+MEK200 bila visoko signifikantna (P<0,001). U odnosu na grupu tretiranu sa 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka razlika je bila na nižem nivou značajnosti (P<0,01), a nije bila značajna u odnosu na DM1+MEK50, DM1+MEK100 i DM1+EK200 (P>0,05). Najniža vrednost ovog parametra je zabeležena u grupi DM1+MEK200 i ta vrednost je značajno niža u odnosu na utvrđene vrednosti kod DM1+MEK50 (P<0,001), DM1+MEK100, DM1+EK100 i DM1+EK200 (P<0,01). Koncentracija haptoglobina kod DM1+MEK50 je bila veća u

odnosu na DM1+MEK100 ($P>0,05$) i DM1+EK100 ($P<0,05$), a niža nego kod DM1+EK200 ($P>0,05$). Nije utvrđena statistički značajna razlika između vrednosti ovog parametra zabeležene u grupi DM1+MEK100 u odnosu na nižu vrednost kod DM1+EK100 i veću kod DM1+EK200 ($P>0,05$), dok je između poslednje dve navedene grupe utvrđena signifikantna razlika ($P<0,05$), pri čemu je veća koncentracija haptoglobina utvrđena kod grupe koja je tretirana većom dozom vodenog ekstrakta.

5.3.REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIJA NEUTROFILNIH GRANULOCITA

5.3.1. Stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita (%)

Rezultati ispitivanja stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka ogleđnim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne primene deksametazona tri dana uzastopno i 24h nakon trokратne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi od 100 mg/kg TM su prikazani u tabeli 5.3.1. Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita je data u tabelama 5.3.1.a. i 5.3.1.b.

Tabela 5.3.1. Osnovni statistički parametri za stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita (%) kontrolne grupe i grupa tretiranih metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka ili deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	43,68	6,65	2,51	15,21	35,61-52,48
MEK 200	91,95	3,79	1,43	4,12	85,14-96,01
EK 200	82,95	9,43	3,57	11,37	63,57-90,41
DM1	68,78	10,47	3,96	15,22	56,61-83,76
DM1+FR	81,00	11,35	4,29	14,01	64,23-90,57
DM1+MEK100	89,07	3,41	1,29	3,83	84,29-94,00
DM1+EK100	88,70	2,27	0,86	2,55	85,68-92,32

Rezultati prikazani u tabeli 5.3.1. ukazuju da je srednja vrednost stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita u krvi pacova kontrolne grupe iznosila $43,68 \pm 6,65\%$,

a posle aplikacije 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka ove vrednosti su bile $91,95 \pm 3,79\%$ i $82,95 \pm 9,43\%$. Grupa kojoj je trokratno aplikovan deksametazon je imala prosečan stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita od $68,78 \pm 10,47\%$, a kod grupa koje su tri dana tretirane deksametazonom, a četvrtog dana su primile fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi od 100 mg/kg TM zabeležene vrednosti ovog parametra su iznosile: $81,00 \pm 11,35\%$, $89,07 \pm 3,41\%$ i $88,70 \pm 2,27\%$.

Tabela 5.3.1.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i posle aplikacije 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta

	MEK 200	EK 200
FR	P<0,001	P<0,001
MEK 200	-	P<0,05

Iz rezultata analize statističke značajnosti razlika prikazane u tabeli 5.3.1.a. uočava se da je statistički značajno veći stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita bio u krvi kod pacova oglednih grupa tretiranih metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi od 200 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu, i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Statistički značajno veća vrednost ovog parametra je utvrđena kod grupe MEK 200 u odnosu na grupu EK 200 ($P < 0,05$).

Tabela 5.3.1.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta

	DM1+FR	DM1+MEK100	DM1+EK100
DM1	P<0,05	P<0,001	P<0,001
DM1+FR	-	NSZ	NSZ
DM1+MEK100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Signifikantno veće srednje vrednosti stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita, u odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, imale su grupe dodatno tretirane fiziološkim rastvorom ($P < 0,05$), metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM ($P < 0,001$). Prosečna vrednost ovog parametra kod pacova koji su nakon deksametazona dobili fiziološki rastvor je bila niža u odnosu na grupe kojima je aplikovan ekstrakt kukureka, ali utvrđene razlike između pojedinih grupa nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$).

5.3.2. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%)

U tabeli 5.3.2. su prikazani rezultati ispitivanja intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova 24h nakon intramuskularne aplikacije fiziološkog rastvora kontrolnoj grupi i 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka oglednim grupama, kao i 24h nakon intramuskularne primene deksametazona tri dana uzastopno i 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi od 100 mg/kg TM. Rezultati analize statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita su dati u tabelama: 5.3.2.a. i 5.3.2.b.

Tabela 5.3.2. Osnovni statistički parametri za intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%) kontrolne grupe i grupa tretiranih metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

No	\bar{x}	SD	SE	CV %	IV
FR	32,44	8,53	3,23	26,30	20,28-42,45
MEK 200	66,33	11,63	4,40	17,54	50,09-79,76
EK 200	37,44	11,29	4,27	30,15	28,61-62,47
DM1	33,46	6,57	2,48	19,64	25,77-42,85
DM1+FR	52,57	18,64	7,04	35,45	25,49-68,13
DM1+MEK100	51,35	20,50	7,75	39,92	33,06-81,29
DM1+EK100	49,68	7,74	2,93	15,58	42,11-65,27

Srednja vrednost intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe pacova je iznosila $32,44 \pm 8,53\%$, a veće vrednosti su zabeležene u grupama 24h posle tretmana sa 200 mg/kg TM metanolnog ($66,33 \pm 11,63\%$) ili vodenog ekstrakta ($37,44 \pm 11,29\%$). Posle trokratne aplikacije deksametazona vrednost ovog parametra je bila $33,46 \pm 6,57\%$, a 24h nakon injekcija deksametazona tokom tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta prosečne vrednosti intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita su iznosile: $52,57 \pm 18,64\%$, $51,35 \pm 20,50\%$ i $49,68 \pm 7,74\%$ (Tabela 5.3.2.).

Tabela 5.3.2.a. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita kontrolne grupe i posle aplikacije 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta

	MEK 200	EK 200
FR	P<0,001	NSZ
MEK 200	-	P<0,001

NSZ – nije statistički značajno

Iz analize izložene u tabeli 5.3.2.a., zapaža se da je značajno veća srednja vrednost intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita bila u krvi pacova 24h nakon aplikacije 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta, u odnosu na ove vrednosti kod kontrolne grupe i grupe tretirane sa 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta (P<0,001). Prosečan intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita je bio veći kod grupe EK 200 nego kod grupe tretirane fiziološkim rastvorom, ali razlika ovih vrednosti nije statistički značajna (P>0,05).

Tabela 5.3.2.b. Analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, 100 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta

	DM1+FR	DM1+MEK100	DM1+EK100
DM1	P<0,05	P<0,05	P<0,05
DM1+FR	-	NSZ	NSZ
DM1+MEK100	-	-	NSZ

NSZ – nije statistički značajno

Analiza statističke značajnosti razlika prikazana u tabeli 5.3.2.b., ukazuje da je u odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, srednja vrednost intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita bila značajno veća kod grupa koje su nakon deksametazona tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM, na nivou značajnosti od P<0,05. Male razlike u vrednostima ovog parametra kod grupa koje su dodatno tretirane, nisu bile signifikantne (P>0,05).

6. DISKUSIJA

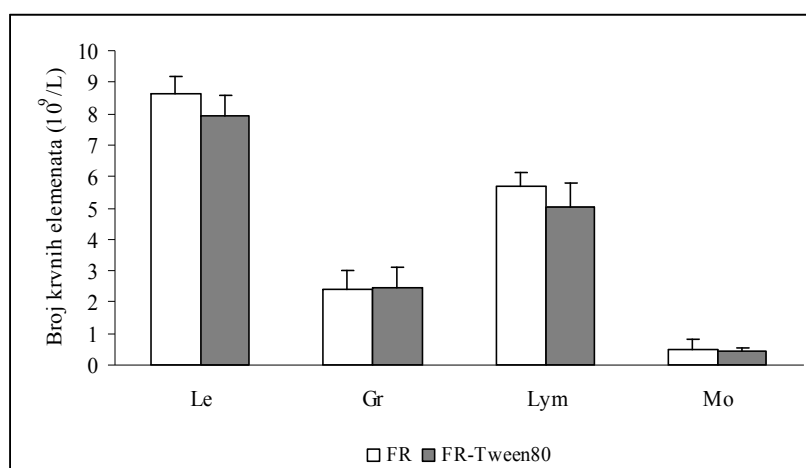
Široka primena biljnih vrsta roda *Helleborus* L. kod različitih indikacija u narodnoj tradicionalnoj, etnoveterinarskoj i konvencionalnoj medicini, ukazuje da njihov biohemijski profil predstavlja značajan izvor sekundarnih metabolita, koji zavisno od uslova, ispoljavaju višestruke efekte i deluju u više pravaca (imunomodulatorno - stimulatorno ili supresivno, proinflamatorno ili antiinflamatorno, antioksidativno ili prooksidativno, antimikrobno, antineoplastično, insekticidno, utiču na metabolizam, koncentraciju proteina akutne faze i status elektrolita krvnog seruma). Poslednjih godina, učinjen je značajan napredak u izolaciji i identifikaciji bioaktivnih jedinjenja ovih biljaka, ali su još uvek nedovoljno ispitane ili nepoznate doze, načini i mehanizmi delovanja novootkrivenih jedinjenja na živi organizam. Zadatak ove disertacije je bio da se u eksperimentalnim uslovima ispita *in vivo* aktivnost sastojaka rizoma i korena kukureka *H. odoratus* W. et K. kod Wistar pacova. Ispitivanje je izvršeno serijom ogleada, u kojima su intramuskularno aplikovani petrolearski, hloroformski, metanolni i vodeni ekstrakt u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) i praćen je njihov efekat posle 24h. Takođe je ispitivan i uticaj vodenog i metanolnog ekstrakta kukureka aplikovanih 24h nakon trokrotnog tretmana pacova deksametazonom, na uočene efekte. U okviru ovog poglavlja su razmotreni rezultati dobijeni određivanjem vrednosti hematoloških parametara, koncentracije proteina akutne faze i funkcija neutrofilnih granulocita (stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska), sa posebnim naglaskom na stepen statističke značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti registrovanih u pojedinim eksperimentalnim grupama. Ti rezultati su zatim upoređivani međusobno, kao i sa rezultatima drugih autora koji su se bavili ovom problematikom. Radi bolje preglednosti, poglavlje diskusija je u podeljeno u više podpoglavlja, shodno postavljenim istraživačkim zadacima.

6.1. HEMATOLOŠKA ISPITIVANJA

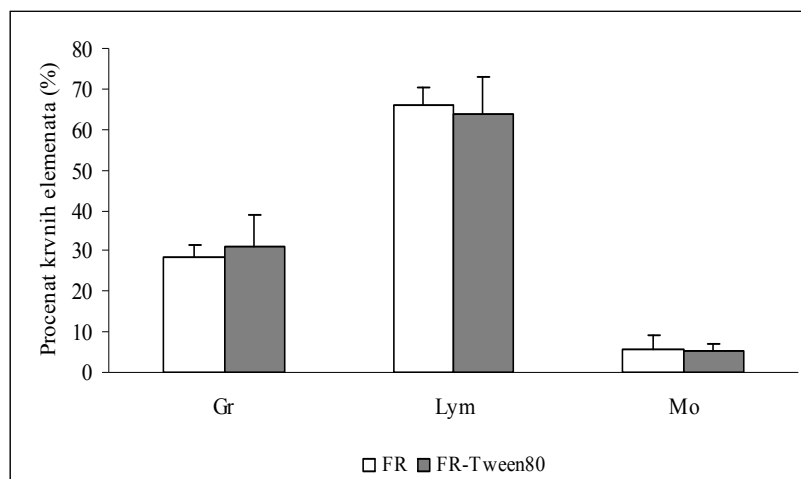
6.1.1. Osnovni hematološki parametri i parametri akutne zapaljenske reakcije 24h nakon aplikovanja fiziološkog rastvora i 0,5% rastvora Tween 80

U preliminarnim ispitivanjima, u cilju određivanja uticaja inertne, površinski aktivne materije Tween 80 koja se dodaje u fiziološki rastvor pri rastvaranju petroletarskog, hloroformskog i metanolnog ekstrakta (0,5% rastvor Tween 80 u fiziološkom rastvoru), na efikasnost tretmana, pacovima jedne grupe je IM u zadnji ekstremitet aplikovan sterilan fiziološki rastvor u količini od 2,5 ml/kg TM (odgovara zapremini aplikovanog ekstrakta podzemnih organa kukureka), a pacovima druge grupe je na isti način i u istoj dozi aplikovan 0,5% rastvor Tween 80 (grupa FR-Tween80). Analiza osnovnih hematoloških parametara i parametara akutne zapaljenske reakcije je izvršena posle 24h.

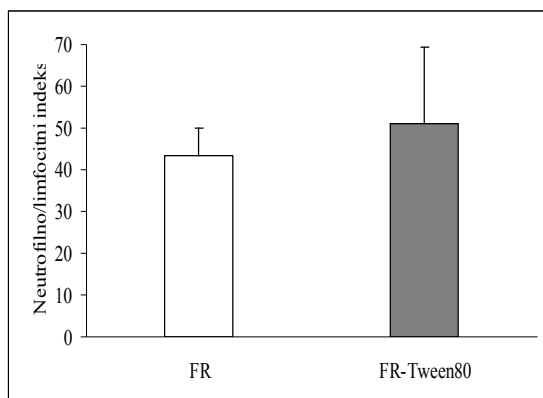
U krvi pacova 24 posle tretmana fiziološkim rastvorom u odnosu na grupu FR-Tween80, zabeležene su veće prosečne vrednosti broja ukupnih leukocita, broja i procenta limfocita, broja i procenta monocita, broja eritrocita i trombocita, hematokritske vrednosti i niže prosečne vrednosti broja i procenta neutrofilnih granulocita, neutrofilno/limfocitnog indeksa i koncentracije hemoglobina. Razlike između srednjih vrednosti osnovnih hematoloških parametra registrovanih u pojedinim grupama životinja nisu bile statistički signifikantne ($P > 0,05$) (Grafikoni 6.1.1.A.-G.).



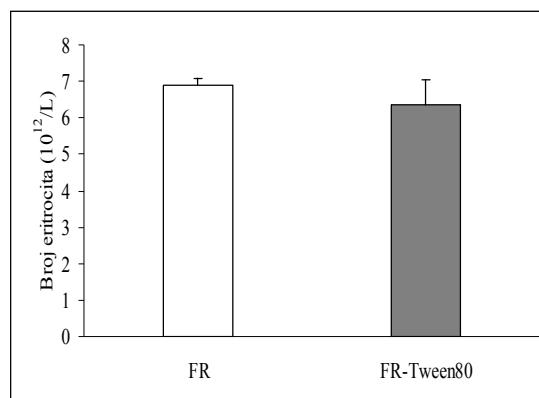
Grafikon 6.1.1.A. Broj ukupnih leukocita, neutrofilnih granulocita, limfocita i monocita ($10^9/L$) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80



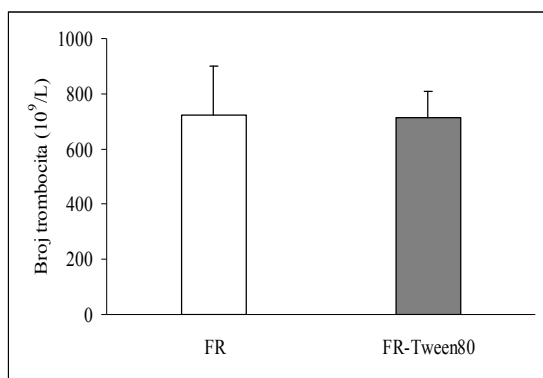
Grafikon 6.1.1.B. Procenat neutrofilnih granulocita, limfocita i monocita (%) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80



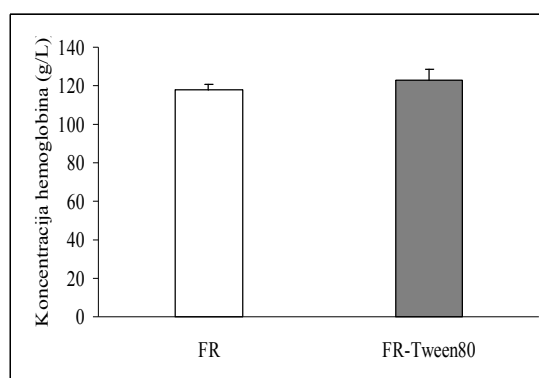
Grafikon 6.1.1.C. Neutrofilno/limfocitni indeks 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80



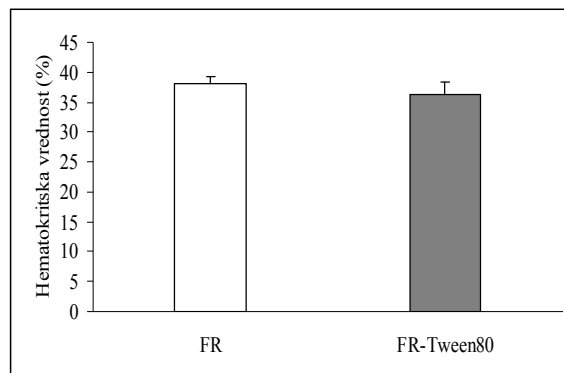
Grafikon 6.1.1.D. Broj eritrocita (10¹²/L) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80



Grafikon 6.1.1.E. Broj trombocita (10⁹/L) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80

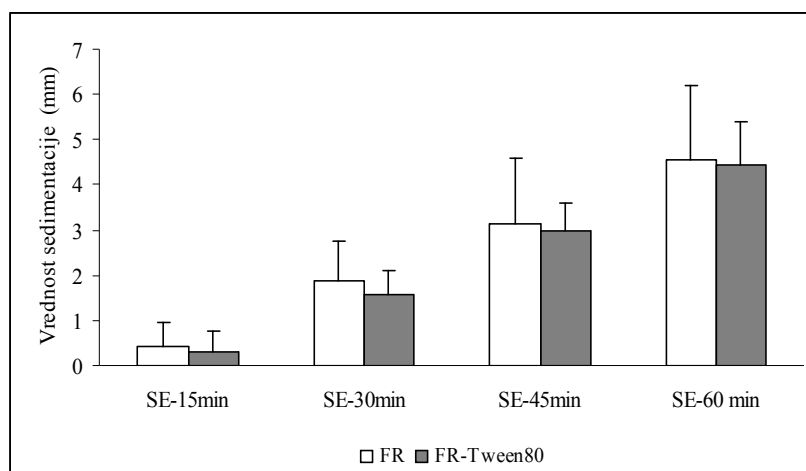


Grafikon 6.1.1.F. Koncentracija hemoglobina (g/L) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80

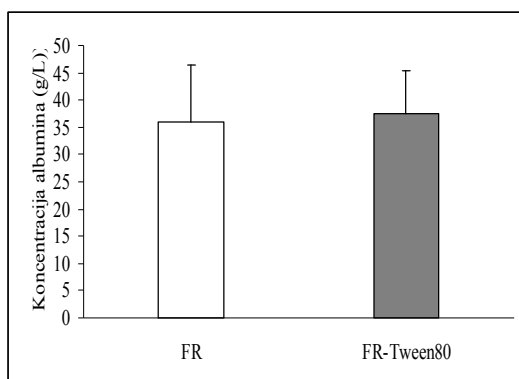


Grafikon 6.1.1.G. Hematokritska vrednost (%) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80

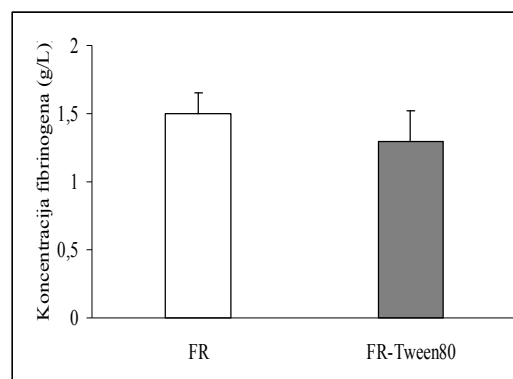
Grupa FR-Tween 80 je imala manje srednje vrednosti svih parametara akutne zapaljenske reakcije, osim koncentracije albumina, u odnosu na kontrolnu grupu posle aplikacije fiziološkog rastvora, ali između navedenih grupa nije uočena statistički značajna razlika u ovim vrednostima ($P > 0,05$) (Grafikoni 6.1.1.H.-J.).



Grafikon 6.1.1.H. Vrednost sedimentacije posle 15, 30, 45 i 60 min (mm) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80



Grafikon 6.1.1.I. Koncentracija albumina (g/L) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80

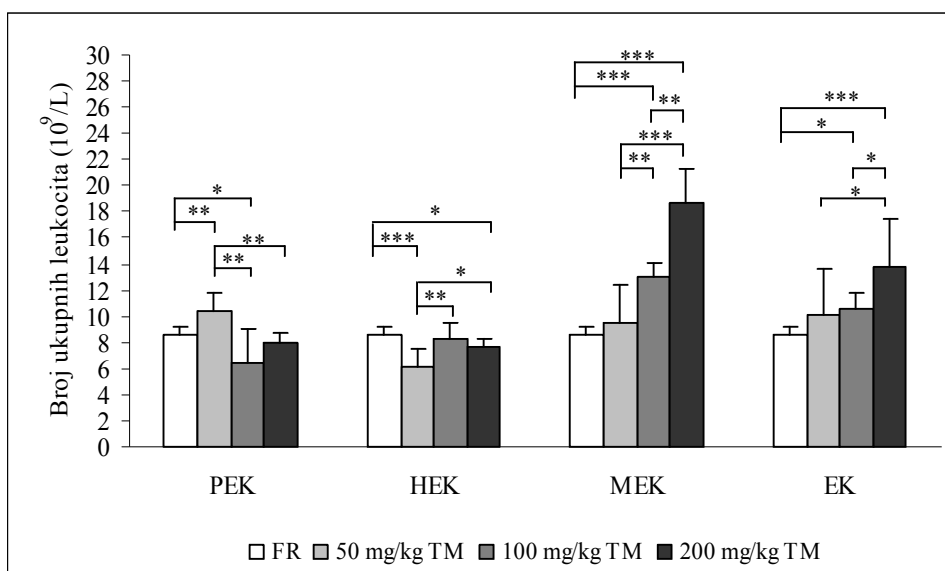


Grafikon 6.1.1.J. Koncentracija fibrinogena (g/L) 24h posle aplikacije FR i FR-Tween 80

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da Tween 80 (0,5% rastvor Tween 80 u fiziološkom rastvoru) ne dovodi do statistički značajnih razlika u vrednostima ispitivanih parametara u odnosu na grupu kojoj je aplikovan fiziološki rastvor, pa je u daljem radu korišćen samo fiziološki rastvor u tretmanu životinja kontrolne grupe.

6.1.2. Broj ukupnih leukocita (Le)

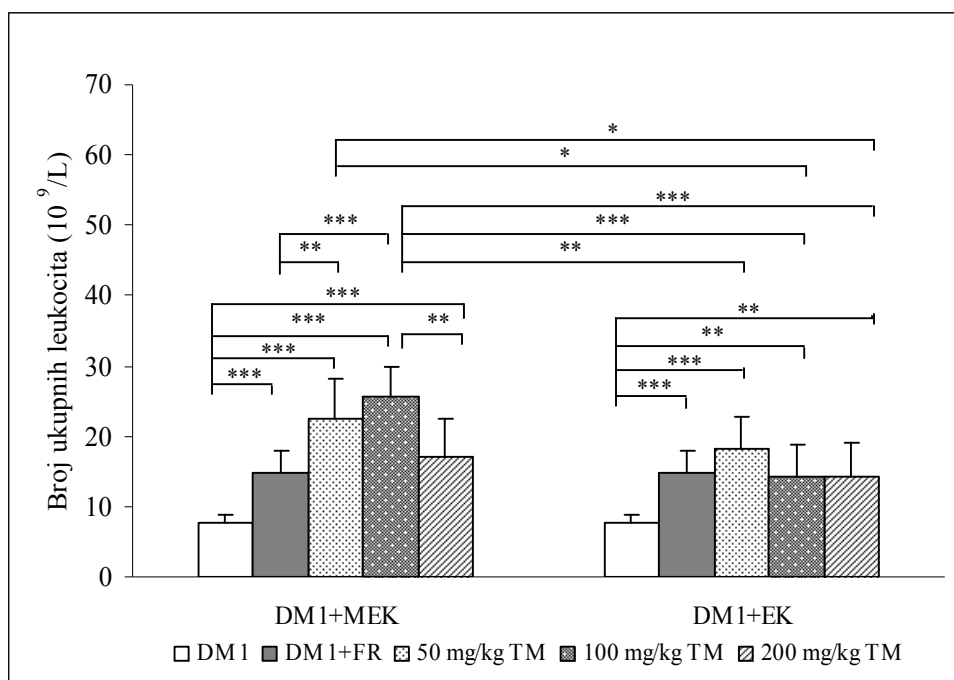
Prosečan broj ukupnih leukocita u krvi kontrolne grupe je bio $8,61 \pm 0,57 \times 10^9/L$, a kod eksperimentalnih grupa pacova jednokratno tretiranih petroletarskim i hloroformskim ekstraktom različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM), metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka u dozi 50 mg/kg TM, ovaj broj se kretao od $6,13 \pm 1,36 \times 10^9/L$ u grupi HEK 50 do $10,48 \pm 1,23 \times 10^9/L$ u grupi PEK 50. Utvrđene razlike između pojedinih grupa su bile na različitim nivoima značajnosti, od $P < 0,05$ do $P < 0,001$. Ove vrednosti su bile značajno veće posle aplikovanja 100 ($P < 0,001$ i $P < 0,05$) i 200 mg/kg TM ($P < 0,001$) metanolnog i vodenog ekstrakta u poređenju sa kontrolnom grupom. Prosečan broj leukocita u krvi pacova se povećavao sa koncentracijom aplikovanog metanolnog i vodenog ekstrakta ($P < 0,05$ do $P < 0,001$) (Grafikon 6.1.2.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.2.A. Broj ukupnih leukocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Značajan porast broja leukocita je zabeležen 24h nakon trokratne aplikacije deksametazona i jednokratne primene fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) četvrtog dana, a razlike su bile statistički vrlo i visoko signifikantne u odnosu na grupu koja je tri dana tretirana deksametazonom ($P<0,01$ i $P<0,001$). Utvrđena je viša srednja vrednost ukupnog broja leukocita u krvi pacova grupa DM1+MEK50, DM1+MEK100, DM1+MEK200 i DM1+EK50 u odnosu na DM1+FR, pri čemu je razlika bila statistički značajna u odnosu na prve dve navedene grupe ($P<0,01$ odn. $P<0,001$). Grupa DM1+MEK100 je imala najveći broj leukocita ($25,53\pm 4,27\times 10^9/L$), a nivo značajnosti razlika u odnosu na ostale ogledne grupe je iznosio $P<0,01$ (u odnosu na DM1+MEK200 i DM1+EK50) i $P<0,001$ (u odnosu na DM1+EK100 i DM1+EK200). Značajno veća vrednost ovog parametra je zabeležena i u grupi DM1+MEK50 u poređenju sa grupama tretiranim sa 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P<0,05$) (Grafikon 6.1.2.B.).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Grafikon 6.1.2.B. Broj ukupnih leukocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Utvrđene vrednosti broja ukupnih leukocita kod kontrolne grupe i kod oglednih grupa tretiranih hloroformskim i petroletarskim ekstraktom su u fiziološkim granicama i u saglasnosti sa referentnim vrednostima koje za ovu kategoriju pacova navode Jain

(1993) $(8,30 \pm 2,36 \times 10^9/L)$, Moore (2000) $(8,543 \pm 2,231 \times 10^9/L$ za mužjake i $7,1 \pm 2,423 \times 10^9/L$ za ženke), Pritchett i sar. (2004) $(4-10,20 \times 10^9/L)$ i Liberati i sar. (2004) $(4,12-9,59 \times 10^9/L)$. Značajan porast broja ukupnih leukocita 24h posle aplikacije metanolnog i vodenog ekstrakta podzemnih organa kukureka je u skladu sa navodima iz literature. Bogdan i sar. (1989, 1990-a) su uočili izraženu leukocitozu 24h nakon implantiranja rizoma *Helleborus* sp. različitim vrstama domaćih životinja: srednji broj leukocita je bio značajno povećan ($P < 0,01$) kod konja (260%), ovaca (388%) i svinja (270%), dok povećanje broja leukocita kod goveda (54%) nije bilo statistički značajno. U grupi goveda sa placebo implantatom (prazna mina hemijske olovke) ova vrednost se nije promenila, dok je kod konja, ovaca i svinja u placebo grupama (šibica) zabeleženo povećanje od 135%, 33% i 66%. Povećanje broja leukocita 48h, 96h i 144h posle aplikovanja implantata kukureka nije bilo statistički značajno kod ispitivanih životinja sa izuzetkom konja, kod kojih se broj leukocita značajno povećao posle 144h ($P < 0,01$) usled formiranja apscesa. Ovako neznatno povećanje broja leukocita u krvi pacova 48h i 72h posle aplikacije 10 mg/100 g TM vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odoratus* W. et K. registrovali smo u svom prethodnom radu (Davidović i sar., 2010-b). Ispitivanja koja su izveli Bogdan i sar. (1990-b) su takođe ukazala na leukocitozu 24h nakon implantacije rizoma *H. purpurascens* L. u ušnu školjku ovaca (povećanje ukupnog broja leukocita za 67,2%) i 24h posle SC aplikovanja tri varijante ekstrakta ove biljke: 4% dekokta rizoma i korena, 4% ekstrakta saponozida i 1% dekokta podzemnih organa razblaženog 200 puta, kada je zabeležen porast broja leukocita za 36,6%, 57,1% i 25,4%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim rezultatima i rezultatima koje su publikovali Bolte i sar. (1992). Oni su utvrdili pozitivan efekat SC ili IM primenjenog ekstrakta *Helleborus* sp. u količini od 0,2 odn. 0,3 ml, na pojavu inflamatorne reakcije kod pacova, koja se na delu oko mesta uboda manifestovala nakon 24h pojavom edema i tačkastim krvarenjima u trajanju od 12-24 dana, dok je kod konja proinflamatorno delovanje kukureka bilo još izraženije.

Bolte i sar. (1992) su registrovali da prečišćeni ekstrakt *Helleborus* sp. potencira postvakcinalni imunski odgovor, aktiviranjem kako specifičnih (porast titra antitela), tako i nespecifičnih (povećanje broja leukocita, koncentracije properdina i lizozima) mehanizama odbrane. Pojava leukocitoze kod teladi kojoj je istovremeno sa vakcinom protiv salmoneloze SC aplikovano i 0,5 ml rastvora ekstrakta kukureka ukazala je na

imunomodulatorno delovanje korena *Helleborus* L. Eksperiment koji su Bolte i sar. (2001) nešto kasnije ponovili na teladima i junadima, potvrdio je značajan porast broja leukocita 7., 14. i 21. dana od aplikacije ekstrakta kukureka.

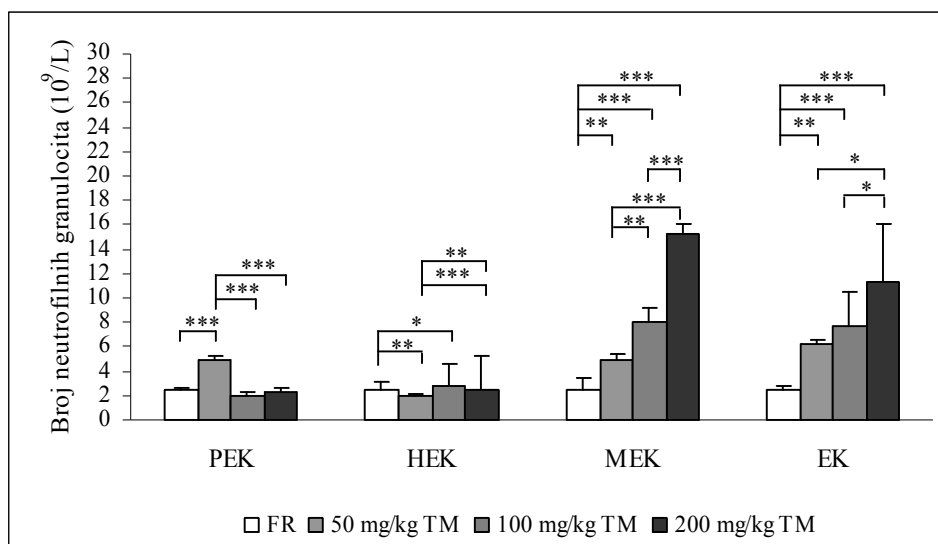
Naši rezultati, dobijeni na pacovima, su u skladu sa rezultatima Bogdana i sar. (1993), koji su konstatovali izraženu leukocitozu (uvećanje broja leukocita 2-3 puta), značajnu za povećanje antimikrobne zaštite, u grupi toвне jagnjadi tretiranoj ekstraktom podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K., dok je u kontrolnoj grupi zabeležen rast ove vrednosti za 56%. Izraženu leukocitozu je zabeležio i Nueleanu (2007, 2008) kod ovaca, u starosti od 12 meseci, 24h, 48h i 96h nakon subkutanog aplikovanja po 0,5 ml 3%, 4% ili 5% dekokta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K., a najveći porast ukupnog broja leukocita je utvrđen nakon 48h (47,9%, 84,4% i 99,1%). Tosevski i sar. (1999, 2004) su parenteralno primenili ekstrakt cele biljke *H. odorus* W. et K. u dozi od 0,450 mg/kg TM kod prasadi uzrasta od 35 dana i registrovali povećanje broja leukocita u krvi nakon 7 dana za 1,56 puta i posle 14 dana za 1,47 puta, dok je povećanje ove vrednosti kod prasadi u starosti od 52 dana bilo za 24% posle 14 dana i za 8,2% posle 21 dana od aplikovanja ekstrakta. Visoke vrednosti broja ukupnih leukocita utvrđene u našem ogledu posle aplikacije metanolnog ili vodenog ekstrakta kukureka pacovima, mogu se uporediti sa rezultatima Ristoske (2002) i Ristoske i sar. (2002), koji su nakon aplikacije ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. nazimicama u periodu polne zrelosti, u dozi od 450 µg/kg TM, takođe zabeležili statistički visoko značajan porast ($P < 0,001$) vrednosti broja ukupnih leukocita u odnosu na referentne vrednosti (54% veći od maksimalne vrednosti za ovu kategoriju svinja).

Značajnu leukocitozu ($P < 0,05$) navode Milanović i sar. (2004) kod pacova soja Wistar, 24h nakon aplikovanja vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. razređenog fiziološkim rastvorom u odnosu 1:2. Povećanje broja leukocita i aktivacija brzih, nespecifičnih mehanizama odbrane u saglasnosti su sa našim prethodnim ispitivanjima subkutane, intraperitonealne i intramuskularne primene različitih koncentracija vodenog ekstrakata rizoma i korena *H. odorus* W. et K. (Davidović i sar., 2006-a,b, 2007-a, 2010-a,b). Prosečan broj leukocita u krvi pacova kontrolne grupe i oglednih grupa 24h posle aplikacije termički tretiranih ekstrakata (inaktivisanog na 56 °C 30 min ili denaturisanog na 100 °C 5 min) ili dijalizata ekstrakta je bio ujednačen,

tako da između njih nisu utvrđene statistički značajne razlike (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-a).

6.1.3. Broj neutrofilnih granulocita (Gr)

U svim ogleđnim grupama pacova kojima je aplikovan petroletarski, hloroformski, metanolni ili vodeni ekstrakt kukureka u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM (osim PEK 100, PEK 200 i HEK 50) je registrovana veća vrednost broja neutrofilnih granulocita u krvi u odnosu na kontrolnu grupu ($2,43 \pm 0,26 \times 10^9/L$), na različitom nivou značajnosi (od $P < 0,05$ do $P < 0,001$). Povećanje prosečnog broja neutrofilnih granulocita je bilo srazmerno dozi metanolnog i vodenog ekstrakta aplikovanog pacovima (Grafikon 6.1.3.A).

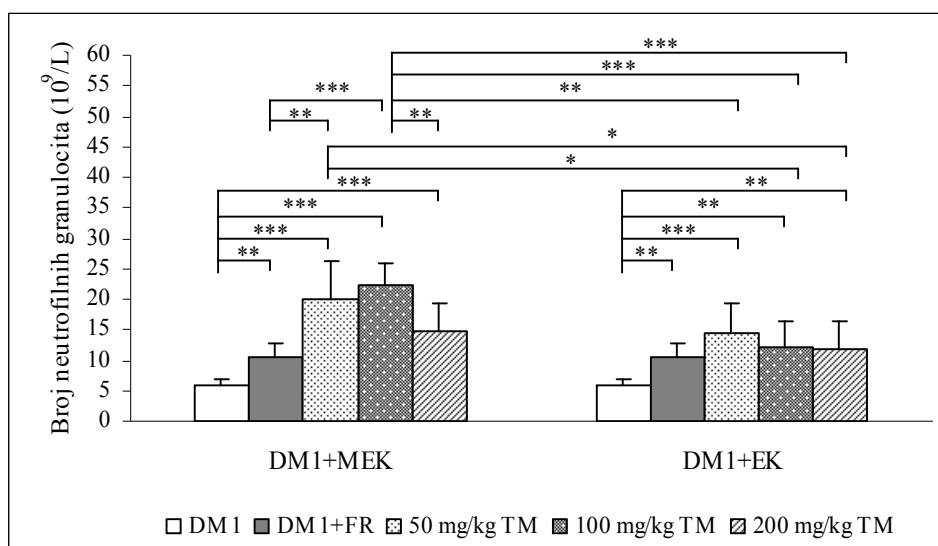


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.3.A. Broj neutrofilnih granulocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Veće vrednosti ovog parametra su zabeležene 24h nakon aplikacije deksametazona tri dana i fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta u različitim dozama (50, 100 ili 200 mg/kg TM) četvrtog dana, u odnosu na grupu koja je tri dana tretirana deksametazonom ($5,92 \pm 1,09 \times 10^9/L$), a razlike su bile statistički vrlo i visoko signifikantne ($P < 0,01$ i $P < 0,001$). Utvrđena je viša srednja vrednost broja neutrofilnih granulocita u krvi pacova svih grupa koje su nakon deksametazona dobile metanolni ili vodeni ekstrakt, u odnosu na grupu DM1+FR ($10,49 \pm 2,34 \times 10^9/L$), pri

čemu je razlika bila statistički značajna u poređenju sa DM1+MEK50 ($P<0,01$) i DM+MEK100 ($P<0,001$). Razlike najvećih vrednosti zabeleženih u grupama DM1+MEK50 ($20,10\pm5,97\times 10^9/L$) i DM1+MEK100 ($22,24\pm3,64\times 10^9/L$) su bile signifikantne u poređenju sa većinom preostalih grupa ($P<0,05$ do $P<0,001$) (Grafikon 6.1.3.B).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Grafikon 6.1.3.B. Broj neutrofilnih granulocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Kao referentne vrednosti za broj neutrofilnih granulocita u krvi pacova Jain (1993) navodi granicu od $2,07\pm1,04\times 10^9/L$, Pritchett i Corning (2004) $1,3-3,6\times 10^9/L$, dok Liberati i sar. (2004) daju nešto niže vrednosti od $0,39-1,48\times 10^9/L$. U našem ogledu, broj neutrofilnih granulocita u krvi pacova kontrolne grupe je bio $2,43\pm0,26\times 10^9/L$, što je u skladu sa vrednostima koje iznose prve dve navedene grupe autora. U okviru fizioloških vrednosti je i srednji broj neutrofilnih granulocita zabeležen u grupama kojima su aplikovane različite doze petroletarskog (osim PEK 50) i hloroformskog ekstrakta, dok su kod ostalih grupa utvrđene vrednosti veće od referentnih.

Bogdan i sar. (1989, 1990-a) su zabeležili značajno povećanje broja neutrofilnih granulocita, kod svih vrsta životinja, 24h posle implantacije rizoma *Helleborus* sp., što je u skladu sa našim rezultatima. Kod goveda je uprkos neznatnom povećanju broja leukocita, došlo do značajnog porasta broja neutrofilnih granulocita (244%) posle 24h i

48h i to na nivou značajnosti od $P < 0,01$, što ukazuje na apsolutnu neutrofiliju. Nakon 96h povećanje je bilo na nivou značajnosti od $P < 0,05$, dok je kod kontrolne grupe goveda zabeležen mali pad. Broj neutrofilnih granulocita je kod konja bio značajno povećan posle 24h ($P < 0,01$), 48h i 144h ($P < 0,05$), u proseku za 599%. Kod ovaca je u poređenju sa drugim vrstama životinja zabeležena najveća stimulacija (710%), ali samo posle 48h ($P < 0,05$). Statistički značajno povećanje broja neutrofilnih granulocita (693%) je utvrđeno kod svinja samo posle 24h i to na nivou značajnosti od $P < 0,01$. U kontrolnoj grupi konja broj neutrofilnih granulocita se povećao za 132%, u placebo grupi ovaca za 75% i placebo grupi svinja za 68%. Rezultati Bogdana i sar. (1990-b) su slični našim rezultatima i ukazali su da promene u broju neutrofilnih granulocita prate dinamiku promena u broju leukocita kod ovaca. Ovi autori su uočili povećanje broja neutrofilnih granulocita za 195,4% 24h nakon implantiranja rizoma *H. purpurascens* L. u ušnu školjku ovaca, za 126,3%, 87% i 42,3% 24h posle subkutanog aplikovanja 4% dekokta rizoma i korena u ušnu školjku, 4% ekstrakta saponozida u ušnu školjku i 1% dekokta podzemnih organa ove biljke rastvorenog 200 puta sa unutrašnje strane bedra.

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima koje su proučavajući efekat ekstrakta podzemnih organa *Helleborus* sp. na postvakcinalni imunološki odgovor teladi i junadi, publikovali Bolte i sar. (1992, 2001), a odnose se na povećanje broja neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita usled imunostimulatornog delovanja ekstrakta aplikovanog istovremeno sa vakcinom protiv salmoneloze. Bogdan i sar. (1993) su takođe utvrdili da subkutano aplikovanje ekstrakta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K. tovnjoj jagnjadi u predelu levog uha, izaziva povećanje broja neutrofilnih granulocita prosečno za 254,5% 24h posle tretmana. Petnaest godina kasnije, Nueleanu (2007, 2008) je prijavio imunostimulatorni efekat iste biljke kod ovaca u starosti od 12 meseci i preporučio njenu upotrebu kod nedovoljne razvijenosti ovaca i hroničnih bolesti infektivne, zapaljive i reumatske prirode. Ovaj autor je zabeležio povećanje broja neutrofilnih granulocita 24h nakon aplikovanja 3% dekokta (120,9%) i 4% dekokta (159,4%) i 48h posle tretmana 5% dekoktom (235,7%) korena i rizoma *H. purpurascens* W. et K., a visoke vrednosti su se održale do kraja eksperimenta, što je ukazalo na poboljšan imunski odgovor tretiranih životinja. Davidović i sar. (2010-b) su registrovali veću vrednost ovog parametra u krvi pacova svih oglednih grupa kod kojih

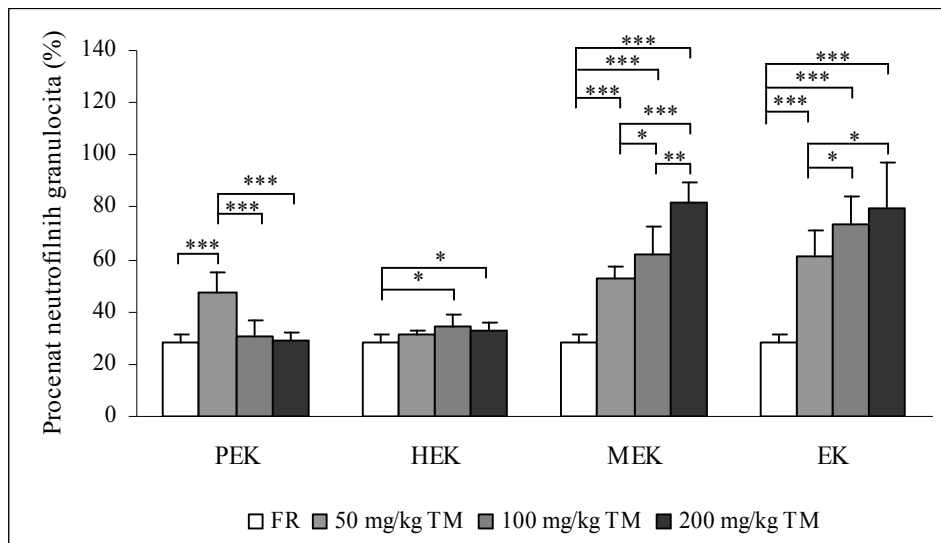
je praćen efekat ekstrakta kukureka u toku vremena (24h, 48h i 72h) u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je značajno povećanje od 158,23% utvrđeno nakon 24h.

Tosevski i sar. (1999, 2004) kod prasadi, a Milanović i sar. (2004) kod pacova, su pratili efekat ekstrakta *H. odorus* W. et K. na pojavu granulocitoze. Ustanovljeno je da aplikovanje ekstrakta cele biljke kukureka kod prasadi u uzrastu od 35 dana izaziva povećanje broja neutrofilnih granulocita 7. dana za 69% i 14. dana za 63%, a kod prasadi u starosti od 52 dana povećanje broja neutrofilnih granulocita je bilo još veće: 2,86 puta posle 14 dana, a 2,07 puta 21. dana ogleđa. Granulocitoza u krvi pacova utvrđena 24h nakon aplikovanja vodenog rastvora podzemnih organa kukureka, razređenog fiziološkim rastvorom u odnosu 1:2, 1:4 i 1:8, u skladu je sa našim rezultatima. Značajno povećanje broja neutrofilnih granulocita 24h nakon različitih puteva aplikacije više ispitivanih doza ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. kod Wistar pacova, kao i nakon tretmana inaktivisanim, denaturisanim ili dijalizatom ekstrakta, registrovano je i u našim ranije publikovanim radovima (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2006-a,b, 2007-a, 2010-a,b).

Ristoska (2002) i Ristoska i sar. (2002) su utvrdili da je 24h nakon aplikacije ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. nazimicama, broj neutrofilnih granulocita ostao u granicama referentnih vrednosti, što je u suprotnosti sa rezultatima našeg istraživanja.

6.1.4. Procenat neutrofilnih granulocita (Gr %)

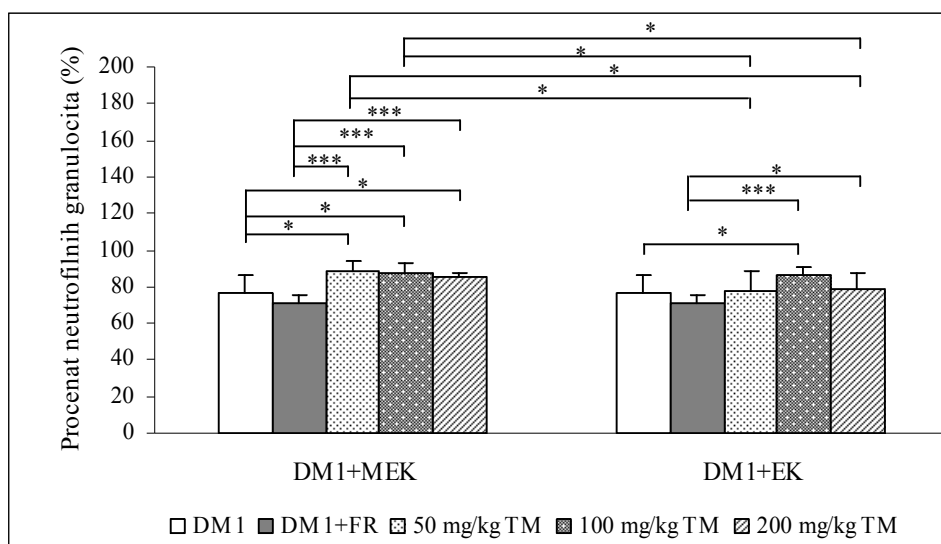
Procenat neutrofilnih granulocita u krvi oglednih grupa kod kojih je aplikovan petroletarski i hloroformski ekstrakt se kretao od 29,31±2,83% (PEK 200), što nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu životinja (28,26±3,10%), do 47,49±7,32% (PEK 50) što predstavlja statistički značajnu razliku na nivou od P<0,001. Vrednosti procenta neutrofilnih granulocita u krvi grupa 24h posle primene metanolnog i vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su bile značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu (P<0,001). Povećavale su se u skladu sa aplikovanom dozom, tako da su najveće vrednosti zabeležene u grupama MEK 200 (81,91±7,38%) i EK 200 (79,79±17,24%) (Grafikon 6.1.4.A.).



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.4.A. Procenat neutrofilnih granulocita (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Vrednost ovog parametra je bila veća kod svih grupa koje su nakon DM tretirane metanolnim ili vodenim ekstraktom, u odnosu na grupu kojoj je trokратно aplikovan DM (76,51±9,39%) i grupu kojoj je nakon DM aplikovan FR (71,37±3,64%) (razlike nesignifikantne do visoko značajne). Istovremeno, ove grupe su imale ujednačen prosečan procenat neutrofilnih granulocita, tako da je najveća vrednost zabeležena u grupama DM1+MEK50 (88,64±4,90%) i DM1+MEK100 (87,33±5,18%) bila značajno veća samo u poređenju sa DM1+EK50 i DM1+EK200 (P<0,05) (Grafikon 6.1.4.B.)



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.4.B. Procenat neutrofilnih granulocita (%) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

U krvi pacova kontrolne grupe prosečan procenat neutrofilnih granulocita je iznosio $28,26 \pm 3,10\%$, što je nešto iznad gornje granice referentnih vrednosti, koje po Mooru (2000) za ovu kategoriju pacova iznose $16,6 \pm 5,7\%$ kod mužjaka i $15,3 \pm 5,7\%$ kod ženki. Kod svih oglednih grupa zabeležena vrednost ovog parametra je bila veća od fizioloških vrednosti. Povećanje procenta neutrofilnih granulocita u krvi životinja 24h nakon tretmana različitim varijantama *Helleborus* sp. je registrovao veći broj autora, što je u skladu sa našim rezultatima, kao i ranije publikovanim radovima.

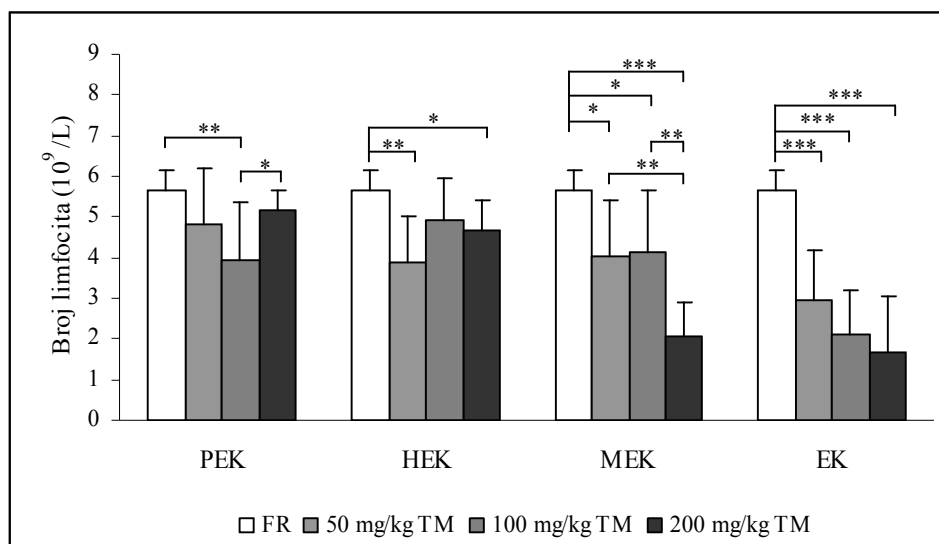
U odnosu na kontrolnu grupu, značajno povećanje ove vrednosti ($P < 0,001$) nakon 24h je ustanovljeno kod oglednih grupa pacova tretiranih ekstraktom rizoma i korena *H. odorus* W. et K. u dozi 10 mg/100 g TM (Davidović i sar., 2010-a,b), termički obrađenim ekstraktima na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min ($P < 0,01$) i $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ($P < 0,001$) ili dijalizatom ekstrakta u navedenoj dozi ($P < 0,01$) (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-a). Bogdan i sar. (1989, 1990-a, 1990-b, 1993) su utvrdili značajno povećanje procenta granulocita kod zdravih odraslih (goveda, konja, ovaca) i mladih životinja (svinje od 4-5 meseci) 24h, 48h, 96h i 144h posle transkutane implantacije rizoma *H. purpurascens* W. et K. i 24h, 48h i 96h nakon subkutanog aplikovanja podzemnih organa iste biljke u obliku 4% dekokta, 4% ekstrakta saponozida i 1‰ dekokta rastvorenog 200 puta. "Zatravljanjem" životinja ili aplikovanjem ekstrakta kukureka najviše je stimulirana mobilizacija neutrofilnih granulocita, što je dovelo i do promene brojnog odnosa pojedinih tipova leukocita u leukocitarnoj formuli. Tosevski i sar. (1999, 2004) su posle 7 i 14 dana od aplikacije ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K., kod prasadi u uzrastu od 35 dana, i nakon 14 i 21 dana od tretmana kod prasadi u starosti od 52 dana, zabeležili značajno povećanje vrednosti ovog parametra. Bolte i sar. (2001) su posle istovremene aplikacije prečišćenog ekstrakta *Helleborus* sp. sa vakcinom protiv salmoneloze konstatovali povećanje procenta neutrofilnih granulocita u toku vremena (za 64,6% nakon 7 dana i 92,3% posle 14 dana). Ovi rezultati se razlikuju od rezultata Davidović i sar. (2010-b) koji su uočili kratkotrajan efekat ekstrakta kukureka, odnosno da povećanje procenta neutrofilnih granulocita 48h posle aplikacije ekstrakta pacovima i smanjenje posle 72h u odnosu na kontrolnu grupu nije bilo statistički signifikantno.

Procenat neutrofilnih granulocita utvrđen u našim ispitivanjima, značajno se povećavao sa rastom koncentracije aplikovanog metanolnog i vodenog ekstrakta, što je

u skladu sa vrednostima koje navode Milanović i sar. (2004). U našem ogledu je registrovano povećanje vrednosti ovog parametra kod svih ispitivanih grupa, pri čemu razlika nije bila statistički značajna samo između kontrolne i grupa kojima je aplikovano po 100 ili 200 mg/kg TM petroletarskog ili 50 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta. Utvrđene vrednosti kod svih grupa su veće od referentnih, dok Ristoska (2002) i Ristoska i sar. (2002) navode da 24h nakon aplikacije ekstrakta podzemnih organa kukureka nazimicama, procenat neutrofilnih granulocita ostaje u granicama referentnih vrednosti, što nije u skladu sa našim rezultatima.

6.1.5. Broj limfocita (Lym)

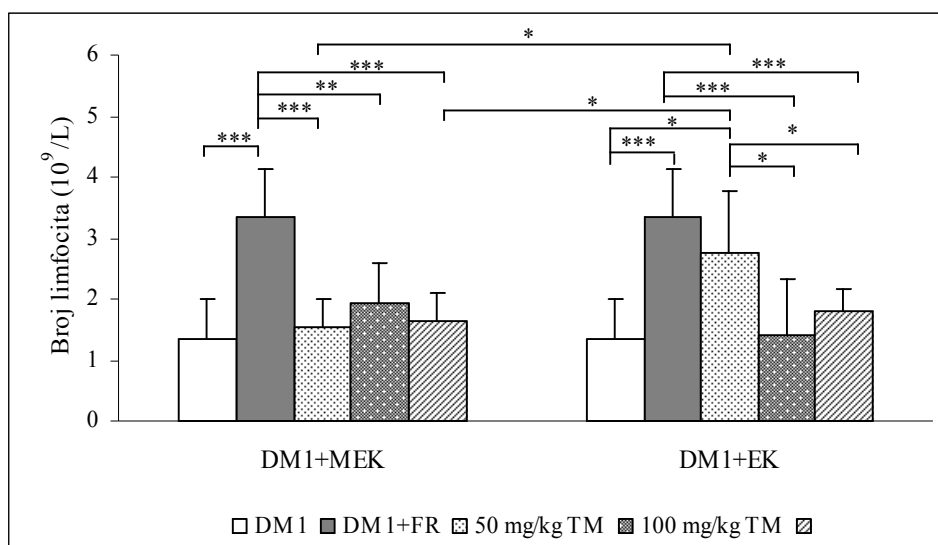
Prosečan broj limfocita u krvi pacova kontrolne grupe ($5,67 \pm 0,47 \times 10^9/L$) je bio značajno veći u odnosu na sve ogledne grupe (na nivou značajnosti od $P < 0,05$ do $P < 0,001$), a utvrđene razlike nisu bile signifikantne samo u odnosu na grupe tretirane sa 50 i 200 mg/kg TM petroletarskog i 100 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta. Prosečne vrednosti ovog parametra u okviru pojedinih grupa su bile ujednačene, tako da je značajno veća vrednost utvrđena samo u grupi PEK 200 u odnosu na PEK 100 ($P < 0,05$), kao i MEK 50 i MEK 100 u odnosu na MEK 200 ($P < 0,01$) (Grafikon 6.1.5.A).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.5.A. Broj limfocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Najniži srednji broj limfocita je zabeležen u grupi koja je tri dana dobijala deksametazon ($1,34 \pm 0,67 \times 10^9/L$), dok su veće vrednosti zabeležene kod ostalih ispitivanih grupa, pri čemu su utvrđene razlike bile signifikantne u poređenju sa grupama koje su nakon deksametazona dobile fiziološki rastvor ($P < 0,001$) ili vodeni ekstrakt u dozi 50 mg/kg TM ($P < 0,05$). Najveća vrednost broja limfocita je utvrđena kod grupe kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor ($3,34 \pm 0,80 \times 10^9/L$), a razlike su bile visoko signifikantne ($P < 0,001$) u odnosu na većinu grupa kojima je aplikovan metanolni ili vodeni ekstrakt kukureka različitih doza. U grupi DM1+EK50 srednja vrednost ovog parametra ($2,74 \pm 1,03 \times 10^9/L$) je bila značajno veća nego kod drugih grupa tretiranih ekstraktom ($P < 0,05$), pri čemu nije bilo značajne razlike samo u odnosu na grupu DM1+MEK100. Između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene različite srednje vrednosti broja limfocita, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$) (Grafikon 6.1.5.B).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.5.B. Broj limfocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

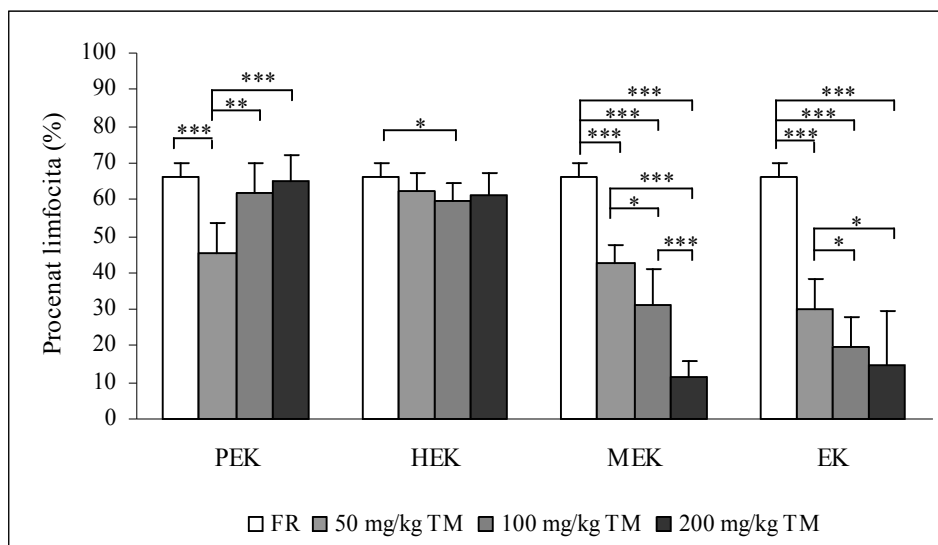
Srednje vrednosti broja limfocita u krvi ispitivanih grupa pacova su se kretale od $1,34 \pm 0,67 \times 10^9/L$ (24h posle aplikacije deksametazona tri dana) do $5,14 \pm 0,53 \times 10^9/L$ (24h posle aplikovanja 200 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta) i bile su niže od referentnih vrednosti koje navode Jain (1993) ($5,48 \pm 1,75 \times 10^9/L$) i Pritchett i Corning (2004) ($5,6-8,3 \times 10^9/L$). Kod kontrolne grupe pacova zabeležen prosečan broj limfocita ($5,67 \pm 0,47 \times 10^9/L$) je bio na donjoj granici fizioloških vrednosti. Liberati i sar. (2004) su

dali šire referentne vrednosti ($3,32-8,53 \times 10^9/L$), tako da u poređenju sa navedenim vrednostima, manji broj limfocita je utvrđen kod grupa tretiranih sa 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta, 50, 100 ili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta, deksametazonom i deksametazonom u kombinaciji sa ekstraktom. Dobijeni rezultati nisu u skladu sa rezultatima Ristoske (2002) i Ristoske i sar. (2002), koji su utvrdili da broj limfocita kod nazimica, ostaje u granicama referentnih vrednosti 24h posle aplikacije ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. Smanjenje broja limfocita u krvi pacova 24h posle aplikacije različitih doza svih ekstrakata kukureka, nije u saglasnosti sa rezultatima Tosevskog i sar. (1999, 2004) koji su utvrdili da kod prasadi u starosti od 35 dana intradermalna aplikacija 0,450 mg/kg TM ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K. izaziva dugotrajno povećanje broja limfocita (za 87% posle 7 dana i za 83% posle 14 dana). Međutim, Tosevski i sar. (2004) su zapazili da kod prasadi u starosti od 52 dana, ista doza i način aplikovanja ekstrakta kao u prethodnom ispitivanju, ne dovodi do promene vrednosti broja limfocita. Vrednost zabeležena pre davanja ekstrakta se održala, uz izvesno smanjenje 14. i 21. dana eksperimenta, što je delimično u skladu sa našim rezultatima. Nueleanu (2007, 2008) je registrovao značajno povećanje broja limfocita kod ovaca 24h, 48h i 96h nakon aplikovanja 3%, 4% i 5% dekokta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K., pri čemu je maksimalna limfocitoza bila posle 48h (60,7%, 101,1% i 46,1%), a visoke vrednosti su se održale do kraja eksperimenta.

Dirsch i sar. (1993) navode da helebrin, β -ekdison i 5α -hidroksiekdison iz *H. purpurascens* W. et K. suprimiraju proliferaciju T limfocita, dok je steroidni saponin stimuliše. Davidović i sar. (2006-a,b, 2007-a, 2010-b) su ustanovili da je prosečan broj limfocita u krvi kontrolne grupe pacova i oglednih grupa 24h, 48h i 72h nakon aplikacije vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. različitih doza bio ujednačen, tako da između njih nisu postojale statistički značajne razlike, pri čemu je u većini slučajeva najveća vrednost zabeležena kod kontrolne grupe. Utvrđena veća vrednost ovog parametra kod grupe kojoj je aplikovan fiziološki rastvor, bila je signifikantna ($P < 0,05$) u odnosu na grupu tretiranu ekstraktom denaturisanim na $100\text{ }^\circ\text{C}$ 5 min (Davidović i sar., 2010-a) ili dijalizatom ekstrakta (Davidović, 2006).

6.1.6. Procenat limfocita (Lym %)

Prosečna vrednost procenta limfocita je bila, kao i srednji broj limfocita, veća kod kontrolne grupe ($65,90 \pm 4,28\%$) u odnosu na sve ogledne grupe, pri čemu su utvrđene razlike bile visoko signifikantne ($P < 0,001$) u poređenju sa grupom PEK 50 i grupama tretiranim metanolnim i vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM, signifikantne ($P < 0,05$) u odnosu na HEK 100, a nisu značajne u odnosu na ostale grupe. Srednje vrednosti ovog parametra 24h posle aplikacije različitih doza petroletarskog i hloroformsog ekstrakta se vrlo malo razlikuju i ove razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$), osim signifikantno manje vrednosti kod grupe PEK 50 odnosu na PEK 100 ($P < 0,01$) i PEK 200 ($P < 0,001$). Procenat limfocita se značajno smanjivao sa povećanjem aplikovane doze metanolnog i vodenog ekstrakta (na nivou značajnosti od $P < 0,05$ i $P < 0,001$) (Grafikon 6.1.6.A).

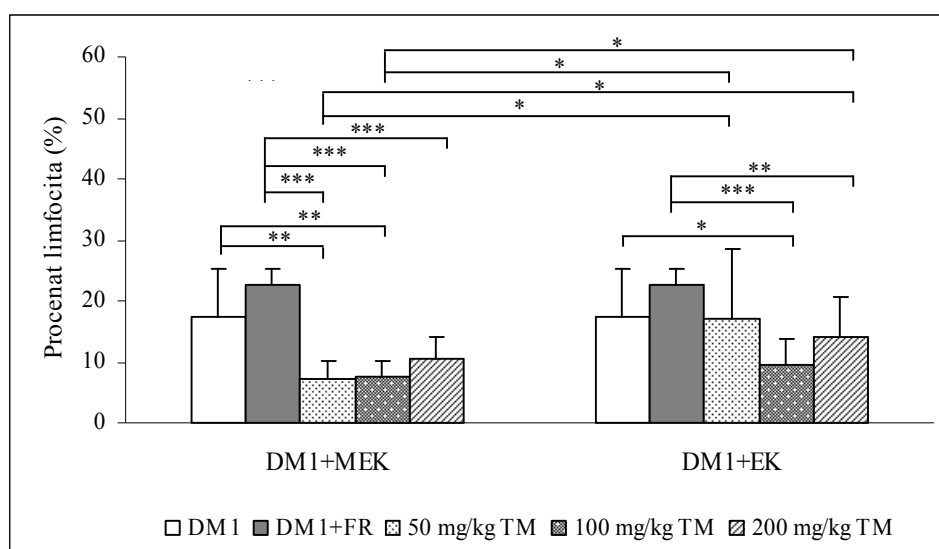


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.6.A. Procenat limfocita (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Grupa kojoj je trokratno aplikovan deksametazon, je imala značajno veću srednja vrednost procenta limfocita nego grupe koje su nakon deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom u dozi 50 ili 100 mg/kg TM ($P < 0,01$) ili vodenim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,05$). Veća vrednost ovog parametra je zabeležena u grupi koja je nakon deksametazona tretirana fiziološkim rastvorom ($22,77 \pm 2,65\%$), u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka, pri čemu su utvrđene

visoko signifikantne razlike u poređenju sa grupama tretiranim metanolnim ekstraktom različitih doza i vodenim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P<0,001$) i vrlo značajna razlika u odnosu na DM1+EK200 ($P<0,01$). Najniže vrednosti zabeležene kod grupa DM1+MEK50 ($7,23\pm 2,78\%$) i DM1+MEK100 ($7,57\pm 2,44\%$) su bile značajno manje ($P<0,05$) u odnosu na ove vrednosti kod DM1+EK50 i DM1+EK200 (Grafikon 6.1.6.B).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

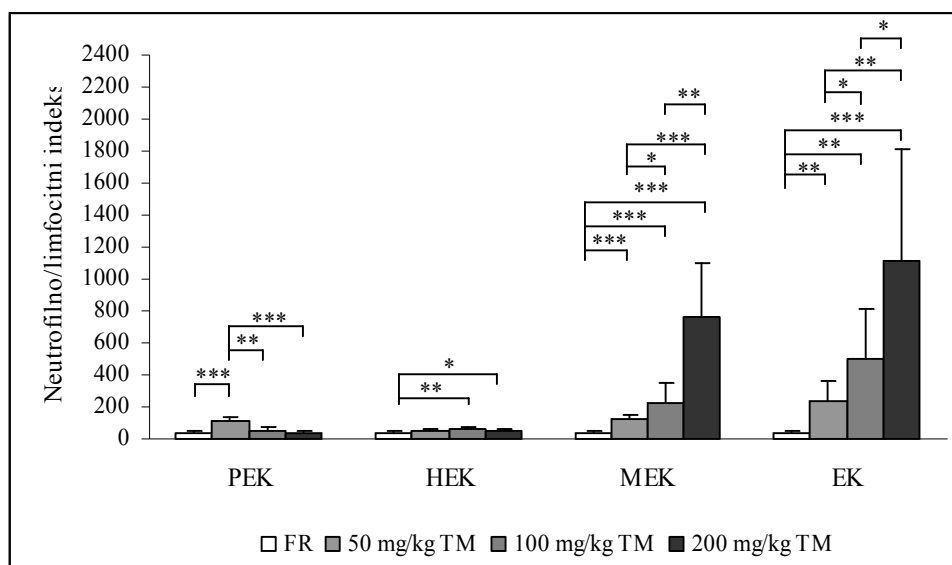
Grafikon 6.1.6.B. Procenat limfocita (%) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Referentne vrednosti procenta limfocita u krvi pacova koje navodi Moore (2000) iznose $78,3\pm 7,1$ za mužjake i $80,9\pm 5,7$ za ženke, a u toku oglada kod svih ispitivanih grupa su utvrđene niže vrednosti od navedenih.

Tosevski i sar. (2004) su takođe ukazali na blago smanjenje procenta limfocita 14. i 21. dana posle aplikacije optimalne doze od 0,450 mg/kg TM ekstrakta cele biljke *H. odoratus* W. et K. prasadima u uzrastu od 52 dana. Dobijeni rezultati su u skladu sa našim ranije dobijenim rezultatima ispitivanja efekta vodenog ekstrakta kod pacova, kada je dokazano da je srednja vrednost procenta limfocita značajno veća u kontrolnoj grupi u odnosu na ogledne grupe 24h posle aplikacije 10 mg/100 g TM ekstrakta rizoma i korena *H. odoratus* W. et K. i istog ekstrakta zagrevanog na 100 °C 5 min ($P<0,001$) ili na 56 °C 30 min ($P<0,05$) (Davidović i sar., 2010-a). Male razlike u vrednostima ovog parametra između kontrolne grupe i grupa kod kojih je praćen efekat ekstrakta u toku vremena ili delovanje dijalizata ekstrakta, nisu bile signifikantne (Davidović, 2006).

6.1.7. Neutrofilno/limfocitni indeks (Ne/Lym indeks)

Kod svih oglednih grupa tretiranih ekstraktom kukureka, osim u grupi PEK 200, utvrđene su veće prosečne vrednosti neutrofilno/limfocitnog indeksa u odnosu na kontrolnu grupu, kod koje je ova vrednost iznosila $43,22 \pm 6,90$, a razlike su se kretale od nesignifikantnih ($P > 0,05$) do visoko značajnih ($P > 0,001$). Vrednost Ne/Lym indeksa 24h nakon primene 50 mg/kg TM petroletarskog ekstrakta je značajno veća u odnosu na grupe kojima je aplikovano 100 ($P < 0,01$) ili 200 mg/kg TM ($P < 0,001$) ovog ekstrakta, dok između grupa tretiranih različitim dozama hloroformskog ekstrakta nisu utvrđene statistički značajne razlike. Sa povećanjem aplikovane doze metanolnog i vodenog ekstrakta, povećavale su se i vrednosti neutrofilno/limfocitnih indeksa, tako da su između ispitivanih grupa utvrđene signifikantne razlike na nivou značanosti od $P < 0,05$ do $P < 0,001$ (Grafikon 6.1.7.A.).

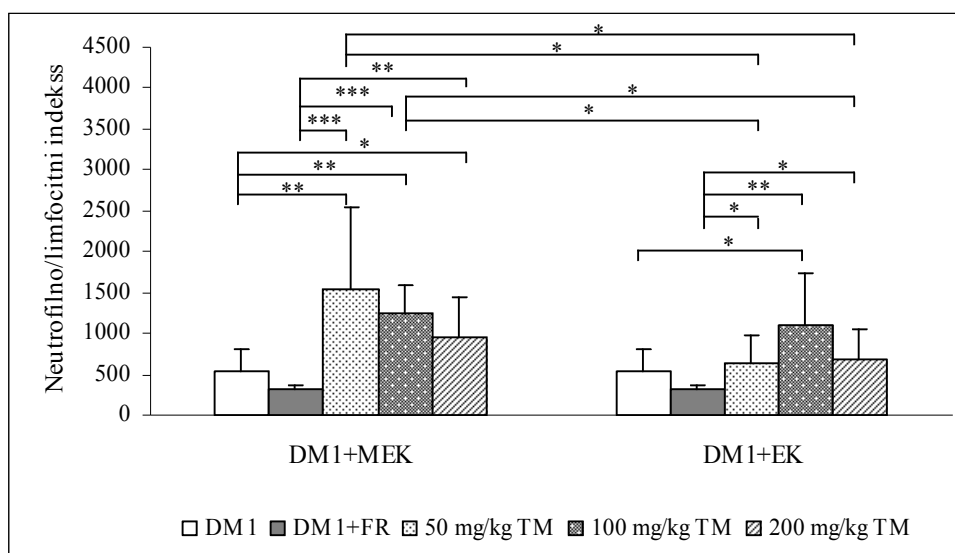


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.7.A. Neutrofilno/limfocitni indeks kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Značajno veću srednju vrednosti Ne/Lym indeksa u poređenju sa grupom koja je tri dana dobijala deksametazon ($541,26 \pm 269,04$) su imale grupe koje su četvrtog dana dobile metanolni ekstrakt u dozi 50 ili 100 mg/kg TM ($P < 0,01$), 200 mg/kg TM metanolnog ili 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta ($P < 0,05$). Najniža vrednost ovog parametra je registrovana u grupi kojoj je četvrtog dana aplikovan fiziološki rastvor

(318,52±60,48), a razlike između ove i svih grupa koje su nakon deksametazona dobile ekstrakt kukureka su bile statistički značajne na nivou od $P<0,05$ do $P<0,001$. Najveći Ne/Lym indeks registrovan kod grupa DM1+MEK50 (1539,13±1005,71) i DM1+MEK100 (1239,07±338,47) bio je signifikantno viši u odnosu na ove vrednosti kod DM1+EK50 i DM1+EK200 (Grafikon 6.1.7.B).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

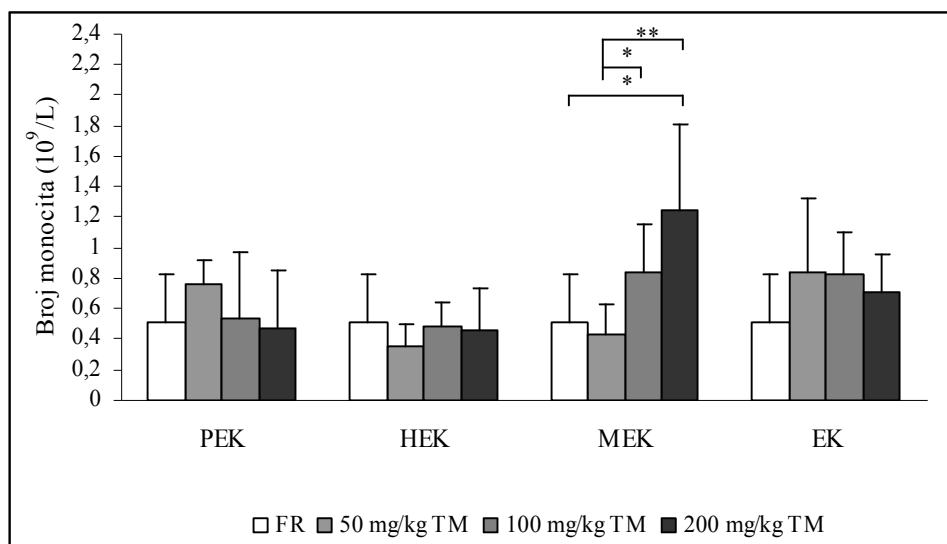
Grafikon 6.1.7.B. Neutrofilno/limfocitni indeks kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

U ranije publikovanim radovima registrovali smo povećanje neutrofilno/limfocitnih indeksa kod pacova 24h nakon intramuskularne primene vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. u dozi 0,5 mg/100 g TM (Davidović i sar., 2006-b), 5 mg/100 g TM i 20 mg/100 g TM ($P<0,01$) (Davidović i sar., 2006-a) i 10 mg/100 g TM ($P<0,001$) (Davidović i sar., 2010-a,b), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom ogledu. Davidović i sar. (2007-a) su utvrdili značajno povećanje prosečne vrednosti Ne/Lym indeksa 24h nakon subkutanog (SC) ili intramuskularnog (IM) aplikovanja po 0,2 ml vodenog ekstrakta navedene biljne vrste, razređenog fiziološkim rastvorom u odnosu 1:2 ($P<0,01$), kao i nakon intraperitonealne (IP) primene istog ekstrakta ($P<0,05$). Signifikantno veći Ne/Lym indeks je uočen 24h posle aplikovanja denaturisanog ($P<0,001$) i inaktivisanog ekstrakta ($P<0,01$) (Davidović i sar., 2010-a), dok veća vrednost 48h nakon aplikovanja ekstrakta u dozi 10 mg/100 g TM i niža vrednost nakon 72h (Davidović i sar., 2010-b), kao i veći indeks

24h posle tretmana dijalizatom ekstrakta (Davidović, 2006) nisu bili statistički značajni u odnosu na kontrolnu grupu pacova. Neutrofilno/limfocitni indeksi oglednih grupa pacova tretiranih vrlo malim dozama ekstrakta (0,1, 0,2 ili 0,3 mg/100 g TM) su bili nešto niži nego kod kontrolne grupe, a utvrđene razlike nisu bile značajne (Davidović i sar., 2006-b).

6.1.8. Broj monocita (Mo)

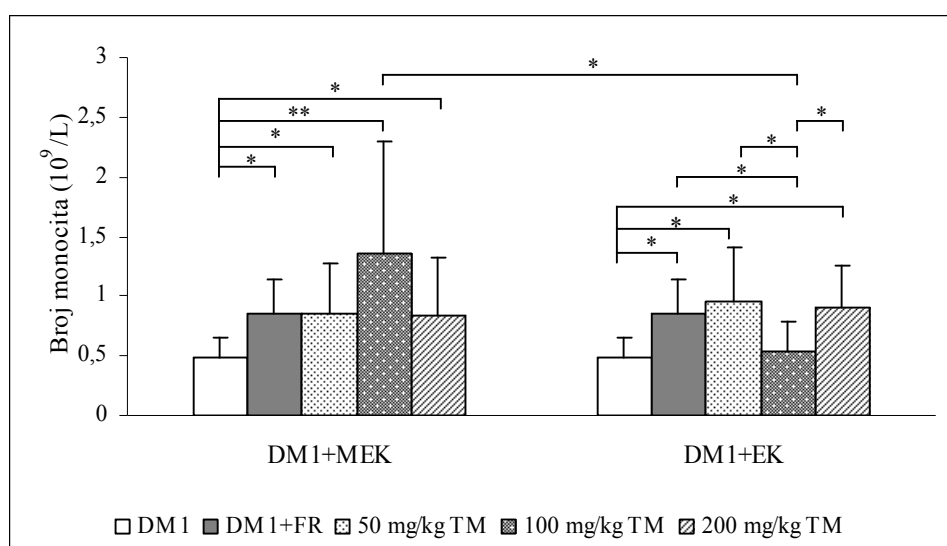
Broj monocita u krvi kontrolne grupe pacova je iznosio $0,51 \pm 0,32 \times 10^9/L$, a u krvi životinja oglednih grupa kojima je aplikovan ekstrakt kukureka ova vrednost se kretala od $0,35 \pm 0,15 \times 10^9/L$ kod HEK 50 (nije značajna razlika u odnosu na kontrolu) do $1,25 \pm 0,56 \times 10^9/L$ kod MEK 200 ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Utvrđene razlike u srednjim vrednostima broja monocita nisu bile statistički značajne, kako između kontrolne i oglednih grupa, tako niti između samih oglednih grupa kojima je aplikovan petroletarski, hloroformski ili vodeni ekstrakt u različitim dozama. Grupa tretirana sa 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta je imala značajno niži broj monocita u odnosu na grupe kojima je aplikovan ekstrakt u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,05$) i 200 mg/kg TM ($P < 0,01$) (Grafikon 6.1.8.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.8.A. Broj monocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Srednja vrednost broja monocita u grupi kojoj je trokratno aplikovan deksametazon ($0,48 \pm 0,18 \times 10^9/L$) je bila značajno niža u odnosu na grupe koje su nakon deksametazona tretirane metanolnim ekstraktom u dozi 100 mg/kg TM ($P < 0,01$), fiziološkim rastvorom ili metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50 ili 200 mg/kg TM ($P < 0,05$). Sličan prosečan broj monocita je utvrđen kod grupa kojima je posle deksametazona aplikovan fiziološki rastvor, metanolni ili vodeni ekstrakt različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM), tako da nisu utvrđene statistički značajne razlike između ovih grupa. Izuzetak je grupa DM1+EK100 kod koje je zabeležena prosečna vrednost ovog parametra ($0,54 \pm 0,25 \times 10^9/L$) bila značajno niža ($P < 0,05$) nego kod DM1+FR, DM1+MEK100, DM1+EK50 i DM1+EK200 (Grafikon 6.1.8.B.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.8.B. Broj monocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

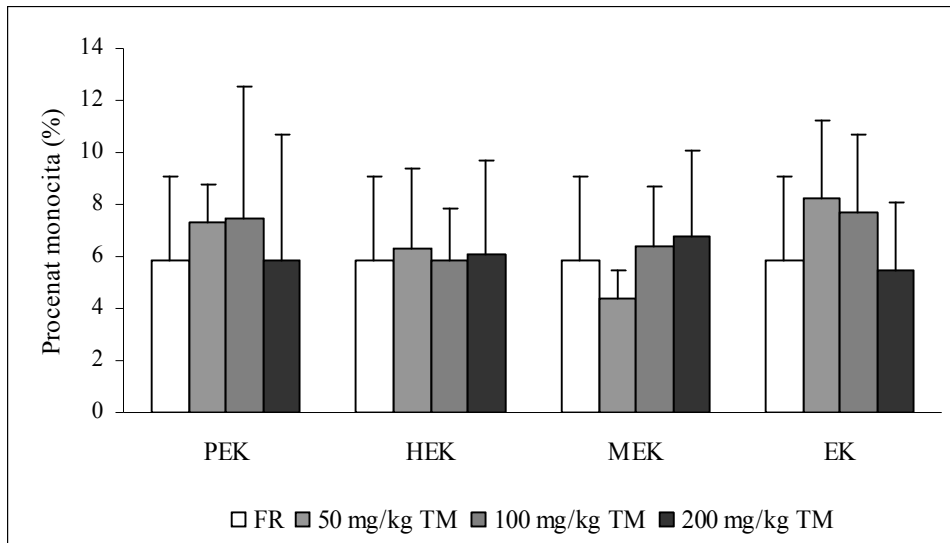
Kod svih ispitivanih grupa pacova, broj monocita u krvi je bio veći od referentnih vrednosti koje navode Jain (1993) ($0,24 \pm 0,2 \times 10^9/L$) i Liberati i sar. (2004) ($0,04-0,19 \times 10^9/L$). Ekstrakti pozemnih organa kukureka ispitivani u našem ogledu su ispoljili najmanji efekat na broj monocita u krvi. Male razlike u broju monocita i odsustvo statističke značajnosti utvrđenih razlika, između ispitivanih grupa tokom ogleda, su u skladu sa rezultatima koje su Tosevski i sar. (1999, 2004) dobili 7. i 14. dana nakon aplikovanja ekstrakta cele biljke *H. odoratus* W. et K. prasadi u starosti od 35 dana. Međutim, kod prasadi u starosti od 52 dana, čiji je broj monocita u krvi pre

tretmana ekstraktom takođe bio povećan u odnosu na fiziološku vrednost, Tosevski i sar. (2004) su utvrdili povećanje ove vrednosti za 1,4 puta 14. dana ogleda i za 1,2 puta 21. dana posle primene ekstrakta. Razlike u srednjim vrednostima broja monocita nisu bile signifikantne, kako između kontrolne i oglednih grupa pacova, tako niti između samih oglednih grupa tretiranih vodenim ekstraktom rizoma i korena *H. odorus* W. et K. u dozi 10 mg/100 g TM ili istim, prethodno inaktivisanim, denaturisanim ili dijalizovanim ekstraktom (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-a). Statistički značajne razlike broja monocita nisu utvrđene tokom određivanja dužine trajanja efekta navedenog ekstrakta, kada su njihove vrednosti ispitivane 24h, 48h i 72h nakon aplikovanja ekstrakta pacovima (Davidović i sar., 2010-b).

Suprotno našim rezultatima, aplikovanje ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. nazimicama, dovelo je do veoma izražene monocitoze nakon 24h i 48h (Ristoska i sar., 2002), pri čemu je povećanje broja monocita nakon 24h bilo čak 14 puta, a monociti su bili zastupljeni sa 46% u ukupnom broju leukocita u krvi nazimica (Ristoska, 2002). Nueleanu (2007) je registrovao monocitopeniju kod ovaca 24h, 48h i 96h nakon aplikovanja 3% i 4% dekokta podzemnih organa *H. purpurascens* W. et K., pri čemu je najniži broj monocita zabeležen posle 48h, a vrednosti niže nego pre aplikovanja ekstrakta su se održale do kraja eksperimenta. Isti autor (2008) je utvrdio da u grupi tretiranoj 5% dekoktom prethodno navedene biljke, nakon 24h se smanjuje broj monocita, ali se povećava za 54% posle 48h, da bi nakon 96h ponovo nastala monocitopenija.

6.1.9. Procenat monocita (Mo %)

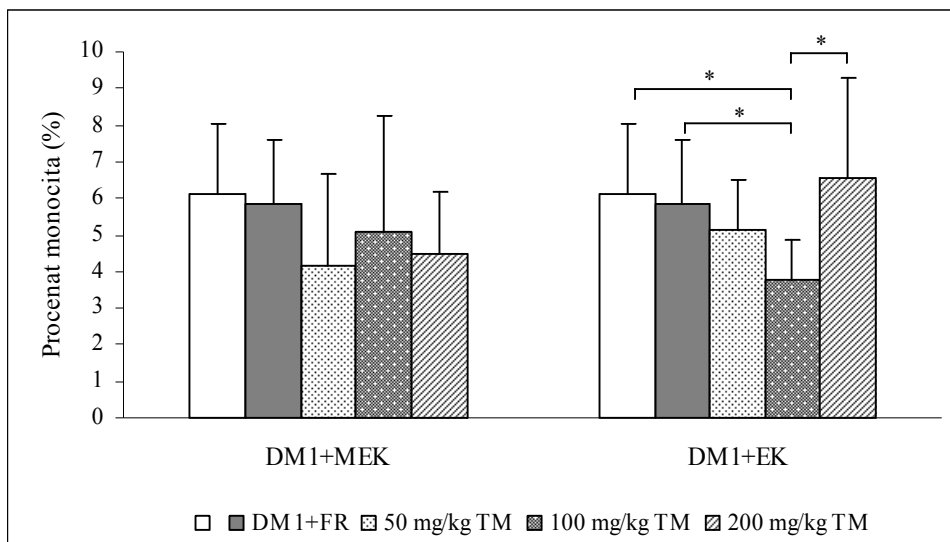
Prosečna vrednost procenta monocita kod kontrolne grupe pacova je iznosila $5,84 \pm 3,24\%$. Ova vrednost je viša samo u odnosu na procenat monocita zabeležen kod MEK 50 ($4,37 \pm 1,07\%$) i EK 200 ($5,46 \pm 2,63\%$), dok je kod ostalih oglednih grupa tretiranih petroletarskim, hloroformskim, metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM procenat monocita bio 5,84-8,23%. Između ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Grafikon 6.1.9.A.).



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.9.A. Procenat monocita (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Između srednjih vrednosti procenta monocita u krvi pacova 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM) takođe nisu utvrđene signifikantne razlike, osim značajno niže vrednost ovog parametra u grupi DM1+EK100 u odnosu na grupe DM1, DM1+FR i DM1+EK200 (P<0,05) (Grafikon 6.1.9.B.).



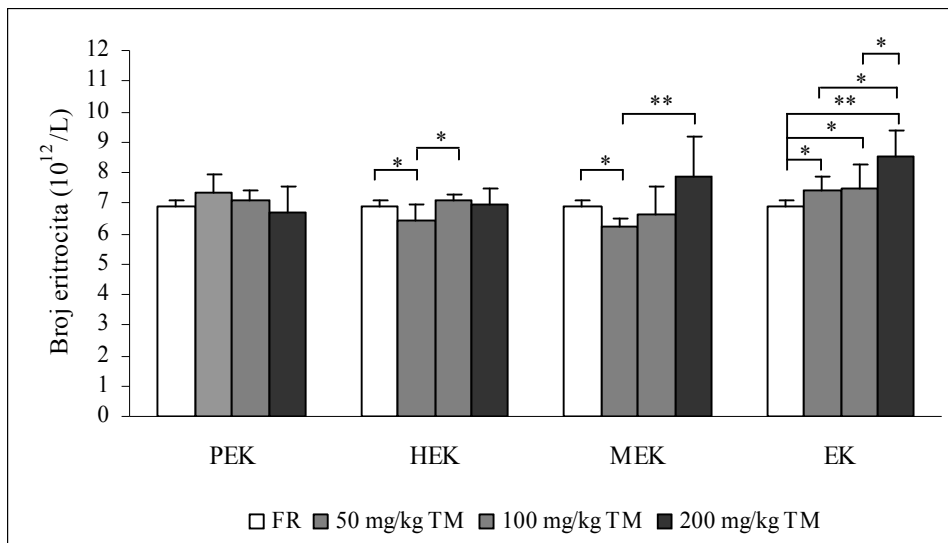
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.9.B. Procenat monocita (%) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Procenat monocita kod svih ispitivanih grupa tokom oglada je bio povećan u odnosu na fiziološku vrednost, koja se prema navodima Moora (2000) kreće u granicama $3,4\pm 2,5\%$ kod mužjaka i $1,6\pm 1,0\%$ kod ženki pacova. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Tosevskog i sar. (1999, 2004) registrovanim na prasadi u uzrastu od 35 dana, ali nisu u skladu sa rezultatima Tosevskog i sar. (2004) kada je ovaj parametar određivan kod prasadi u uzrastu od 52 dana. Davidović (2006) i Davidović i sar. (2010-a) su takođe zabeležili veći procenat monocita kog grupa pacova kojima je aplikovano po 10 mg/100 g TM nativnog ili termički tretiranog ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min ili $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min) ekstrakta *H. odoratus* W. et K. u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu fiziološkim rastvorom, pri čemu između ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike. Mala, nesignifikantna variranja prosečne vrednosti ovog parametra u toku vremena (48h i 72h nakon aplikovanja ekstrakta) i 24h nakon aplikovanja dijalizata ekstrakta, dobijena su i u našim ranijim istraživanjima (Davidović, 2006).

6.1.10. Broj eritrocita (Er)

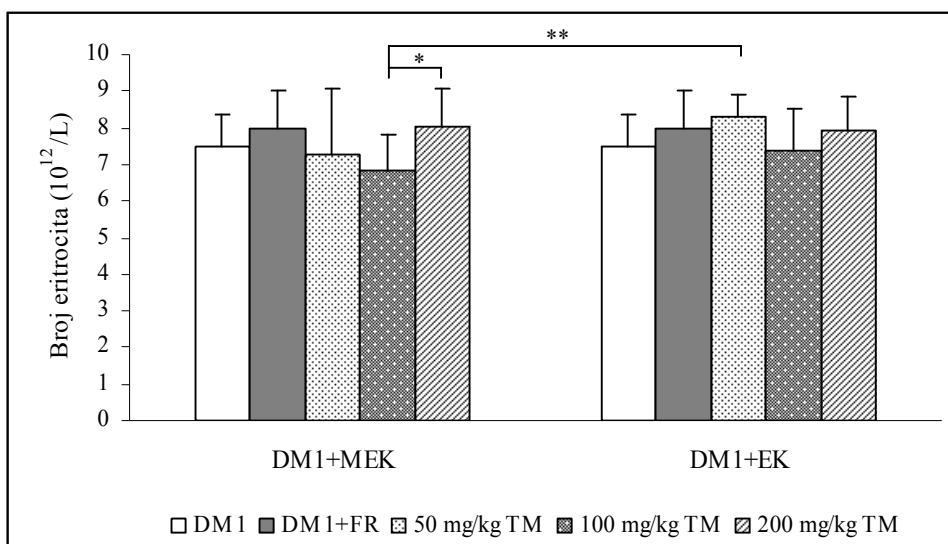
Prosečan broj eritrocita utvrđen kod kontrolne grupe pacova je iznosio $6,90\pm 0,18\times 10^{12}/\text{L}$. Kod oglednih grupa kojima je aplikovan petroletarski, hloroformski ili metanolni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM zabeležene vrednosti eritrocita su se razlikovale, ali je statistički značajno manji broj eritrocita utvrđen samo u grupi HEK 50 u odnosu na kontrolnu ($P<0,05$) i HEK 100 ($P<0,05$), kao i u grupi MEK 50 u odnosu na kontrolnu ($P<0,05$) i MEK 200 ($P<0,01$). Grupa EK 200, kod koje je zabeležen najveći prosečan broj eritrocita ($8,52\pm 0,84\times 10^{12}/\text{L}$), imala je statistički značajno veću vrednost ovog parametra u odnosu na kontrolnu ($P<0,01$) i grupe EK 50 i EK 100 ($P<0,05$), kod kojih je povećanje broja eritrocita takođe bilo statistički signifikantno u poređenju sa kontrolnom grupom, ali na nižem nivou značajnosti ($P<0,05$) (Grafikon 6.1.10.A.).



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.10.A. Broj eritrocita ($10^{12}/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Utvrđene razlike između srednjih vrednosti broja eritrocita u krvi 24h posle aplikacije deksametazona tri dana, a četvrtog dana fiziološkog rastvora, metanolnog ili vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM) nisu bile signifikantne, osim niže vrednosti ovog parametra zabeležene u grupi DM1+MEK100 u odnosu na DM1+MEK200 (na nivou značajnosti $P<0,05$) i DM1+EK50 (na nivou značajnosti $P<0,01$) (Grafikon 6.1.10.B.).



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.1.10.B. Broj eritrocita ($10^{12}/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

U publikovanim izveštajima postoje izvesne razlike u fiziološkim vrednostima broja eritrocita kod pacova: $8,26 \pm 0,65 \times 10^{12}/L$ (Jain, 1993), $7,25 \pm 0,93 \times 10^{12}/L$ kod mužjaka i $6,85 \pm 0,61 \times 10^{12}/L$ kod ženki (Moore, 2000), $7-10 \times 10^{12}/L$ (Carpenter i sar., 2001), $5,4-8,5 \times 10^{12}/L$ (Pritchett i Corning, 2004), $7,64-8,85 \times 10^{12}/L$ (Liberati i sar., 2004). Utvrđen prosečan broj eritrocita kod svih ispitivanih grupa u toku oglada je bio u granicama referentnih vrednosti koje je iznela većina navedenih autora i nije ukazao na hemolitički efekat ekstrakata, koji može da nastane usled vezivanja saponozida za sterole ćelijskih membrana i povećanja njihove permeabilnosti.

Petričić i sar. (1971-b) su utvrdili da intenzitet hemolize nije u korelaciji sa količinom različitih saponozida, već zavisi od njihove strukture i umanjuje se produžavanjem niza šećera. Monodezmozidni saponozidi sa jednim ugljenohidratnim lancem (izuzevši glicirizin i α -solanin) pokazuju visoku hemolitičku aktivnost, a naročito saponini sa 4-5 monosaharida u sastavu šećernog dela molekula. Bidezmozidni neutralni saponini sa 2 ugljenohidratna lanca od kojih je jedan vezan za C_3 , a drugi za C_{26} , gotovo su hemolitički inaktivni (odvajanjem lanca na C_{26} hemoliza se snažno pojačava), a kiseli ispoljavaju slabo hemolitičko delovanje. Na hemolizu utiče i grananje ugljenohidratnog lanca, tako da neutralni i bazni saponini sa nerazgranatim šećernim lancem deluju slabo hemolitički, a sa razgranatim šećernim lancem deluju hemolitički i u velikom razređenju. Kiseli saponini sa dva šećerna lanca, od kojih je jedan razgranat, ispoljavaju snažnu, a sa jednim ugljenohidratnim lancem slabu hemolitičku aktivnost. Rezultati dobijeni u našem ogledu su u skladu sa rezultatima Petričića i sar. (1971-b) koji navode da *H. odorus* W. et K. ispoljava slabu hemolitičku aktivnost (HD u Ph Jug. Sap.jed./g droge), nižu u poređenju sa drugim biljkama roda *Helleborus* L. Bogdan i sar. (1990-b) su utvrdili da u *in vitro* uslovima saponozidi *H. purpurascens* L. u koncentraciji od 40% izazivaju potpunu hemolizu, dok niže koncentracije saponozida (4%, 8%, 10%, 20%, 30%) ispoljavaju slabiji hemolitički efekat.

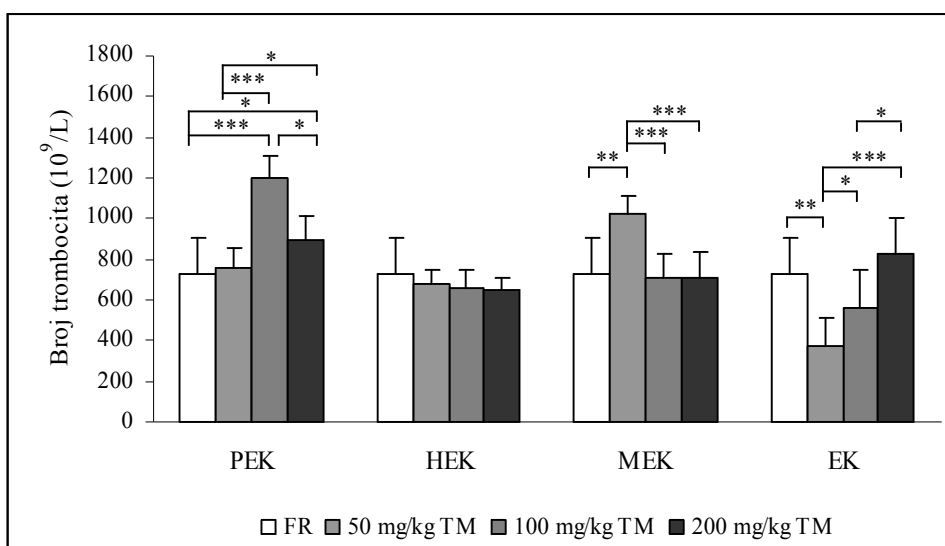
Naši rezultati dobijeni određivanjem broja eritrocita u krvi pacova 24h posle aplikacije različitih doza petroletarskog, hloroformskog i metanolnog ekstrakta su u skladu sa rezultatima koje smo dobili u prethodnim ispitivanjima (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2006-b, 2007-b, 2010-c), kao i sa rezultatima do kojih su u svojim istraživanjima došli drugi autori. Bogdan i sar. (1989, 1990-a) su utvrdili da se broj

eritrocita u krvi konja, ovaca i svinja nije značajno promenio 24h, 48h, 96h i 144h posle transkutane implantacije rizoma *H. purpurascens* W. et K., a samo kod goveda je, verovatno usled hemokoncentracije, došlo do značajnog povećanja broja eritrocita u krvi 24h i 48h posle implantacije. Prosečan broj eritrocita u krvi nazimica se smanjio 24h posle aplikovanja ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K., ali se održao u fiziološkim granicama (Ristoska, 2002; Ristoska i sar., 2002). Smanjenje broja eritrocita za 22% u odnosu na vrednosti pre tretmana, utvrdili su Tosevski i sar. (2004) 14. i 21. dana nakon aplikacije ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K. prasadi u starosti od 52 dana. U prethodnim ispitivanjima smo zabeležili nesignifikantan pad broja eritrocita u krvi pacova 24h nakon aplikovanja vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. u dozi 0,1, 0,2, 0,3 i 0,5 mg/100 g TM ($P>0,05$) (Davidović i sar., 2006-b) i koncentraciji 5 i 20 mg/100 g TM ($P<0,01$) (Davidović i sar., 2007-b), pri čemu su vrednosti bile u granicama fizioloških. Registrovali smo i značajno smanjenje broja eritrocita u toku vremena (nakon 48h $P<0,05$ i posle 72h $P<0,001$) i 24h posle aplikovanja inaktivisanog ($P<0,001$) ili denaturisanog ($P<0,01$) vodenog ekstrakta u dozi 10 mg/100 g TM, kao i manju vrednost u grupi koja je dobila dijalizat ekstrakta ($P>0,05$), u odnosu na kontrolnu grupu i grupu 24h nakon tretmana ekstraktom (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-c).

Rezultati dobijeni 24h nakon tretmana pacova vodenim ekstraktom u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM su u skladu sa rezultatima Tosevskog i sar. (1999, 2004) dobijenim na prasadi u starosti od 35 dana, koji ukazuju na povećanje broja eritrocita 7. i 14. dana posle aplikacije ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K., ali i na održavanje u granicama referentnih vrednosti. Utvrđene su relativno male razlike u srednjem broju eritrocita oglednih grupa pacova 24h posle SC, IP ili IM aplikacije razblaženog ekstrakta kukureka u odnosu na kontrolnu grupu, kao i između samih oglednih grupa, pri čemu je samo veća vrednost ovog parametra u grupi koja je tretirana IM bila i statistički značajna ($P<0,05$) (Davidović i sar., 2007-a).

6.1.11. Broj trombocita (Tr)

Prosečan broj trombocita utvrđen u krvi kontrolne grupe pacova ($723,14 \pm 178,68 \times 10^9/L$ krvi) je bio značajno manji nego u grupama PEK 100 ($P < 0,001$), PEK 200 ($P < 0,05$) i MEK 50 ($P < 0,01$), a veći nego u grupi EK 50 ($P < 0,01$). Najveća vrednost ovog parametra zabeležena kod PEK 100 ($1198,57 \pm 110,36 \times 10^9/L$) i najniža kod EK 50 ($370,57 \pm 139,85 \times 10^9/L$) su se značajno razlikovale u odnosu na ostale grupe tretirane ovim ekstraktima ($P < 0,05$ i $P < 0,001$), između kojih su takođe utvrđene signifikantne razlike na nivou $P < 0,05$. Broj trombocita je bio ujednačen između grupa kojima su aplikovane različite doze hloroformskog ekstrakta ($P > 0,05$), a veći u grupi kojoj je aplikovano 50 mg/kg TM metanolnog ekstrakta u odnosu na grupe tretirane većim dozama ($P < 0,001$) (Grafikon 6.1.11.A.).

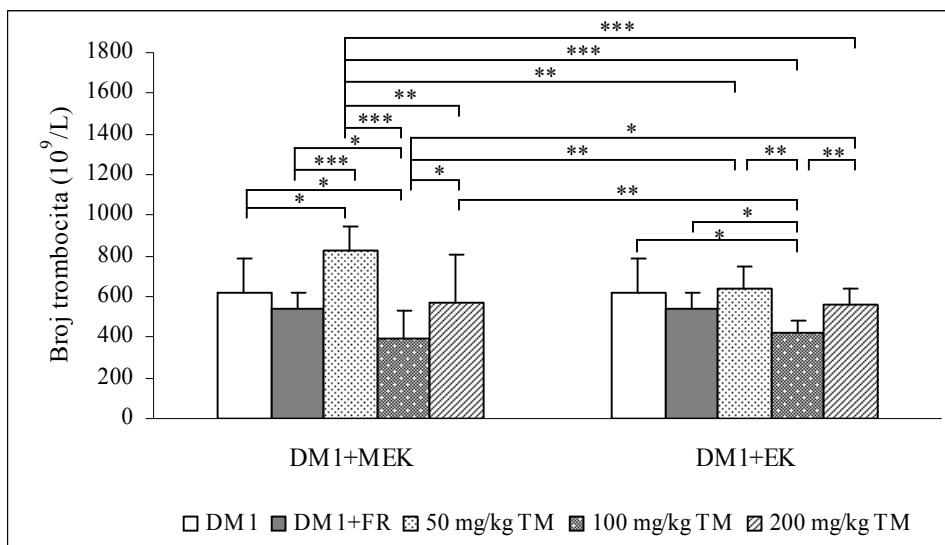


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.11.A. Broj trombocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

U odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon ($618,57 \pm 169,92 \times 10^9/L$ krvi) i grupu kojoj je nakon deksametazona aplikovan fiziološki rastvor ($536,14 \pm 82,94 \times 10^9/L$ krvi), srednja vrednost broja trombocita je bila veća kod DM1+MEK50 ($P < 0,05$ i $P > 0,001$) i niža kod grupa DM1+MEK100 i DM1+EK100 ($P < 0,05$), dok u odnosu na ostale ispitivane grupe utvrđene razlike nisu bile signifikantne ($P > 0,05$). Grupa koja je posle deksametazona tretirana metanolnim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM je imala najveći prosečan broj trombocita

($831,14 \pm 169,92 \times 10^9/L$ krvi), a razlike su bile visoko signifikantne u odnosu na DM1+MEK100, DM1+EK100 i DM1+EK200 ($P < 0,001$) i vrlo signifikantne u odnosu na DM1+MEK200 i DM1+EK50 ($P < 0,01$). Najniže vrednosti ovog parametra zabeležene kod grupa DM1+MEK100 i DM1+EK100 su bile značajno niže nego kod DM1+MEK200 (na nivou značajnosti od $P < 0,05$ i $P < 0,01$), DM1+EK50 ($P < 0,01$) i DM1+EK200 (na nivou značajnosti od $P < 0,05$ i $P < 0,01$) (Grafikon 6.1.11.B.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.11.B. Broj trombocita ($10^9/L$) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

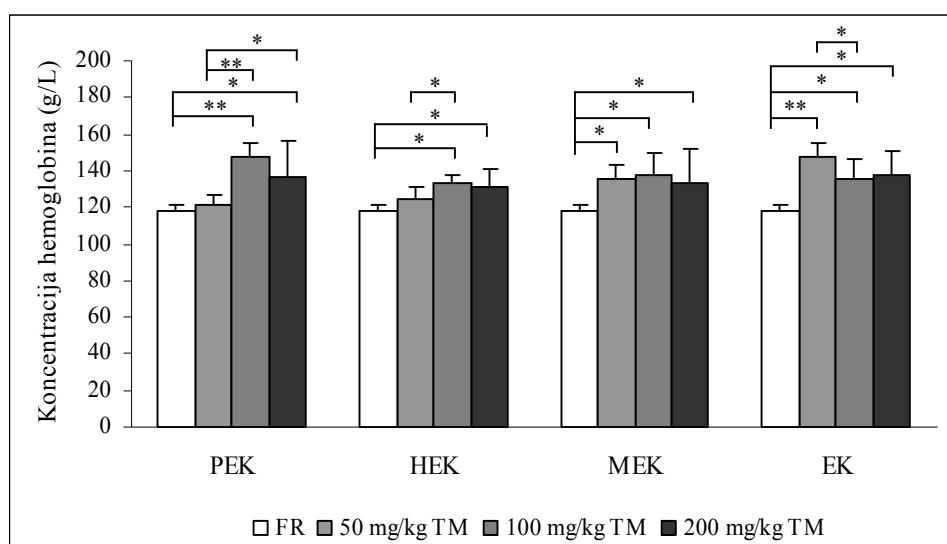
Prema različitim autorima, referentne vrednosti ovih krvnih elemenata za ispitivanu kategoriju pacova iznose: $969 \pm 185 \times 10^9/L$ Jain (1993), $923 \pm 294 \times 10^9/L$ kod mužjaka i $949 \pm 149 \times 10^9/L$ kod ženki (Moore, 2000), $450-885 \times 10^9/L$ (Pritchett i Corning, 2004), $702-1074 \times 10^9/L$ (Liberati i sar., 2004). Odstupanje prosečnog broja trombocita u krvi, u odnosu na fiziološke vrednosti navedene od većine autora, zabeleženo je u grupama PEK 100 ($1198,57 \pm 110,36 \times 10^9/L$), MEK 50 ($1018,43 \pm 94,10 \times 10^9/L$), EK 50 ($370,57 \pm 139,85 \times 10^9/L$) i DM1+MEK100 ($394,29 \pm 140,55 \times 10^9/L$). Srednje vrednosti broja trombocita ostalih oglednih grupa su se kretale od $420,86 \pm 60,95 \times 10^9/L$ u grupi DM1+EK100 do $897,43 \pm 118,41 \times 10^9/L$ u grupi PEK 200.

Rezultati ispitivanja uticaja više doza različitih ekstrakata i vodenog i metanolnog ekstrakta kukureka aplikovanih 24h nakon trokratnog tretmana pacova deksametazonom, na broj trombocita u krvi, su u skladu sa rezultatima Ristoske (2002) i Ristoske i sar. (2002). Ovi autori su utvrdili da prosečan broj trombocita ostaje u

granicama referentnih vrednosti 24h posle tretmana nazimica ekstraktom podzemnih organa *H. odoratus* W. et K. Rezultati dobijeni u ovom ogledu su u saglasnosti i sa našim ranije dobijenim rezultatima, kada smo utvrdili da je broj trombocita kod svih oglednih grupa tretiranih vodenim ekstraktom podzemnih organa kukureka, bio u granicama referentnih vrednosti, od kojih su odstupale samo grupe kod kojih je efekat praćen nakon 48h i 72h (Davidović, 2006). Tosevski i sar. (2004) su zabeležili dugotrajni efekat ekstrakta cele biljke *H. odoratus* W. et K. na broj trombocita, koji se kod prasadi u uzrastu od 52 dana manifestovao smanjenjem broja trombocita 14 dana posle aplikovanja za 42% i posle 21 dana za 73%.

6.1.12. Koncentracija hemoglobina (Hb g/L)

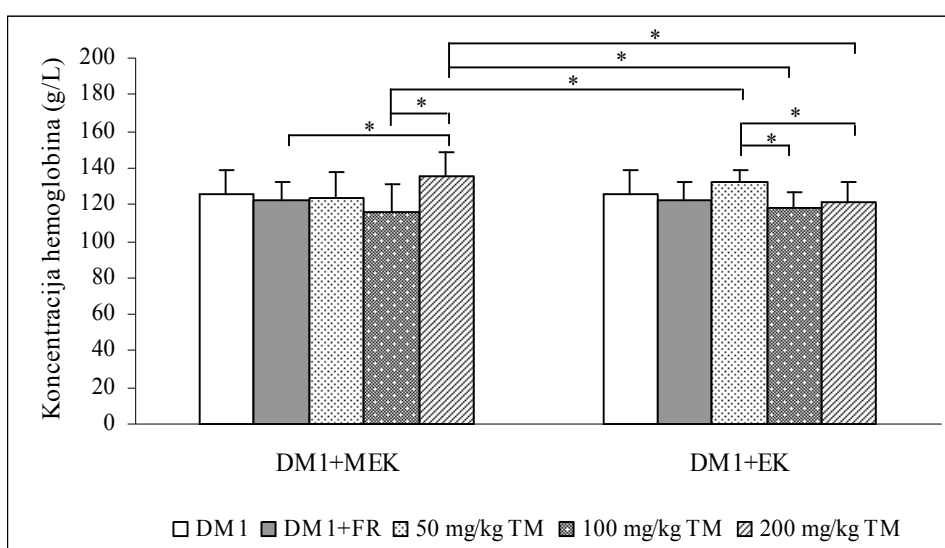
U krvi kontrolne grupe pacova prosečna koncentracija hemoglobina je iznosila $118,14 \pm 2,41$ g/L. Sve ogledne grupe su imale veće vrednosti ovog parametra u odnosu na kontrolnu grupu, a razlike su bile statistički značajne na nivou $P < 0,05$ u odnosu na grupe PEK 200, HEK 100 i 200, MEK 50, 100 i 200, EK 100 i 200 i na nivou $P < 0,01$ u odnosu na grupe PEK 100 i EK 50. Signifikantno niže vrednosti su utvrđene u grupi PEK 50 u poređenju sa PEK 100 ($P < 0,01$) i PEK 200 ($P < 0,05$), HEK 50 u odnosu na HEK 100 ($P < 0,05$), EK 100 u odnosu na EK 50 ($P < 0,05$) (Grafikon 6.1.12.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.12.A. Koncentracija hemoglobina (g/L) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Grupe koje su nakon trokratne aplikacije deksametazona, jednokratno tretirane sa 200 mg/kg TM metanolnog ili 50 mg/kg TM vodenog ekstrakta imale su statistički značajno veću prosečnu vrednost koncentracije hemoglobina nego grupe DM1+MEK100, DM1+EK100 i DM1+EK200 ($P<0,05$), a na istom nivou značajnosti je i veća vrednost sadržaja hemoglobina kod grupe DM1+MEK200 u odnosu na grupu koja je nakon trokratne aplikacije deksametazona tretirana fiziološkim rastvorom. Male razlike između ostalih ispitivanih grupa nisu bile signifikantne ($P>0,05$) (Grafikon 6.1.12.B).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Grafikon 6.1.12.B. Koncentracija hemoglobina (g/L) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Koncentracija hemoglobina u krvi kontrolne i oglednih grupa pacova je tokom oglada bila u granicama fizioloških vrednosti koje su po navodima Carpentera i sar. (2001) 120-180 g/L i Pritcheta i Corninga (2004) 115-160 g/L, a niža od referentnih vrednosti koje su publikovali Jain (2003) (152 ± 8 g/L), Moore (2000) (143 ± 10 g/L kod mužjaka i 143 ± 11 g/L kod ženki) i Liberati i sar. (2004) (141-161 g/L). Tosevski i sar. (1999, 2004) su takođe konstatovali hemoglobinemiju u okviru fizioloških granica, kod prasadi u uzrastu od 35 dana, pre kao i 7. i 14. dana posle aplikovanja ekstrakta cele biljke *H. odoratus* W. et K., a Ristoska (2002) i Ristoska i sar. (2002) su došli do istih rezultata 24h nakon tretmana nazimica ekstraktom podzemnih organa iste biljne vrste. Rezultati dobijeni u ovom ogledu su u saglasnosti sa publikovanim rezultatima naših prethodnih istraživanja. Koncentracija hemoglobina se povećala 24h nakon SC, IP ili

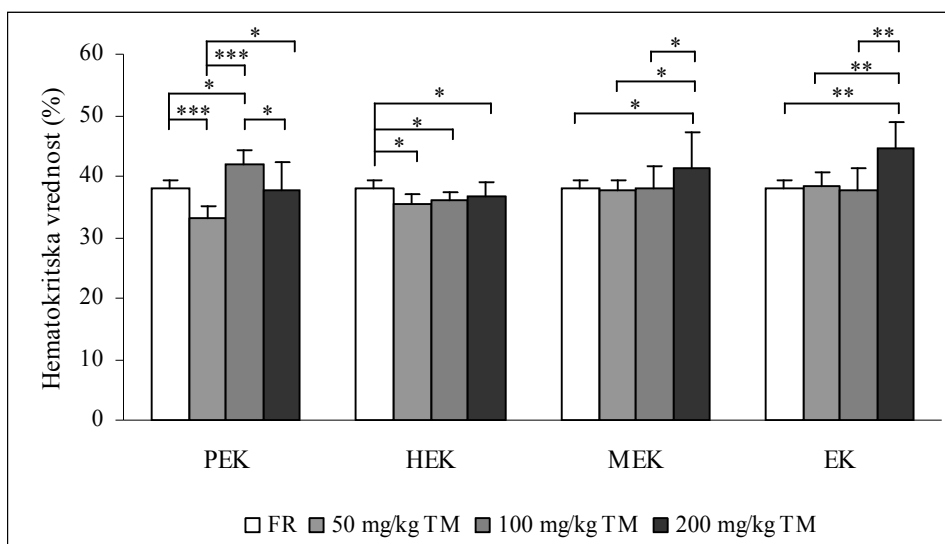
IM aplikacije razblaženog ekstrakta kukureka u odnosu na kontrolnu grupu pacova, a dobijene vrednosti su bile u granicama fizioloških (Davidović i sar., 2007-a). Veća koncentracija hemoglobina je registrovana i 24h posle aplikovanja 10 mg/100 g TM vodenog ekstrakta rizoma i korena kukureka i dijalizata ekstrakta u poređenju sa kontrolnom grupom pacova, a smanjenje vrednosti ovog parametra u odnosu na kontrolu i grupu 24 nakon tretmana ekstraktom je utvrđeno u toku vremena (nakon 48h $P>0,05$; nakon 72h $P<0,01$ odn. $P<0,001$) i 24h posle aplikovanja inaktivisanog ($P<0,05$ odn. $P<0,01$) ili denaturisanog ($P>0,05$) ekstrakta (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-c).

Naši rezultati dobijeni 24h nakon aplikovanja različitih doza ekstrakata kukureka su u skladu sa rezultatima Bogdana i sar. (1989, 1990-a) koji su utvrdili da se koncentracija hemoglobina u krvi goveda značajno povećala 24h i 48h posle transkutanog postavljanja rizoma *H. purpurascens* W. et K. Istovremeno, rezultati koje smo dobili 24h nakon tretmana pacova deksametazonom u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom i ekstraktom (osim DM1+MEK 200 i DM1+EK50), su u skladu sa rezultatima prethodno navedenih autora, koji su zabeležili smanjenje vrednosti ovog parametra kod konja i ovaca 24h, 48h, 96h i 144h posle implantacije rizoma. Smanjenje koncentracije hemoglobina su utvrdili i Tosevski i sar. (2004) 14. i 21. dana posle aplikacije ekstrakta cele biljke *H. odoratus* W. et K. prasadima u starosti od 52 dana u proseku za 11%, kao i Davidović i sar. (2007-b) 24h nakon tretmana pacova ekstraktom podzemnih organa prethodno navedene biljne vrste u koncentraciji od 0,5, 5 i 20 mg/100 g TM.

6.1.13. Hematokritska vrednost (Hct %)

Prosečna hematokritska vrednost utvrđena kod kontrolne grupe pacova ($38,11\pm 1,11\%$) je bila značajno veća nego u grupama PEK 50 ($P<0,001$), HEK 50, 100 i 200 ($P<0,05$), a manja u poređenju sa PEK 100 ($P<0,05$), MEK 200 ($P<0,05$) i EK 200 ($P<0,01$), dok je kod ostalih grupa tretiranih ekstraktom zabeležena niža vrednost (osim EK 50), ali razlike nisu bile signifikantne. Najveća hematokritska vrednost je registrovana kod PEK 100 ($41,99\pm 2,28\%$), a razlike između grupa kojima su aplikovane različite doze petroletarskog ekstrakta su statistički značajne na nivou $P<0,05$ i $P<0,001$.

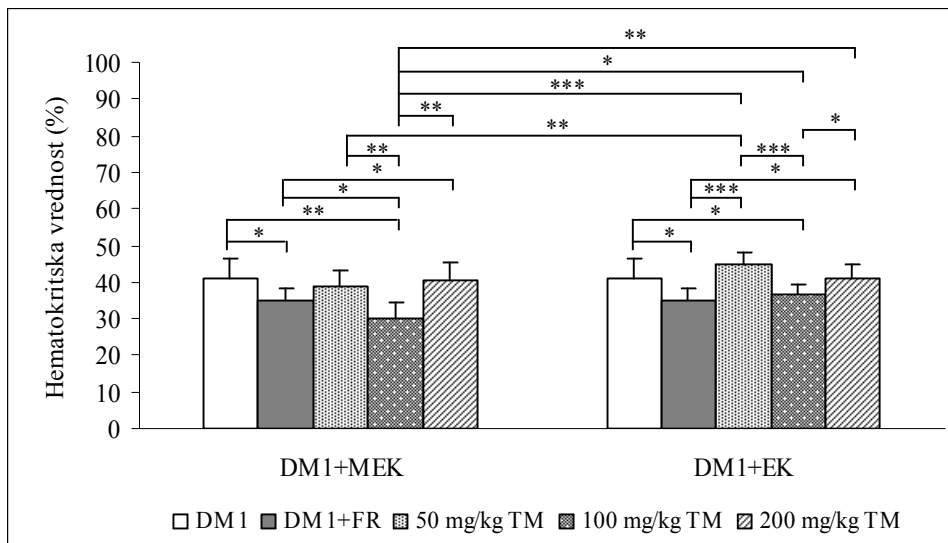
Male razlike u vrednosti ovog parametra između grupa kojima su aplikovane različite doza hloroformskog ekstrakta nisu značajne. Hematokrit registrovan kod MEK 200 i EK 200 je signifikantno veći u poređenju sa grupama koje su tretirane nižim dozama ovih ekstakata ($P < 0,05$ i $P < 0,01$) (Grafikon 6.1.13.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.13.A. Hematokritska vrednost (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Hematokritska vrednost u grupi pacova kojoj je trokratno aplikovan deksametazon je iznosila $41,20 \pm 5,09\%$ i bila statistički značajno veća u odnosu na vrednosti utvrđene kod grupa DM1+FR ($P < 0,05$), DM1+MEK100 ($P < 0,01$) i DM1+EK100 ($P < 0,05$). Prosečna vrednost ovog parametra kod pacova koji su nakon deksametazona dobili fiziološki rastvor ($35,10 \pm 3,39\%$) je značajno viša u odnosu na grupu DM1+MEK100 ($P < 0,05$), a niža nego kod grupa DM1+MEK200 i DM1+EK200 ($P < 0,05$) i DM1+EK50 ($P < 0,001$). Hematokrit se u grupama koje su nakon deksametazona tretirane različitim dozama metanolnog ili vodenog ekstrakta kretao od $30,13 \pm 4,53\%$ kod DM1+MEK100 do $45,01 \pm 2,82\%$ kod DM1+EK50, a razlike su bile na različitim nivoima značajnosti, od $P < 0,05$ do $P < 0,001$ (Grafikon 6.1.13.B.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.1.13.B. Hematokritska vrednost (%) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

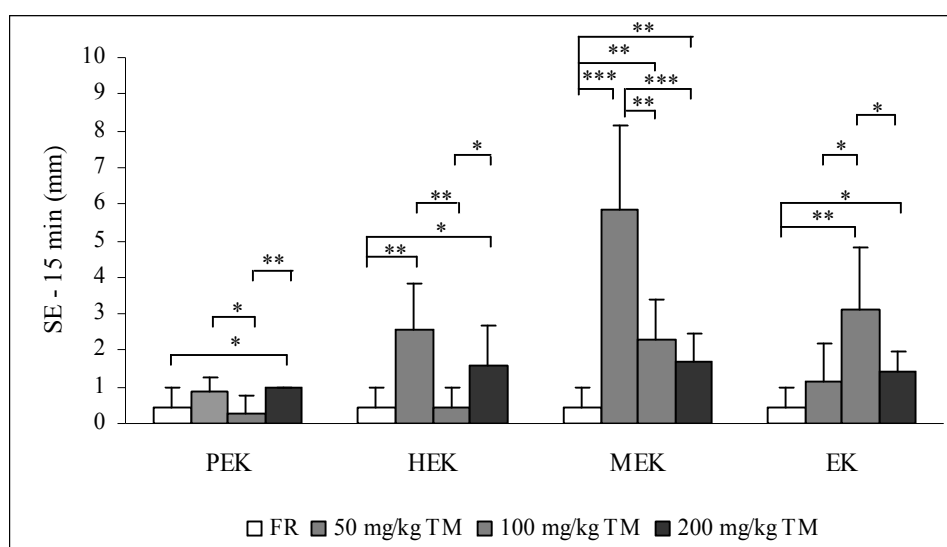
Hematokritske vrednosti u krvi pacova ispitivanih grupa su bile bliže donjim referentnim vrednostima i kretale su se u granicama fiziološkog opsega koje su izneli Carpenter i sar. (2001) (35-45%) i Pritchett i Corning (2004) (37-49%), a nešto niže nego što navode Jain (1993) ($47 \pm 2\%$), Moore (2000) ($48 \pm 2\%$) i Liberati i sar. (2004) (40-47%). Rezultati dobijeni u ovom ogledu su u skladu sa rezultatima Ristoske (2000) i Ristoske i sar. (2000), koji su utvrdili da je kod nazimica srednja vrednost hematokrita neznatno iznad minimalne referentne vrednosti, 24h posle aplikacije ekstrakta rizoma i korena *H. odorus* W. et K. Relativno male razlike ($P > 0,05$) u prosečnim hematokritskim vrednostima su zabeležene i 24h nakon SC, IP ili IM aplikacije razblaženog ekstrakta podzemnih organa kukureka u odnosu na kontrolnu grupu pacova, kao i između samih oglednih grupa, a dobijene vrednosti su bile u granicama fizioloških (Davidović i sar., 2007-a). Smanjenje hematokrita kod pacova je utvrđeno i 24h posle primene vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. u dozi 0,5, 5 ili 20 mg/100 g TM, pri čemu je razlika u odnosu na kontrolnu grupu bila signifikantna samo posle aplikovanja najveće doze ekstrakta (Davidović i sar., 2007-b). Ogledne grupe pacova su 24h nakon aplikovanja prethodno navedenog ekstrakta u dozi 10 mg/100 g TM ili dijalizata ekstrakta imale nešto veće vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu ($P > 0,05$), ali one su takođe bile u fiziološkim granicama. Značajno niži Hct je zabeležen 72h posle primene ekstrakta i 24h posle aplikovanja denaturisanog ekstrakta u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)

i grupu 24h posle aplikovanja nativnog ekstrakta kukureka ($P < 0,001$) (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-c).

6.2. PARAMETRI AKUTNE ZAPALJENSKE REAKCIJE

6.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita u krvi (SE)

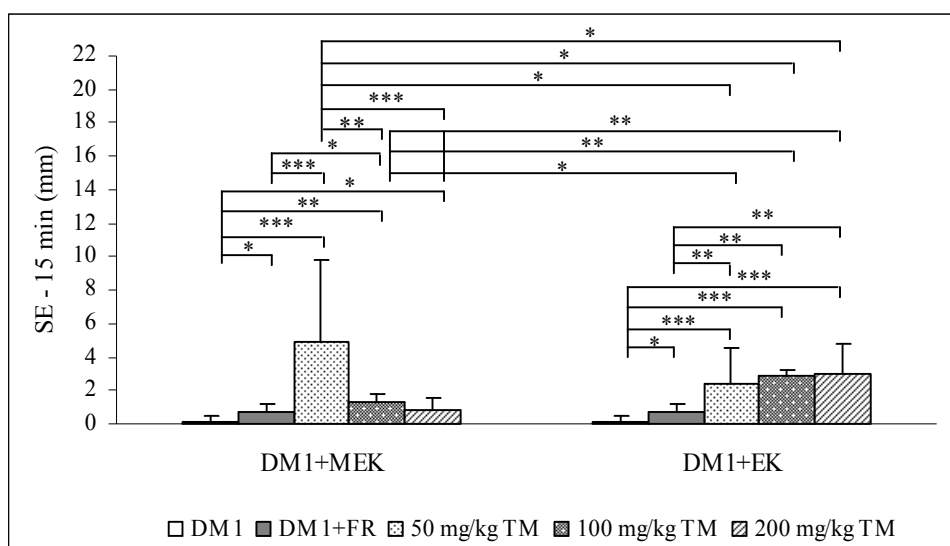
Srednja vrednost brzine sedimentacije eritrocita posle 15 min u krvi kontrolne grupe pacova je iznosila $0,43 \pm 0,53$ mm i bila niža u odnosu na ove vrednosti kod svih oglednih grupa tretiranih ekstraktima kukureka ($P > 0,05$ do $P < 0,001$), osim PEK 100 i HEK 100. Najniže prosečne vrednosti SE - 15 min zabeležene kod PEK 100 ($0,29 \pm 0,49$ mm) i HEK 100 ($0,43 \pm 0,53$ mm) su bile signifikantno manje nego kod ostalih grupa tretiranih ovim ekstraktima ($P < 0,05$ i $P < 0,01$). Najveća prosečna vrednost SE - 15 min je utvrđena kod grupe MEK 50 ($5,86 \pm 2,27$ mm) i ta vrednost je bila značajno veća u odnosu na grupe kojima su aplikovane veće doze metanolnog ekstrakta (MEK 100, $P < 0,01$; MEK 200 $P < 0,001$). Grupa tretirana sa 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta je imala značajno bržu sedimentaciju eritrocita u odnosu na ostale dve grupe tretirane vodenim ekstraktom ($P < 0,05$) (Grafikon 6.2.1.A.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.1.A.A. Brzina sedimentacije posle 15 min (mm) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Između vrednosti SE - 15 min u krvi pacova 24h posle trokrotnog aplikovanja deksametazona ($0,14 \pm 0,38$ mm) i ove vrednosti u grupi koja je četvrtog dana ogleda dobila fiziološki rastvor ($0,71 \pm 0,49$ mm), utvrđena je signifikantna razlika ($P < 0,05$). U odnosu na prethodno navedene grupe, statistički značajno brža SE - 15 min je konstatovana u grupama koje su četvrtog dana dobile različite doze metanolnog ili vodenog ekstrakta (na nivoima značajnosti od $P < 0,05$ do $P < 0,001$). Najveća vrednost ovog parametra je registrovana kod grupe DM1+MEK50 ($4,86 \pm 4,91$ mm), a kod ostalih grupa se kretala od $0,86 \pm 0,69$ mm (DM1+MEK200) do $3,00 \pm 1,83$ mm (DM1+EK200), pri čemu su utvrđene razlike bile značajne ($P < 0,05$) do visoko značajne ($P < 0,001$). Razlika u vrednostima sedimentacije kod grupa koje su primile različite doze vodenog ekstrakta (50, 100 ili 200 mg/kg TM) nije bila signifikantna ($P > 0,05$) (Grafikon 6.2.1.A.B.).

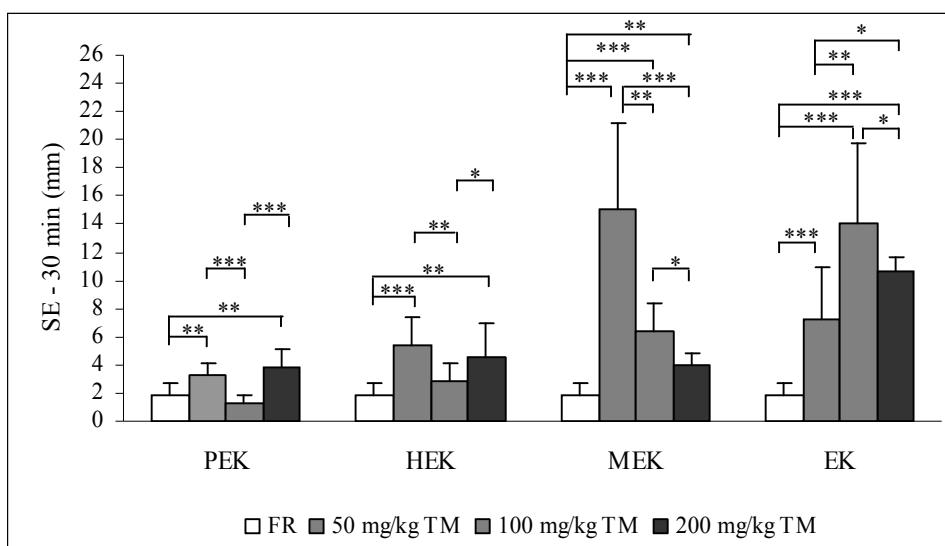


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.1.A.B. Brzina sedimentacije posle 15 min (mm) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Prosečna vrednost SE - 30 min u kontrolnoj grupi je bila $1,86 \pm 0,90$ mm, što je niže u odnosu na sve ogledne grupe, osim PEK 100, i to na nivou značajnosti od $P < 0,01$ do $P < 0,001$. Najniža SE - 30 min je registrovana kod PEK 100 ($1,29 \pm 0,49$ mm) i HEK 100 ($2,86 \pm 1,21$ mm), a razlike su bile značajne do visoko signifikantne u poređenju sa ostalim grupama tretiranim ovim ekstraktima. Grupa MEK 200 je imala statistički značajno nižu vrednost sedimentacije u odnosu na grupe MEK 50 ($P < 0,001$) i MEK 100

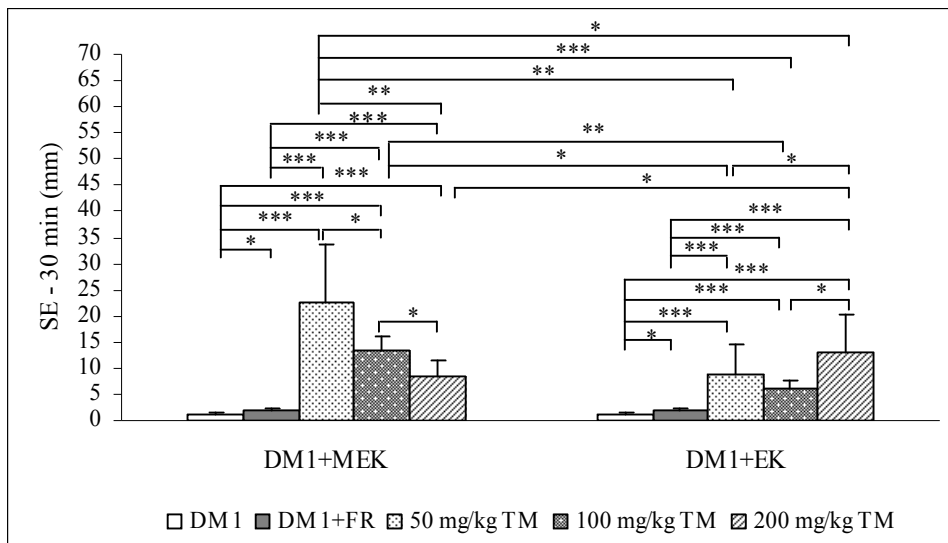
($P < 0,05$), kao i grupa MEK 100 u odnosu na grupu MEK 50 ($P < 0,01$), kod koje je utvrđena i najveća SE - 30 min ($15,00 \pm 6,14$ mm). Signifikantno veća srednja vrednost SE - 30 min je uočena u grupi EK 100 nego u grupama tretiranim sa 50 i 200 mg/kg TM ekstrakta ($P < 0,01$ i $P < 0,05$) i kod grupe EK 200 u odnosu na grupu EK 50 ($P < 0,05$) (Grafikon 6.2.1.B.A.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.1.B.A. Brzina sedimentacije posle 30 min (mm) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Značajno brža sedimentacija eritrocita posle 30 min ($P < 0,05$) je utvrđena kod grupe DM1+FR ($1,86 \pm 0,38$ mm) nego kod DM1 ($1,14 \pm 0,38$ mm), a u odnosu na ove vrednosti, visoko signifikantno povećanje SE - 30 min je konstatovano kod grupa koje su posle trokratnog aplikovanja deksametazona četvrtog dana tretirane sa 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta ($P < 0,001$). Kao i nakon 15 min, najveća vrednost ovog parametra posle 30 min je registrovana kod grupe DM1+MEK50 ($22,43 \pm 11,16$ mm) i značajno se razlikovala od DM1+MEK100 ($P < 0,05$). Vrednosti zabeležene kod ove dve grupe su bile veće u odnosu na ostale ispitivane grupe, ali na različitim nivoima značajnosti, od $P < 0,05$ do $P < 0,001$. Signifikantno veća vrednost SE - 30 min ($P < 0,05$) je bila u krvi pacova koji su nakon deksametazona dobili 200 mg/kg TM vodenog ekstrakta kukureka, u odnosu na grupe DM1+MEK200, DM1+EK50 i DM1+EK100, između kojih su postojale male, nesignifikantne razlike ($P > 0,05$) (Grafikon 6.2.1.B.B.).

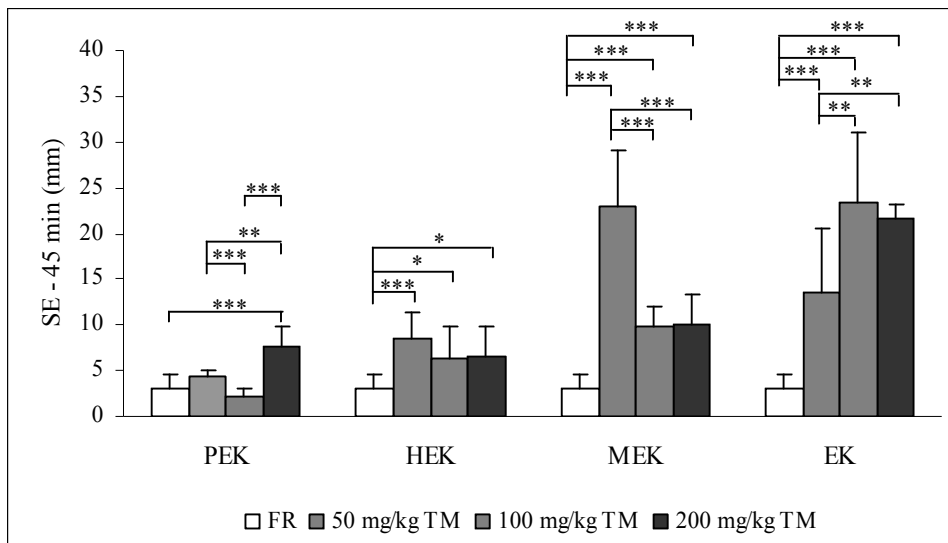


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.1.B.B. Brzina sedimentacije posle 30 min (mm) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

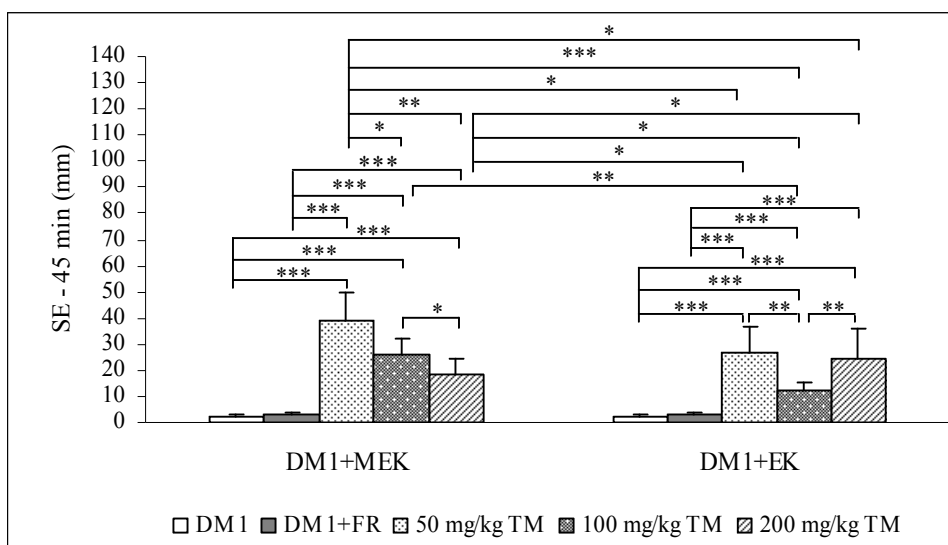
Rezultati ispitivanja srednjih vrednosti SE - 45 min su ukazali da je najniža vrednost sedimentacije i dalje bila kod grupe PEK 100 ($2,29 \pm 0,76$ mm) i kontrolne grupe ($3,14 \pm 1,46$ mm), a utvrđene razlike u odnosu na ostale ogledne grupe su bile na nivou značajnosti od $P > 0,05$ do $P < 0,001$. Između grupa kojima su aplikovane različite doze hloroformskog ekstrakta nisu zapažene statistički značajne razlike ($P > 0,05$). Razlika veće vrednosti SE - 45 min uočene u grupi MEK 50 bila je visoko značajna u odnosu na preostale dve ogledne grupe kojima je aplikovan metanolni ekstrakt ($P < 0,001$). Statistički vrlo značajne razlike su postojale između grupe EK 50 u odnosu na grupe EK 100 i EK 200 ($P < 0,01$), pri čemu je grupa EK 50 imala nižu vrednost ovog parametra (Grafikon 6.2.1.C.A.).

U odnosu na grupe DM1 i DM1+FR, između kojih razlika nije značajna ($P > 0,05$), konstatovana je statistički značajno brža SE - 45 min ($P < 0,001$) u grupama kojima je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana su dobile metanolni ili vodeni ekstrakt u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM. Najveća vrednost sedimentacije posle 45 min je utvrđena kod grupe DM1+MEK50 ($38,71 \pm 10,89$ mm), a najniža kod DM1+EK100 ($12,00 \pm 3,56$ mm). Vrednosti zabeležene kod grupa tretiranih metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka nakon trokratne aplikacije deksametazona, su bile različite, a utvrđene razlike na nivou značajnosti od $P < 0,05$ do $P < 0,001$ (Grafikon 6.2.1.C.B.).



*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.2.1.C.A. Brzina sedimentacije posle 45 min (mm) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

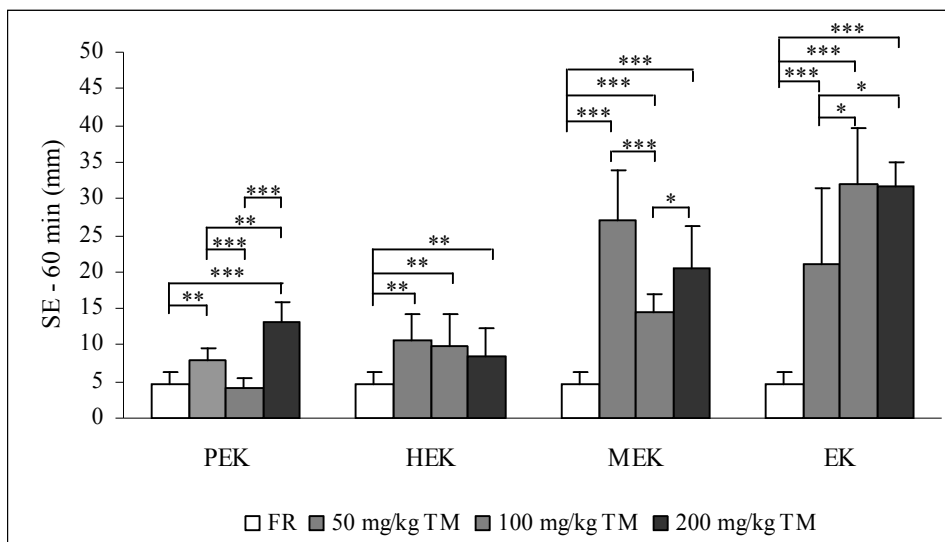


*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.2.1.C.B. Brzina sedimentacije posle 45 min (mm) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Prosečna vrednost sedimentacije eritrocita i nakon 60 min je bila najniža u grupi PEK 100 ($4,00 \pm 1,41$ mm) i kontrolnoj grupi ($4,57 \pm 1,62$ mm), a utvrđene razlike u odnosu na grupe tretirane različitim ekstraktima kukureka su bile na nivou značajnosti $P < 0,01$ i $P < 0,001$. Razlike ovog parametra između oglednih grupa posle primene 50, 100 ili 200 mg/kg TM hloroformskog ekstrakta nisu bile statistički signifikantne

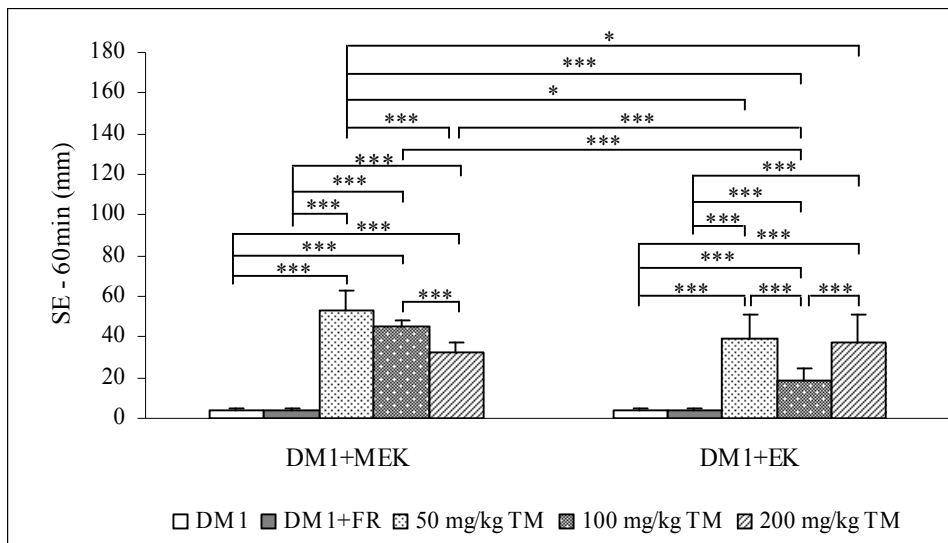
($P>0,05$). Ustanovljena je statistički značajno niža vrednost sedimentacije u krvi grupe MEK 100 u odnosu na MEK 50 ($P<0,001$) i MEK 200 ($P<0,05$), kao i u krvi grupe EK 50 ($P<0,05$) u odnosu na EK 200 i EK 100, kod koje je zabeležena najveća SE - 60 min ($31,86\pm 7,76$ mm) (Grafikon 6.2.1.D.A.).



* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Grafikon 6.2.1.D.A. Brzina sedimentacije posle 60 min (mm) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Niske srednje vrednosti SE - 60 min utvrđene kod grupe DM1 ($3,86\pm 0,69$ mm) i DM1+FR ($4,14\pm 0,69$ mm) su se malo razlikovale, a u odnosu na njih, značajno povećanje ove vrednosti je utvrđeno kod grupa kojima je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana po 50, 100 ili 200 mg/kg TM metanolnog ili vodenog ekstrakta ($P<0,001$). Kao i posle 30 i 45 min, najbrža sedimentacija nakon 60 min je zabeležena u grupi DM1+MEK50 ($52,86\pm 10,46$ mm), koja se od ostalih grupa razlikovala na nivou $P>0,05$ do $P<0,001$, a najsporija u grupi DM1+EK100 ($18,86\pm 5,37$ mm) i ta vrednost je bila visoko značajno niža nego kod ostalih grupa ($P<0,001$). Veća vrednost brzine sedimentacije na nivou značajnosti $P<0,001$ je zabeležena i u grupi DM1+MEK100 u odnosu na DM1+MEK200, a između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene male razlike ($P>0,05$) (Grafikon 6.2.1.D.B.).



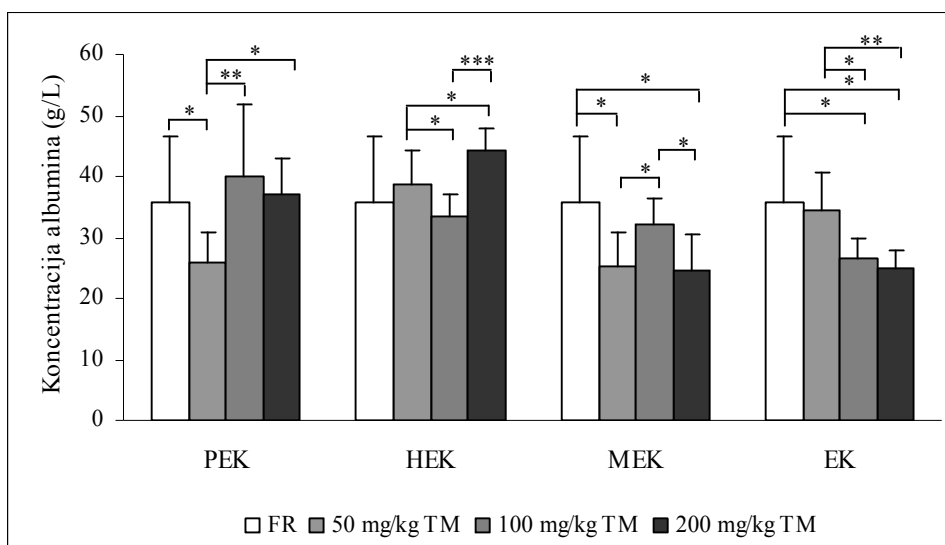
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.2.1.D.B. Brzina sedimentacije posle 60 min (mm) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Kod glodara, opšti odgovor na akutno zapaljenje karakterišu složene promene koncentracije proteina u plazmi, povećanje brzine sedimentacije eritrocita i ukupnog broja leukocita, smanjenje hematokrita, dok se telesna temperatura menja vrlo malo ili se ne menja (Schreiber i sar., 1989). Srednje vrednosti brzine sedimentacije tokom ogleđa u krvi ogleđnih grupa pacova su bile veće od referentnih vrednosti, koje kao krajnje niske, navodi veći broj autora: Schermer (1967) 0,7 mm/h kod mužjaka i 1,8 mm kod ženki, Zingg i sar. (1971) 1,0-2,5 mm/h (prosečno 1,5 mm/h) kod mužjaka, i Mitruka i Rawnsley (1981) 0,68-1,76 mm/h (prosečno 1,22±0,27 mm/h) kod mužjaka i 0,58-1,62 mm/h (prosečno 1,10±0,26 mm/h) kod ženki pacova. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima naših ranijih ispitivanja, kada je utvrđeno da su značajno bržu sedimentaciju u svim posmatranim intervalima (posle 15, 30, 45, 60 i 120 min) u odnosu na kontrolnu grupu pacova, imali eritrociti ogleđnih grupa kojima je aplikovano po 10 mg/100 g TM vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus* W. et K. i efekat praćen u toku vremena (24, 48 i 72h), kao i inaktivisani, denaturisani ili dijalizat ekstrakta u prethodno navedenoj dozi (Davidović, 2006).

6.2.2. Koncentracija albumina u krvnoj plazmi (Alb g/L)

Koncentracija albumina u krvnoj plazmi kontrolne grupe pacova ($35,86 \pm 10,64$ g/L) je bila manja u odnosu na ogledne grupe tretirane petroletarskim ili hloroformskim ekstraktom (osim PEK 50, $P < 0,05$; HEK 100, $P > 0,05$), ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Kod svih grupa kojima su aplikovane različite doze metanolnog ili vodenog ekstrakta, zabeležene su niže vrednosti ovog parametra u odnosu na kontrolnu grupu, a signifikantne razlike su bile na nivou značajnosti od $P < 0,05$ u poređenju sa MEK 50, MEK 200, EK 100 i EK 200. Prosečna koncentracija albumina se značajno razlikovala kod grupa tretiranih različitim ekstraktima kukureka, a međugrupne razlike ovih vrednosti su se kretale od značajnih ($P < 0,05$) do visoko značajnih ($P < 0,001$). Najniža koncentracija ovog negativnog proteina akutne faze zapaljenja je registrovana u grupama kojima je aplikovana najveća doza metanolnog (MEK 200, $24,71 \pm 5,85$ g/L) ili vodenog ekstrakta (EK 200, $25,00 \pm 3,00$ g/L) (Grafikon 6.2.2.A.).

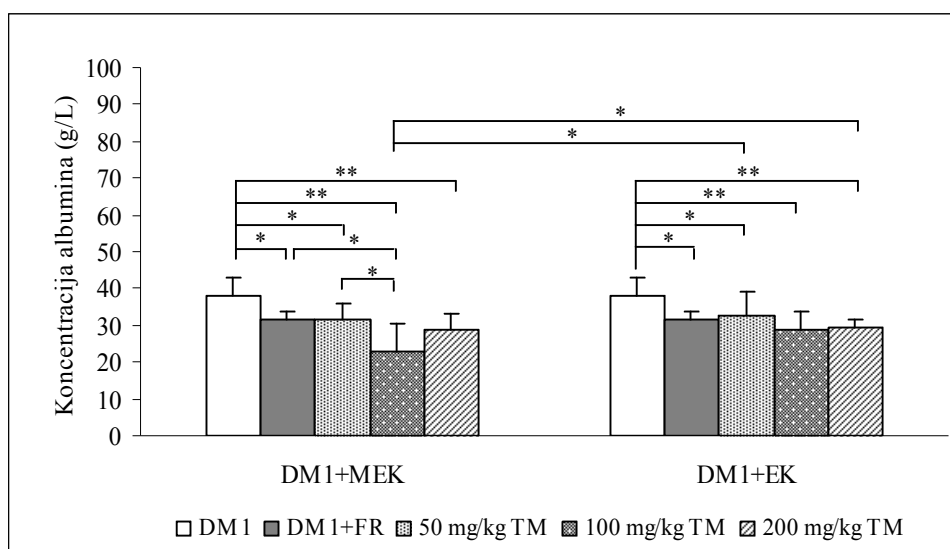


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.2.A. Koncentracija albumina (g/L) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Veća srednja vrednost koncentracije albumina u krvnoj plazmi je utvrđena kod grupe pacova koja je tri dana dana dobijala deksametazon ($37,86 \pm 5,21$ g/L), u odnosu na grupe kojima je trokratno aplikovan DM, a četvrtog dana su tretirane fiziološkim rastvorom, metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi 50 mg/kg TM ($P < 0,05$), 100 ili 200 mg/kg TM ($P < 0,01$). Vrednost ovog parametra kod grupe DM1+FR ($31,43 \pm 2,15$

g/L) je bila niža nego kod DM1+EK50 (32,57±6,80 g/L), a veća nego kod ostalih ispitivanih grupa, ali je razlika bila značajna samo u odnosu na DM1+MEK100 (P<0,05). Najmanja koncentracija albumina je zabeležena u grupi DM1+MEK100 (22,57±8,02 g/L), a razlika između ove i vrednosti zabeleženih kod grupa DM1+MEK50, DM1+EK50 i DM1+EK200 je bila signifikantna (P<0,05). Između ostalih ispitivanih grupa su utvrđene male razlike, koje nisu bile statistički značajne (P>0,05) (Grafikon 6.2.2.B.).



*P<0,05; **P<0,01

Grafikon 6.2.2.B. Koncentracija albumina (g/L) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Nakon oštećenja tkiva, infekcija ili fizičkih trauma, aktiviraju se mehanizmi čiji je cilj da se spreče dalje povrede, izoluju i eliminišu infektivni agensi i aktiviraju reparatorni procesi, kako bi se omogućilo normalno funkcionisanje organizma. Nastaje rani odbrambeni akutni inflamatorni odgovor (APR-acute phase response), koji je ključni deo urođenog imunskog odgovora svih životinjskih vrsta. Za praćenje zapaljenskih procesa ne treba posmatrati samo jedan protein akutne faze (APP-acute phase protein), već APP indeks koji obuhvata i pozitivne i negativne APP, kao i APP koji se povećavaju i brzo i sporo, čime se formira sveobuhvatni indeks koji je u korelaciji sa težinom zapaljenskog procesa.

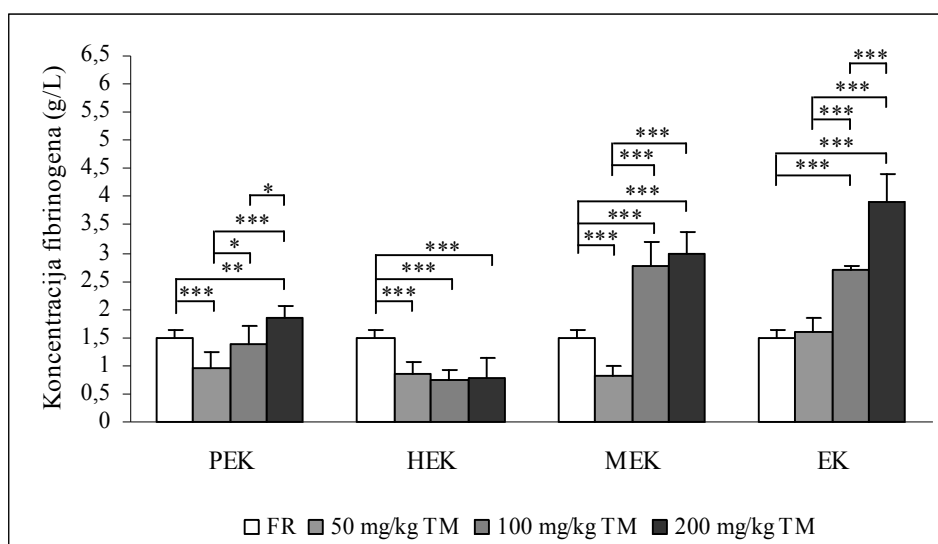
Albumini su u skoro svih životinjskih vrsta glavni negativni proteini akutne faze zapaljenja, čija se koncentracija u krvi smanjuje, usled selektivnog gubitka albumina

zbog promena u bubrezima ili gastrointestinalnom traktu ili zbog smanjene sinteze u jetri (Cray i sar., 2009). Određivanjem koncentracije albumina u krvnoj plazmi kontrolne i oglednih grupa pacova, dobijeni su nešto niži rezultati od fizioloških vrednosti, koje po navodima više autora iznose: 38-48 g/L (Carpenter i sar., 2001), 33-49 g/L (Pritchett i Corning, 2004) i 44,4-58,4 g/L (Liberati i sar., 2004). Rezultati dobijeni 24h nakon aplikovanja metanolnog i vodenog ekstrakta ili deksametazona u kombinaciji sa ovim ekstraktima, su u skladu sa rezultatima Hajrulai (2001) i Hajrulai i sar. (2002) koji su utvrdili da intramuskularni tretman jagnjadi ekstraktom rizoma i korena *H. odorus* W. et K. u dozi od 450 µg/kg TM, uzrokuje smanjenje koncentracije albumina za 6% posle 7 dana ($P < 0,05$) i za 2% posle 14 dana ($P > 0,05$), kao i da se albuminsko-globulinski (A/G) količnik menja u korist globulina (1,2 vs 0,96 vs 1,15). Blago povećanje vrednosti albumina u krvi 24h nakon tretmana pacova petroletarskim i hloroformskim ekstraktom je u saglasnosti sa rezultatima Ristoske (2002) i Ristoske i sar. (2002) koji su zabeležili hiperalbuminemiju kod nazimica 24h posle IM aplikacije ekstrakta podzemnih organa iste biljke. Rezultati ovih autora se razlikuju od rezultata dobijenih u ogledu na pacovima, utoliko što je koncentracija albumina kod nazimica bila za 34% veća od maksimalne referentne vrednosti, a A/G količnik za 64-74% veći u odnosu na fiziološke vrednosti, dok kod pacova između kontrolne i oglednih grupa nisu uočene signifikantne razlike. Tosevski i sar. (2004) su uočili dugotrajan efekat ekstrakta cele biljke *H. odorus* W. et K. na koncentraciju albumina u krvi prasadi, koja je bila povećana 7., 14. i 21. nakon aplikovanja navedenog ekstrakta, a A/G količnik promenjen u korist albumina. U svojim ranijim istraživanjima smo takođe utvrdili manju prosečnu koncentraciju albumina u krvnoj plazmi svih oglednih grupa pacova, nakon aplikovanja vodenog ekstrakta rizoma i korena kukureka, termički tretiranog ekstrakta ili njegovog dijalizata, pri čemu je smanjenje bilo najizraženije posle 24h i 48h (Davidović, 2006).

6.2.3. Koncentracija fibrinogena u krvnoj plazmi (Fb g/L)

Srednja vrednost koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi kontrolne grupe pacova je iznosila $1,50 \pm 0,15$ g/L. Ove vrednosti su kod oglednih grupa tretiranih petroletarskim ili hloroformskim ekstraktom bile značajno manje ($P < 0,001$), sa

izuzetkom PEK 100 koja se nije značajno razlikovala i PEK 200 koja je imala veću koncentraciju od kontrole ($P < 0,01$). Aplikovanje različitih doza metanolnog i vodenog ekstrakta je dovelo do povećanja prosečne koncentracije fibrinogena u tretiranim grupama (od $1,60 \pm 0,23$ g/L do $3,91 \pm 0,48$ g/L), osim u grupi MEK 50 koja je imala manju vrednost ($0,81 \pm 0,18$ g/L), pri čemu su razlike bile statistički visoko značajne ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolu. Prosečna koncentracija fibrinogena u krvnoj plazmi grupa tretiranih petroletarskim ekstraktom se značajno povećavala sa povećanjem aplikovane doze ($P < 0,05$ i $P < 0,001$), dok su vrednosti ovog parametra bile ujednačene 24h nakon aplikovanja različitih hloroformskih ekstrakata ($P > 0,05$). Sa povećanjem aplikovane doze metanolnog i vodenog ekstrakata, povećavala se i koncentracija fibrinogena u plazmi, a utvrđene razlike između grupa su bile na najvišem nivou značajnosti ($P < 0,001$), osim između MEK 100 i MEK 200 ($P > 0,05$) (Grafikon 6.2.3.A.).

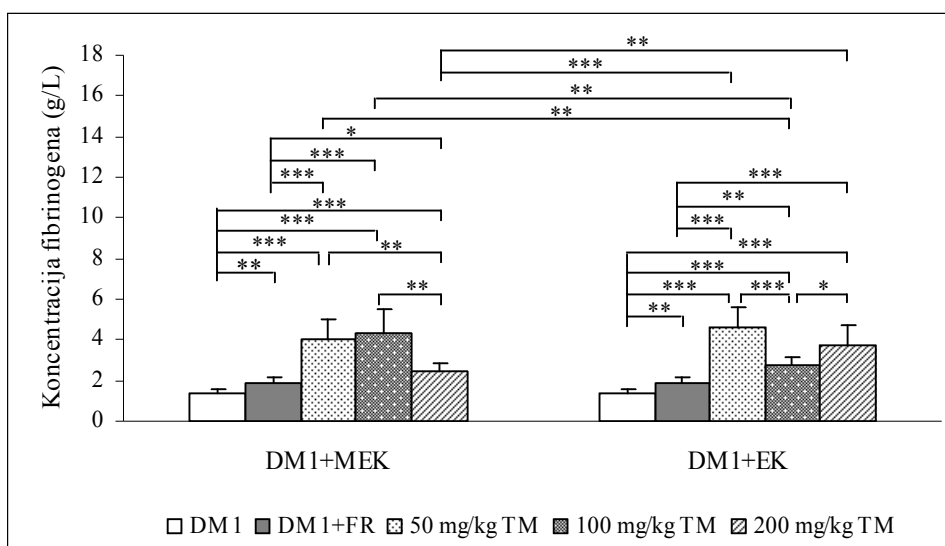


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.3.A. Koncentracija fibrinogena (g/L) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

Prosečna koncentracija fibrinogena u grupi DM1 ($1,36 \pm 0,24$ g/L) je bila značajno manja nego u grupama koje su nakon trokratne aplikacije deksametazona tretirane fiziološkim rastvorom ($P < 0,01$), metanolnim ili vodenim ekstraktom u dozi od 50, 100 ili 200 mg/kg TM ($P < 0,001$). Vrednost ovog parametra u grupi DM1+FR ($1,91 \pm 0,29$ g/L) takođe je bila značajno niža u odnosu na grupe koje su dobile ekstrakt kukureka, ali na različitom nivou značajnosti, od $P < 0,05$ do $P < 0,001$. Vrednosti

zabeležene kod grupa tretiranih metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka nakon trokratne aplikacije deksametazona su se kretale od $2,43 \pm 0,43$ g/L u grupi DM1+MEK200 do $4,64 \pm 0,93$ g/L u grupi DM1+EK50, a nivo značajnosti utvrđenih razlika između pojedinih grupa je bio različit (od $P > 0,05$ do $P < 0,001$) (Grafikon 6.2.3.B.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.3.B. Koncentracija fibrinogena (g/L) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Pozitivni proteini akutne faze su proteini krvi koji se prvenstveno sintetišu u jetri, a njihova koncentracija se povećava u toku akutnog inflamatornog odgovora (APR). Iz aktiviranih makrofaga se oslobađaju proinflamatorni citokini (IL- 1β , IL-6 i TNF- α) i utiču na metabolizam i biosintezu u jetri, regulisanjem ekspresije gena proteina akutne faze koji doprinose odbrani domaćina (Giffen i sar., 2003). Geni za sintezu proteina plazme su aktivni i u različitim ekstrahepatičnim tkivima (horioidni pleksus, placenta, semene vezikule i dr.), koja su uključena u održavanje homeostaze proteina i učestvuju u regulaciji mRNA nivoa za vreme akutne faze zapaljenja (Schreiber i sar., 1989). Obimnija proučavanja APP u veterinarskoj medicini su počela devedesetih godina prošlog veka, od kada se oni koriste za praćenje toka zapaljenskih procesa, neoplazija i stresa, u dijagnostici i prognozi bolesti životinja, a predloženi su i za markere "zdravlja stada" kod velikih životinja. Koncentracija pozitivnih APP se povećava tokom APR, a u zavisnosti od intenziteta rasta klasifikuju se u glavne (rast 10

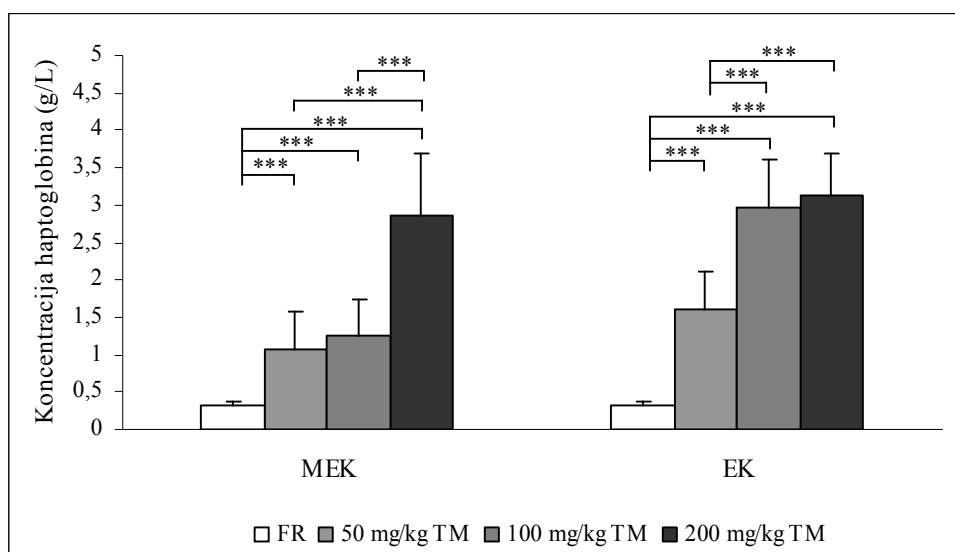
do 100 puta), umerene (rast 2 do 10 puta) i minorne proteine (malo povećanje) (Cray i sar., 2009). Sinteza glavnih proteina je indukovana primarno citokinom IL-1, značajno se povećava u prvih 48h, a zatim naglo opada usled kratkog poluvremena života ovih proteina. Stvaranje druge linije APP, srednjih i minornih proteina, regulišu primarno IL-6, njihova koncentracija se sporije povećava u krvi, ali to povećanje duže traje i mogu se određivati i tokom hroničnih inflamatornih procesa (Petersen i sar., 2004). Proteini akutne faze imaju višestruke funkcije, uključujući modulaciju imunskog sistema, transport proteina i zaštitu tkiva od oštećenja, a razlikuju se kod životinjskih vrsta. Glavni APP kod pacova su α_1 -kiseli glikoprotein i α_2 -makroglobulin, a umereni CRP, fibrinogen i haptoglobin (Petersen i sar., 2004; Cray i sar., 2009).

Fibrinogen je umereni protein akutne faze zapaljenja (koncentracija se povećava 2 do 10 puta), po strukturi je β globulin, koji je važan u reparaciji tkiva, jer predstavlja osnovu za formiranje fibrina (Cray i sar., 2009). Referentne vrednosti za koncentraciju fibrinogena ispitivane kategorije pacova, po navodima više autora, iznose: $2,0 \pm 0,4$ g/L kod mužjaka i $1,9 \pm 0,5$ g/L kod ženki (Moore, 2000), 2,1-2,67 g/L ($2,37$ g/L za mužjake i $1,95$ g/L za ženke) (Car i sar., 2006). Koncentracija fibrinogena utvrđena u krvnoj plazmi kontrolne grupe pacova je u skladu sa datim navodima. Ogledne grupe jednokratno tretirane različitim dozama petroletarskog ili hloroformskog ekstrakta, metanolnim u dozi 50 mg/kg TM, kao i trokratno deksametazonom, su imale niže vrednosti od fizioloških. Kod ostalih ispitivanih grupa, vrednost ovog parametra se kretala iznad gornje granice fiziološkog opsega i ti rezultati su u skladu sa našim ranijim ispitivanjima na Wistar pacovima, kada je utvrđeno da primena vodenog ekstrakta podzemnih organa kukureka rezultira statistički značajnim povećanjem vrednosti fibrinogena, naročito nakon 24h. Kako je značajno povećanje ovog, a i ostalih ispitivanih parametara zapaljenske reakcije, registrovano i u grupama pacova kojima je aplikovan termički tretiran (inaktivisan ili denaturisan) ili dijalizovan ekstrakt, zaključeno je da se akutna zapaljenska reakcija verovatno razvija kao posledica delovanja sastojaka koji ne pripadaju kategoriji proteina veće molekulske mase (Davidović, 2006). Rezultati dobijeni u drugom delu ogleda, u skladu su sa rezultatima više autora (Chinenov i Rogatsky, 2007; Cassol-Jr i sar., 2010; Ngo i sar., 2013; Bonin i sar., 2013), koji navode da deksametazon, kao sintetski kortikosteroid, ima značajno immunosupresivno delovanje, smanjuje transkripciju proinflamatornih gena inhibiranjem

jedarnog faktora transkripcije- κ B (NF- κ B) i sprečava sintezu gotovo svih proinflamatornih citokina, uključujući nekoliko interleukina (IL-1, -2, -3, -6), IFN- γ i TNF- α .

6.2.4. Koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi (Hap g/L)

Koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi kontrolne grupe pacova tretirane fiziološkim rastvorom je iznosila $0,31 \pm 0,06$ g/L. Ova vrednost je bila značajno veća u oglednim grupama 24h posle aplikacije metanolnog ili vodenog ekstrakta u dozi 50, 100 ili 200 mg/kg TM u odnosu na kontrolnu grupu, i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Sa povećanjem aplikovane doze ekstrakta, vrednost ovog parametra u krvi pacova se takođe povećavala (MEK 200, $2,85 \pm 0,83$ g/L; EK 200 $3,12 \pm 0,56$ g/L), a utvrđene razlike su bile na najvećem nivou značajnosti ($P < 0,001$) između grupa MEK 50 i MEK 100 u odnosu na MEK 200, kao i EK 50 u odnosu na EK 100 i EK 200 (Grafikon 6.2.4.A.).

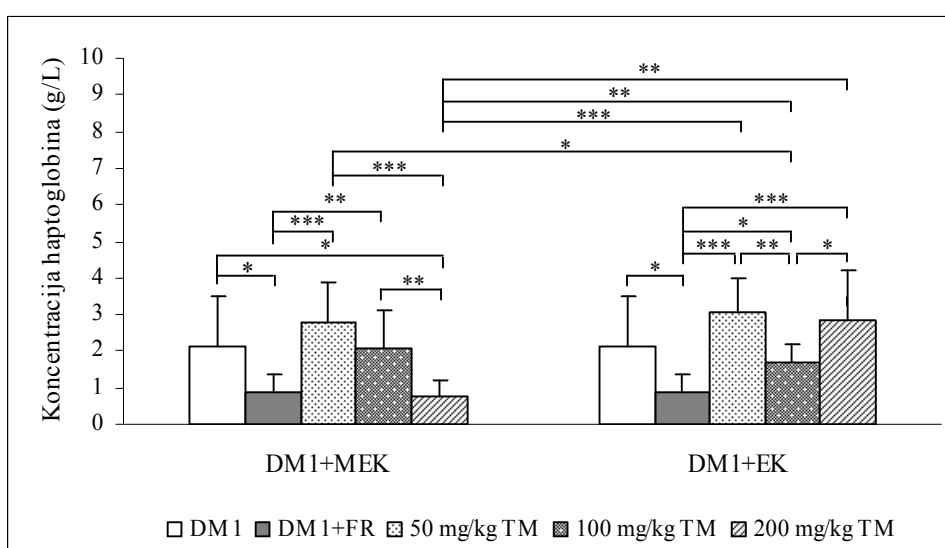


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.4.A. Koncentracija haptoglobina (g/L) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka

U krvnoj plazmi pacova kojima je trokratno aplikovan DM, zabeležena koncentraciju haptoglobina ($2,13 \pm 1,34$ g/L) je bila statistički značajno veća u odnosu na grupe DM1+FR i DM1+MEK200 ($P < 0,05$), dok razlike u odnosu na ostale ispitivane grupe nisu bile signifikantne. Prosečna vrednost haptoglobina kod pacova koji su nakon

DM dobili fiziološki rastvor ($0,88 \pm 0,50$ g/L), bila je značajno niža u odnosu na sve grupe koje su dodatno tretirane metanolnim ili vodenim ekstraktom kukureka, na različitim nivoima značajnosti (od $P < 0,05$ do $P < 0,001$). Razlika nije bila značajna samo u poređenju sa DM1+MEK200 kod koje je zabeležena niža koncentracija. Sa povećanjem aplikovane doze ekstrakata, smanjivala se vrednost ovog parametra, tako da je najveća koncentracija haptoglobina zabeležena u grupi DM1+EK50 ($3,05 \pm 0,96$ g/L), a najniža u grupi DM1+MEK200 ($0,74 \pm 0,44$ g/L) ($P < 0,001$). Utvrđene razlike između ostalih oglednih grupa su se kretale od nesigifikantnih do visoko značajnih (Grafikon 6.2.4.B.).



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.2.4.B. Koncentracija haptoglobina (g/L) kod pacova tretiranih deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

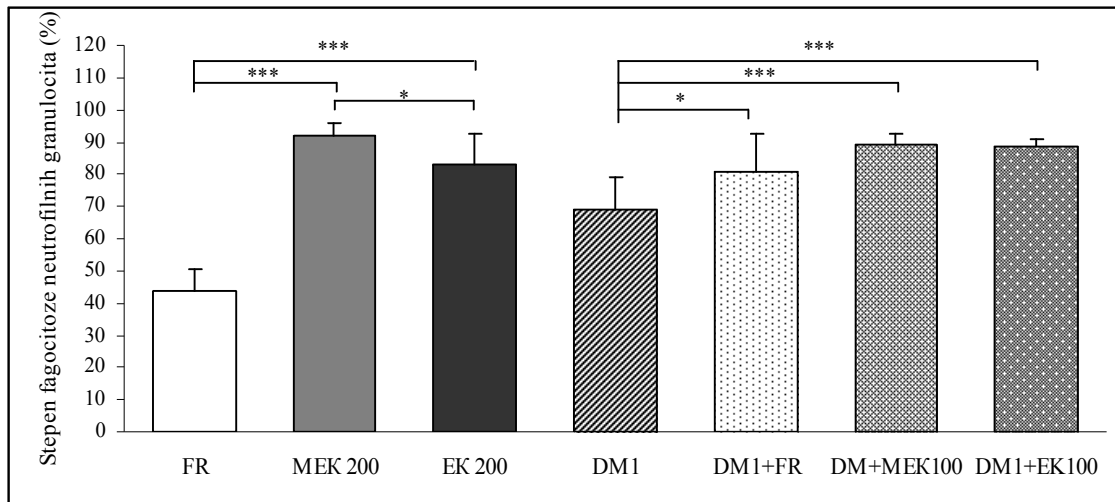
Haptoglobin je heterogeni α_2 -kiseli glikoprotein, koji se sastoji od dva teška glikozilisana β lanca (40 kD) i dva laka α lanca, α_1 (9 kD) i α_2 (16 kD), povezana disulfidnim vezama ($\alpha\beta$)₂. Postoje tri glavna tipa haptoglobina: monomer Hp1-1 (98 kD), polimeri Hp1-2 (oko 200 kD) i Hp2-2 (oko 400 kD). Sintetiše se ne samo u jetri, već i u koži, plućima i bubrezima. Deluje kao "sakupljački" protein, jer stvara stabilan kompleks sa slobodnim hemoglobinom otpuštenim iz eritrocita tokom hemolize, a time sprečava oksidativnu aktivnost hemoglobina i omogućava očuvanje gvožđa hema. Uočeno je da ima bakteriostatske i imunomodulatorne efekte, inhibira oksidativni prasak neutrofilnih granulocita, stimuliše angiogenezu i osetljiv je marker akutne faze zapaljenja, kada se njegov sadržaj u krvi povećava 2-10 puta (Petersen i sar., 2004; Cray i sar., 2009). Fiziološki nivo haptoglobina u plazmi Wistar pacova iznosi 0,1-0,35 g/L

(0,223 g/L kod mužjaka, 0,072 g/L kod ženki) (Car i sar., 2006). Vrednost zabeležena u kontrolnoj grupi je bila u granicama referentnih vrednosti. Povećanje koncentracije haptoglobina u našem ogledu je bilo višestruko (3 do 10 puta), u zavisnosti od doze aplikovanog vodenog ili metanolnog ekstrakta kukureka. To ukazuje na povećanu sintezu i sekreciju ovog proteina u jetri i razvoj akutne zapaljenske reakcije. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima utvrđenim na modelima akutnog inflamatornog odgovora. Giffen i sar. (2003) su kao model akutne zapaljenske reakcije koristili IP ubrizgavanje kompletnog Freundovog adjuvansa Wistar Han pacovima i tom prilikom utvrdili da se nakon 36h, koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi takođe povećavala sa rastom aplikovane doze. Koj i sar. (1982) su na Buffo pacovima primenili model aseptične akutne inflamacije, izazvane potkožnim aplikovanjem terpentina i registrovali su brzo povećanje koncentracije haptoglobina, dok je nivo albumina u plazmi smanjen na minimalnu vrednost drugog dana ogleda. Povećana prosečna vrednost ovog parametra u krvi pacova 24h nakon trokrotnog aplikovanja deksametazona, u skladu je sa navodima, da deksametazon stimuliše ekspresiju mRNA gena za haptoglobin pacova (Marinković i Baumann, 1990; Ševaljević i sar., 1998).

6.3. FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA

6.3.1. Stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita (%)

Srednja vrednost stepena fagocitoze neutrofilnih granulocita u krvi pacova kontrolne grupe je iznosila $43,68 \pm 6,65\%$, a posle aplikacije 200 mg/kg TM metanolnog ($91,95 \pm 3,79\%$) ili vodenog ekstrakta kukureka ($82,95 \pm 9,43\%$) ove vrednosti su bile signifikantno veće na nivou značajnosti od $P < 0,001$. Statistički značajno veća vrednost ovog parametra je utvrđena kod grupe MEK 200 u odnosu na grupu EK 200 ($P < 0,05$). Grupa kojoj je trokrotno aplikovan deksametazon je imala prosečan stepen fagocitoze od $68,78 \pm 10,47\%$. Značajno veće vrednosti su zabeležne kod grupe kojoj je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana je dodatno tretirana fiziološkim rastvorom ($81,00 \pm 11,35\%$, $P < 0,05$) i ogleđnih grupa kojima je nakon deksametazona aplikovan metanolni ($89,07 \pm 3,41\%$) ili vodeni ekstrakt u dozi od 100 mg/kg TM ($88,70 \pm 2,27\%$) i to na nivou značajnosti od $P < 0,001$ (Grafikon 6.3.1.).



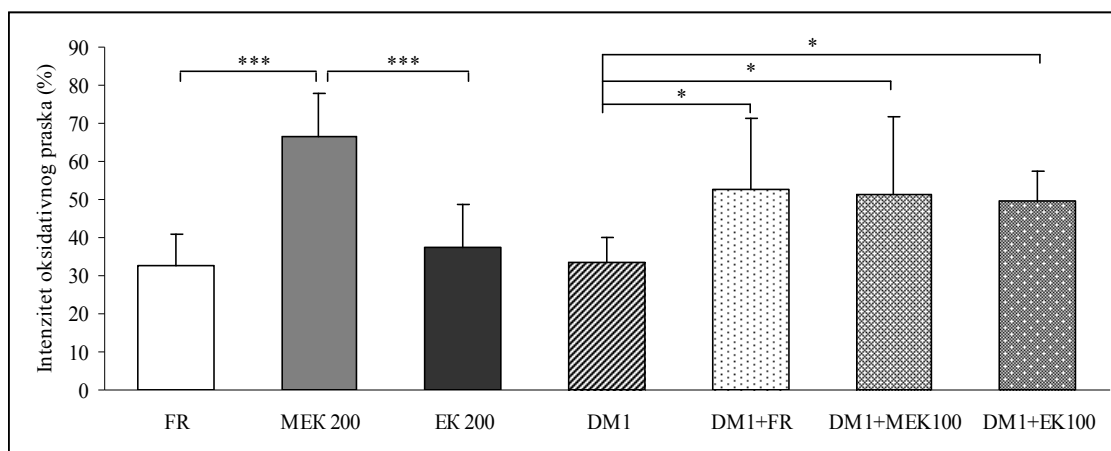
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Grafikon 6.3.1. Stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka i deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Fagocitoza predstavlja bitan vid nespecifične odbrambene reakcije organizma na infekcije izazvane bakterijama i gljivicama. Sposobnost fagocitoze imaju mikrofagi (polimorfonuklearni neutrofilni i eozinofili) i makrofagi (mononuklearni monociti i tkivni makrofagi). Ovaj proces se odvija u nekoliko glavnih faza: hemotaksa (migracija fagocita u inflamatorno područje), vezivanje čestica za površinu fagocita i unošenje endocitozom, intracelularno ubijanje kiseonik-zavisnim (oksidativni prasak) i kiseonik-nezavisnim mehanizmima. Rezultati dobijeni u našem ogledu na pacovima su u skladu sa rezultatima Bogdana i sar. (1989, 1990-a), koji navode da se kod ovaca nakon implantacije rizoma *Helleborus L.*, povećao indeks fagocitoze sa 0-21 na 0-34, a vrednost ukupnog kapaciteta fagocitoze neutrofilnih granulocita više od 6 puta, pri čemu su utvrđene razlike bile statistički vrlo značajne u intervalu od 48h (P<0,01). U našim prethodnim ispitivanjima stepena fagocitoze, zabeležili smo statistički značajno veći procenat neutrofilnih granulocita koji sadrže najmanje 3 latex partikule, kod pacova kojima je aplikovano 100 mg/kg TM vodenog ekstrakta podzemnih organa *H. odorus W. et K.* u odnosu na pacove iz kontrolne grupe (P<0,05) (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-b). Rezultati dobijeni nakon aplikovanja deksametazona su u skladu sa navodima da kortikosteroidi u organizmu pacova deluju inhibitorno na funkcije neutrofilnih granulocita (Zhang i sar., 2004).

6.3.2. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%)

Srednja vrednost intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita u krvi kontrolne grupe pacova je iznosila $32,44 \pm 8,53\%$. Veće vrednosti su zabeležene u grupi 24h posle tretmana sa 200 mg/kg TM metanolnog ekstrakta ($66,33 \pm 11,63\%$) i to na nivou visoko značajne razlike ($P < 0,001$) i nakon aplikacije vodenog ekstrakta (200 mg/kg TM) ($37,44 \pm 11,29\%$), ali ova utvrđena razlika nije bila signifikantna ($P > 0,05$). Statistički značajno veća vrednost ovog parametra je utvrđena i kod grupe MEK 200 u odnosu na grupu EK 200 ($P < 0,001$). U odnosu na grupu kojoj je trokratno aplikovan deksametazon ($33,46 \pm 6,57\%$), srednja vrednost intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita je bila značajno veća kod grupa koje su nakon deksametazona tretirane fiziološkim rastvorom ($52,57 \pm 18,64\%$), metanolnim ($51,35 \pm 20,50\%$) ili vodenim ekstraktom u dozi od 100 mg/kg TM ($49,68 \pm 7,74\%$), na nivou značajnosti od $P < 0,05$. Male razlike u vrednostima ovog parametra kod grupa koje su dodatno tretirane, nisu bile signifikantne ($P > 0,05$) (Grafikon 6.3.2.).

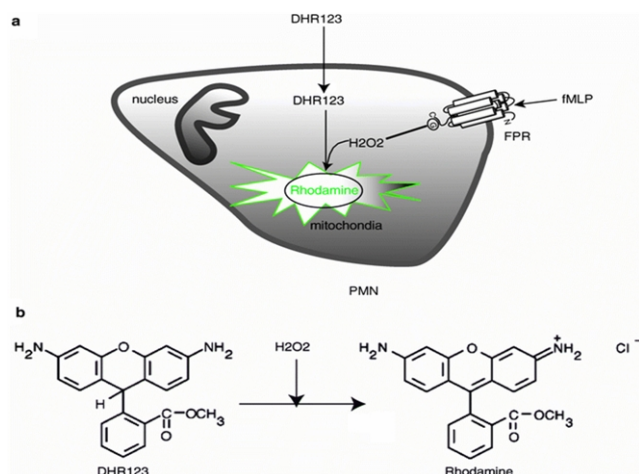


* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Grafikon 6.3.2. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%) kod pacova tretiranih različitim ekstraktima kukureka i deksametazonom u kombinaciji sa FR i različitim ekstraktima kukureka

Osnovni princip ispitivanja intenziteta oksidativnog praska neutrofilnih granulocita je praćenje stvaranja reaktivnih oksidanasa dodavanjem i oksidacijom nefluorescentnog dihidrorodamina 123. Nakon stimulacije, neutrofili proizvode reaktivne kiseonične (oksigen) metabolite (superoksidni anjon, vodonik peroksid,

hipohlornu kiselinu). Dodati DHR 123 ulazi u ćeliju i oksiduje se delovanjem vodonik peroksida (H_2O_2) nastalog iz superoksida, što rezultira nastajanjem fluorescentnog rodamina u mitohondrijama (Chen i Junger, 2012) (Slika 2.).



Slika 2. Princip ispitivanja oksidativnog praska sa DHR 123 (Chen i Junger, 2012)

Rezultati dobijeni u ovom ogledu su u saglasnosti sa našim ranijim ispitivanjima i rezultatima drugih autora. Tretman pacova vodenim ekstraktom podzemnih organa kukureka u dozi od 100 mg/kg TM, doveo je do značajnog povećanja produkcije H_2O_2 od strane rezidentnih peritonealnih makrofaga, posle stimulacije sa 100 μ L 12,5; 25 i 50 nM ($P < 0,05$) forbol miristat acetata (PMA). Prosečne vrednosti koncentracije H_2O_2 (nM/mg proteina), kretale su se od 12,80 (posle stimulacije sa 0 nM PMA) do 32,36 (posle stimulacije sa 50 nM PMA) kod kontrolne grupe pacova, a od 6,29 do 88,53 kod ogledne grupe 24h posle aplikovanja ekstrakta (Davidović, 2006; Davidović i sar., 2010-b). Apetrei i sar. (2011-b) su zabeležili da frakcije MCS-EF, MCS-a, MCS-c i MCS-d, progresivno prečišćene iz multianjonskog jedinjenja MCS-18, izolovanog iz *H. purpurascens* W. et K., deluju prooksidativno, povećavaju proizvodnju i oslobađanje ROS iz nestimulisanih PMN ćelija (1 μ g za 129,75%, 126,09%, 235% i 181,95%; 10 μ g za 114,81%, 175,36%, 133,41% i 112,43%), dok biljna frakcija MCS-Dx smanjuje oslobađanje ROS (između 94,45% i 69,87%), u odnosu na kontrolu (nestimulisane PMN ćelije). Međutim, sve frakcije, u zavisnosti od doze, smanjuju nivo proizvedenog i oslobođenih ROS iz Pam3Cys aktiviranih PMN ćelija za 77,72% (10 μ g MCS-Dx) do neznatnih 2% (10 μ g MCS-a) u poređenju sa Pam3Cys kontrolom. Komponenta MCS-Dx je pokazala dobar antioksidativni kapacitet, posebno u visokim dozama (10 μ g),

kada je utvrđeno oslobađanje ROS od samo 22,28% u odnosu na Pam3Cys kontrolu. Frakcija MCS-EF je bila u stanju da smanji oslobađanje ROS za 32,75% (u dozi 1 µg) i za 10% (u dozi 10 µg) u odnosu na kontrolu, čime je ispoljio nizak antioksidativni kapacitet. Male doze (1µg) MCS-a, MCS-c i MCS-d frakcija su značajnije uticale na smanjeno oslobađanje ROS iz aktiviranih PMN ćelija (za 65,03%, 60,15% i 69,03%) u odnosu na kontrolu, nego doze od 10 µg (za 2%, 41,36% i 48%), dok je MCS-Dx frakcija imala najjači efekat ROS regulacije u visokoj dozi (10 µg). Rezultati dobijeni nakon aplikovanja deksametazona su u skladu sa rezultatima Zhanga i sar. (2004) koji su utvrdili da kortikosteroidi značajno suprimiraju oslobađanje slobodnih radikala kiseonika kod pacova.

Suprotno našim rezultatima, više autora je registrovalo antioksidativno delovanje nekih *Helleborus* taksona. Trenin i Volodin (1999) su utvrdili da ekdisteroid 20-hidroksiekdison koji se nalazi u biljkama roda *Helleborus* L., deluje kao antioksidans i modulator fluorid-stimulisanog respiratornog praska u neutrofilnim granulocitima čoveka, na isti način kao i u vodi rastvorljivi antioksidansi hlorpromazin i emoksipin. Vodeni i hidroalkoholni ekstrakti *H. purpurascens* W. et K., koncentrisani ultrafiltracijom, su ispoljili visoku antioksidantnu aktivnost. Utvrđena DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) inhibitorna vrednost hidroalkoholnog ekstrakta je bila 79%, a vodenog ekstrakta 73% (Păun-Roman i sar., 2010). Čakar i sar. (2011) smatraju da je antioksidativna aktivnost kukureka uglavnom rezultat redoks mogućnosti polifenolnih jedinjenja, koja imaju značajnu ulogu u adsorbovanju i neutralisanju slobodnih radikala, uklanjanju singlet ($1SgO_2$) i triplet kiseonika (O_3) ili razlaganju peroksida. Ovi autori su na osnovu rezultata DPPH testa ustanovili da je antioksidativna aktivnost ekstrakata lišća kukureka veća nego aktivnost ekstrakata korena. Oko 50% inhibicije slobodnih radikala se postiže etanolnim ekstraktima lišća u koncentraciji od $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ za *H. odorus* W. et K. do $0,49 \text{ mg mL}^{-1}$ za *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew, dok su IC_{50} vrednosti za vodene ekstrakte *H. multifidus* Vis., *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew i *H. odorus* W. et K. bile 0,19, 0,22 i $0,92 \text{ mg mL}^{-1}$. Značajno veće koncentracije ekstrakata korena su bile potrebne za postizanje 50% inhibicije stvaranja slobodnih radikala, a kretale su se od $1,16 \text{ mg mL}^{-1}$ za *H. odorus* W. et K. do $3,51 \text{ mg mL}^{-1}$ za *H. hercegovinus* (Martinis) Mathew. Razlike u apsorpciji, nakon 15 i 30 minuta, za vodeni ekstrakt su zanemarljive, a za etanolne ekstrakte značajne.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu istraživanja izvedenih u okviru ove disertacije i analize dobijenih podataka mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Intramuskularna aplikacija različitih doza (50, 100 ili 200 mg/kg TM) metanolnog i vodenog ekstrakta podzemnih organa kukureka ima za posledicu leukocitozu i granulocitozu, koje se povećavaju sa koncentracijom aplikovanih ekstrakata, a navedeni efekti su izraženi i kada se ekstrakti primenjuju nakon deksametazona. Ovi ekstrakti dovode do nastanka limfopenije, što uzrokuje povećanje neutrofilno/limfocitnog indeksa u svim oglednim grupama. Srednje vrednosti navedenih parametara se vrlo malo menjaju 24h posle aplikacije različitih doza petroletarskog i hloroformskog ekstrakta. Svi ispitivani ekstrakti su ispoljili najmanji efekat na broj i procenat monocita u krvi, ali je aplikacija metanolnog i vodenog ekstrakta nakon tretmana deksametazonom uticala na povećanje broja ovih krvnih elemenata.

2. Upotrebljeni ekstrakti nisu ispoljili hemolitičku aktivnost, prosečan broj eritrocita i hematokritska vrednost kod svih ispitivanih grupa su u granicama referentnih vrednosti, dok je koncentracije hemoglobina značajno povećana. Aplikovanje petroletarskog i najniže doze metanolnog ekstrakta dovodi do značajnog povećanja broja trombocita u krvi pacova, a kod ostalih oglednih grupa dolazi do smanjenja ovih vrednosti.

3. Značajno bržu sedimentaciju u svim posmatranim intervalima imaju eritrociti pacova oglednih grupa kojima su aplikovani pojedinačni ekstrakti kukureka, u odnosu na pacove kontrolne grupe, pri čemu metanolni i vodeni ekstrakti ispoljavaju izraženiji efekat na ove vrednosti. Trokratno aplikovanje deksametazona izaziva sporiju sedimentaciju eritrocita, a statistički značajno povećanje ovog parametra akutne zapaljenske reakcije je registrovano kod svih grupa kojima je tri dana aplikovan deksametazon, a četvrtog dana različite doze metanolnog ili vodenog ekstrakta.

4. Pojedinačno aplikovanje metanolnog i vodenog ekstrakta, kao i njihova primena nakon tretmana pacova deksametazonom, rezultirali su statistički značajnim smanjenjem koncentracije albumina u krvnoj plazmi. Tretiranje oglednih grupa petroletarskim i hloroformskim ekstraktom nije ispoljilo efekat na vrednosti ovog parametra.

5. Statistički značajno povećanje koncentracije fibrinogena u krvnoj plazmi pacova je srazmerno povećanju aplikovane doze metanolnog i vodenog ekstrakata, a registrovano je i u grupama tretiranim ovim ekstraktima nakon primene deksametazona. Aplikovanje petroletarskog i hloroformskog ekstrakta ima negativan efekat na vrednosti ovog parametra.

6. Aplikovanje metanolnog i vodenog ekstrakta dovodi do značajnog povećanja koncentracija haptoglobina u krvnoj plazmi pacova, a sa povećanjem aplikovane doze povećava se i vrednost ovog parametra. Razlike u prosečnim vrednostima koncentracije haptoglobina kod pacova kojima je trokratno aplikovan deksametazon nisu bile signifikantne u odnosu na grupe koje su dodatno treirane navedenim ekstraktima.

7. Upotrebljeni metanolni i vodeni ekstrakt su fiziološki aktivni i deluju proinflamatorno povećanjem broja ukupnih leukocita i neutrofilnih granulocita, kao i promenom brojnog odnosa pojedinih tipova leukocita u leukocitarnoj formuli u korist neutrofilnih granulocita. Ovi ekstrakti stimulišu funkcije neutrofilnih granulocita, tako što dovode do značajnog povećanja stepena fagocitoze i intenziteta oksidativnog praska ovih krvnih ćelija.

8. Akutna zapaljenska reakcija se razvija 24h posle aplikovanja različitih doza metanolnog i vodenog ekstrakta, ali ne i nakon tretmana petroletarskim i hloroformskim ekstraktom rizoma i korena *H. odoratus* W. et K. Ovaj efekat nastaje i kod pacova tretiranih metanolnim i vodenim ekstraktom nakon trokrotnog aplikovanja deksametazona.

8. LITERATURA

1. Abelson PH, 1990, Medicine from plants, Science, 247, 513.
2. Achenbach C, Ziskoven R, Wiemer J, 1983, Effects of acrihellin on cardiac contractility in comparison to various inotropic interventions, Arzneimittelforschung, 33, 10, 1425-30.
3. Adams RH, 1999, Veterinary pharmacology and therapeutics, 8th edition, Iowa State University press, Ames.
4. Adams M, Althera W, Kessler M, Kluge M, Hamburger M, 2011, Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century, J Ethnopharmacol, 133, 278-88.
5. Adcock IM, Caramori G, 2001, Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids, Immunol Cell Biol, 79, 4, 376-84.
6. Adomnicăi M, Dobrescu G, Ionescu GD, Costea I, Munqiu OC, Teslariu E, Filip C, Iosep R, 1990, The evaluation of the teratogenesis and embryotoxicity of the pharmaceutical product Boicil tabletes. I. The effect of the pharmaceutical product Boicil tabletes on fertilization and implantation in rats and mice, Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 94, 2, 369-73.
7. Akerreta S, Calvo MI, Cavero RY, 2010, Ethnoveterinary knowledge in Navarra (Iberian Peninsula), J Ethnopharmacol, 130, 369-78.
8. Akin S, Anil H, 2007, A furostanol saponin and phytoecdysteroid from roots of *Helleborus orientalis*, Chem Nat Comp, 43, 1, 90-2.
9. Alcorn J, 1995, The scope and aims of ethnobotany in a developing world, In: Schultes RE and Von Reis S (eds) Ethnobotany, Dioscorides Press, Portland, 23-39.
10. Amigues S, 1999, A note on white hellebore in Dioscorides IV, 148, Rev Philol Litt Hist Anc, 73, 7-13.
11. Andguladze IG, Dalakishvili TsM, Kemertelidze EP, Serebryakov VSh, Tsitsishvili VG, 1983, Chemical composition and biological activity of lipids from *Helleborus abchasicus* and *Helleborus caucasicus*, Soobshch Akad Nauk Gruz SSR, 111, 1, 77-80, C.A. 100: 3532u.

12. Ангарская МА, Хаджай ЯИ, Максименко ГП, 1953, Фармакологическое изучение сердечных гликозидов из морозника кавказского и морозника краснеющего, Фармаколог. и токсиколог., 16, 5, 46-9.
13. Àngels Bonet M, Vallès J, 2007, Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plant used in veterinary medicine, J Ethnopharmacol, 110, 130-47.
14. Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M, 2001, Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines, Blood Cells Moll Dis, 27, 6, 978-91.
15. Apetrei NS, Călugăru A, Kerek F, Panteli M, Rasit I, Cremer L, Szegli G, Lupu AR, 2011-a, A highly purified vegetal fraction able to modulate HMGB1 and to attenuate septic shock in mice, Roum Arch Microbiol Immunol, 70, 3, 114-23.
16. Apetrei NS, Lupu AR, Călugăru A, Kerek F, Szegli G, Cremer L, 2011-b, The antioxidant effects of some progressively purified fractions from *Helleborus purpurascens*, Roum Biotechnol Lett, 16, 6, 6673-82.
17. Argay G, Kálmán A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Ribár B, 1996, Crystal structure of stigmast-5-en-3 β -ol monohydrate, C₂₉H₅₂O₂, Z Kristallograp, 211, 725-7.
18. Argay G, Kálmán A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Ribár B, 1998, Crystal structure of the steroid sapogenin: 1 β ,3 β ,11 α -trihidroksy-spirosta-5,25(27)-diene monohydrate, Models Chem, 135, 4, 449-56.
19. Bagla VP, McGaw LJ, Eloff JN, 2012, The antiviral activity of six South African plants traditionally used against infections in ethnoveterinary medicine, Vet Microbiol, 155, 2-4, 198-206.
20. Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, French AW, Anderson DE, 1996, Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity during saline volume expansion in anesthetized dogs, Cardiovasc Res, 31, 296-305.
21. Bagrov AY, Bagrov YY, Fedorova OV, Kashkin VA, Patkina NA, Zvartau EE, 2002, Endogenous digitalis-like ligands of the sodium pump: possible involvement in mood control and ethanol, Eur Neuropsychopharmacol, 12, 1, 1-12.
22. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV, 2009, Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets, Pharmacol Rev, 61, 1, 9-38.
23. Bai Y, Benn HM, Majak W, McDiarmid R, 1996, Extraction and HPLC Determination of Ranunculin in Species of the Buttercup Family, J Agric Food Chem, 44, 2235-8.
24. Baltaev UA, 2000, Phytoecdysteroids: structure, sources and biosynthesis in plants. Russ J Bioorg Chem, 26, 12, 799-831.

25. Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, Christaki E, Chatzopoulou PS, Tsiligianni T, Spais AB, 2005, Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics, and serum cholesterol of female early-maturing turkeys, *Br Poult Sci*, 46, 5, 595-601.
26. Barone R, 1963, Le piante della medicina popolare nel territorio di Falconara e San Luciso (Calabria), *Webbia*, 17, 329-57.
27. Bassarello C, Muzashvili T, Skhirtladze A, Kemertelidze E, Pizza C, Piacente S, 2008, Steroidal glycosides from the underground parts of *Helleborus caucasicus*, *Phytochemistry*, 69, 1227-33.
28. Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E, 2008, Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids – structure and effects on humans. *Curr Med Chem*, 15, 1, 75-91.
29. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ, 2002, A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex, *Neurosci Lett*, 326, 109-12.
30. Baytop T, Malkoc GJ, 1965, *H. orientalis* Lamk. var. *hirsutus* (Shiffner) Hay.: Anatomic, *Phytochemie, Fac Pharm Istanbul*, 1, 18-31.
31. Benítez G, 2011, Animals used for medicinal and magico-religious purposes in western Granada Province, Andalusia (Spain), *J Ethnopharmacol*, 137, 1113-23.
32. Benítez G, González-Tejero MR, Molero-Mesa J, 2012, Knowledge of ethnoveterinary medicine in the Province of Granada, Andalusia, Spain, *J Ethnopharmacol*, 139, 429-39.
33. Berger F, 1960, Rhizoma graminis, In *Handbuch der Drogenkunde*, Bd. V. Wien - Bonn - Bern, Wilhelm Maudrich, Verlag, 226-30.
34. Bhuiyan MBA, Dasgupta FME, 2003, Study on mechanism of action of Chinese medicine Chan Su: dose-dependent biphasic production of nitric oxide in trophoblastic BeWo cells, *Clin Chim Acta*, 330, 1-2, 179-84.
35. Bjelaković G, Beninati S, Pavlović D, Kocić G, Jevtović T, Kamenov B, 2007, Dexamethasone and oxidative stress, *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 18, 115-27.
36. Blanco E, Macía MJ, Morales R, 1999, Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain), *J Ethnopharmacol*, 65, 113-24.
37. Blumenthal M, 1997, Herbal Monographs Initiated by Numerous Groups, *Herbal Gram*, 40, 30-8.
38. Bock H, 1577, *Kreüterbuch Gedrucht zü*, Strassburg, bei Josiam Rihel, Nachdruck bei Konrad Kölbl, München, 1964.

39. Bogdan I, Bașea I, Nechifor A , Hruban E, 1989, Cercetări privind efectul implantului de spin (*Helleborus purpurascens* L.) la bovine, cabaline, ovine și porcine, Buletin IACN, ZMV, 43, 67-72.
40. Bogdan I, Nechifor A, Bășea I, Hruban E, 1990-a, Aus der rumänischen Volksmedizin: Unspezifische Reiztherapie durch transkutane implantation der Nieswurz (*Helleborus purpurascens*, Fam. *Ranunculaceae*) bei landwirtschaftlichen Nutztieren, Dtsch Tierärztl Wochenschr, 97, 12, 525-9.
41. Bogdan I, Nechifor A, Ghițulescu C, 1990-b, Experimentarea a trei variante de extract injectabil de spînz (*Helleborus purpurascens*, fam. *Ranunculaceae*) la ovine, Simpozionul Actualitati in patologia animalelor, Cluj-Napoca, XVII, 31-44.
42. Bogdan I, Hruban E, Nueleanu V, Bogdan A, 1993, Certări privind eficacitatea extractului injectabil de spinz (*Helleborus purpurascens*) in hipotrepzia mieilor, Buletin USA Cluj-Napoca seria Zootehnie și med vet, 47, 143-9.
43. Bolte S, Trif R, Susa I, Igna C, 1992, Terapia proinflamatorie și imunostimulantă cu extracte de *Helleborus* species, Lucrări științifice med vet., XXVI, Timișoara, 152-5.
44. Bolte S, Igna C, Radbea G, Sala A, 1994, Observații asupra eficienței Boicilului forte în tratamentul artropatiilor la câine, Lucrări științifice med vet, XXVIII, Timișoara, 138-41.
45. Bolte S, Petruț H, Trif R, 2001, Imunostimularea cu extract de *Helleborus* spp., Lucrări științifice med vet., XXXIV, Timișoara, 79-86.
46. Bonin CP, Baccarin RYA, Nostell K, Nahum LA, Fossum C, de Camargo MM, 2013, Lypopolysaccharide-induced inhibition of transcription of tir 4 *in vitro* is reversed by dexamethasone and correlates with presence of conserved NFκB binding sites, Biochem Biophys Research Commun, 432, 2, 256-61.
47. Bonora A, Dall'Olio G, Bruni A, 1985, Separation and Quantitation of Protoanemonin in Ranunculaceae by Normal- and Reversed-Phase HPLC, Planta Med, 5, 364-7.
48. Bonora A, Dall'Olio G, Donini A, Bruni A, 1987, An HPLC screening of some Italian Ranunculaceae for the lactone protoanemonin, Phytochemistry, 26, 2277-9.
49. Bossi M, Brambilla G, Cavalli A, Marzegalli M, Regalia F, 1981, Threatening arrhythmia by uncommon digitalic toxicosis (author's transl), G Ital Cardiol, 11, 12, 2254-7.
50. Braca A, Prieto JM, Tommasi ND, Tomè F, Morelli I, 2004, Furostanol saponins and quercetin glycosides from the leaves of *Helleborus viridis* L., Phytochemistry 65, 21, 2921-8.
51. Brunfels O, 1532, Kreüterbuch Contrafayt, Strassburg, bei Johann Schott, Nachdruck bei Konrad Kölbl, München, 1964.

52. Bruno DR, 2010, Mastitis, mammary gland immunity, and nutrition, Mid-South Ruminant Nutrition Conference, Arlington, Texas, 19-26.
53. Brussel DE, 2004, Medicinal plants of Mt. Pelion, Greece, *Econ Bot*, 58, S174-S202.
54. Büssing A, Schweizer K, 1998, Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro, *J Ethnopharmacol*, 59, 3, 139-46.
55. Car BD, Eng VM, Everds NE, Bounous DI, 2006, Chapter 5: Clinical pathology of the rat in Suckow MA et al.: *The Laboratory Rat*, American College of Laboratory, Animal Medicine Series, Copyright © 2006, Elsevier Inc.
56. Carpenter WJ, Mashima YT, Rupiper JD, 2001, *Exotic Animal Formulary*, WB Saunders Company Philadelphia, 326.
57. Cassol-Jr OJ, Comim CM, Petronilho F, Constantino LS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F, 2010, Low dose dexamethasone reverses depressive-like parameters and memory impairment in rats submitted to sepsis, *Neurosci Lett*, 473, 126-30.
58. Chen KK, Henderson FG, Anderson RC, 1950, The cardiac action of Helleborus glycosides and their aglycones, *J Pharmacol Exp Ther*, 99, 4, 395-400.
59. Chen Y, Junger WG, 2012, Chapter 8: Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils in Robert B Ashman (ed.): *Leucocytes: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 884, DOI 10.1007/978-1-61779-527-5.8, © Springer Science+Business Media, LLC 2012.
60. Chinenov Y, Rogatsky J, 2007, Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the Toll-like receptor signaling network, *Mol Cell Endocrinol*, 275, 30-42.
61. Cioaca C, Cucu V, 1974, Quantitative determination of hellebrin in the rhizomes and roots of *Helleborus purpurascens* W. et K., *Planta Med*, 26, 250-3.
62. Ciulei I, Grigorescu E, Stănescu U, 1993, *Medicinal plants: Phytochemistry and Phytotherapy*, Vol I, Medicinal Publishing House, Bucharest (in Romanian), 621-3.
63. Coassini Lokar L, Poldini L, Tubaro A, 1982, Influenza dei fattori altitudinale, stagionale e ambientale sulla produzione dei principi attivi in *Helleborus odorus subsp. laxus* (Host) Merxm. et Podl., *G Botan Ital*, 116, 1-2, 51-61.
64. Coassini Lokar L, Poldini L, 1988, Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (North East Italy), *J Ethnopharm*, 22, 3, 231-79.
65. Colombo ML, Tomè F, Servettaz O, Bugatti C, 1990, Phytochemical evaluation of *Helleborus* Species Growing in Northern Italy, *Int J Crude Drug Res*, 28, 3, 219-23.

66. Colombo ML, Tomè F, Bugatti C, 1991, Lipid content and fatty acid composition in hypogeous organs of *Helleborus* species (*Ranunculaceae*), *Pl Syst Evol*, 178, 55-63.
67. Colombo ML, Tomè F, 1993, Ecdysteroid Production in *Helleborus odorus* ssp. *laxus*: Response to Different Environments, *Int J Pharmacogn*, 31, 4, 311-5.
68. Corsi G, Pagni AM, 1978, Studi sulla flora e vegetazione del Monte Pisano (Toscana nord-occidentale), 1. Le piante della medicina popolare nel versante pisano, *Webbia*, 33, 159-204.
69. Corsi G, Gaspari G, Pagni AM, 1981, L'uso delle piante nell' economia domestica della Versilia collinare e montana, *Atti Soc Tosc Sci Nat Mem Ser B*, 87, 309-86.
70. Cray C, Zaias J, Altman NH, 2009, Acute phase response in animals: a review, *Comp Med*, 59, 6, 517-26.
71. Cunha-Filho GA, Resck IS, Cavalcanti BC, Pessoa CÔ, Moraes MO, Ferreira JRO, Rodrigues FAR, Dos Santos ML, 2010, Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotid gland secretion, *Toxicon*, 56, 3, 339-48.
72. Dalakishvili TsM, 1983, Fatty acidic composition of lipids from the roots and rhizomes of *Helleborus caucasicus*, *Soobshch Akad Nauk Gruz SSR*, 112, 3, 565-8.
73. Dalakishvili TsM, Kemertelidze EP, Gedevanishvili MD, Andguladze IG, Tsitsishvili VG, 1990, Lipids from *Helleborus abchasicus* and their biological activity, *Khim Pharm J*, 24, 2, 146-8, C.A. 112: 174922y.
74. Daniel D, Süsal C, Kopp B, Opelz G, Terness P, 2003, Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives, *Int Immunopharma*, 3, 1791-801.
75. Davidović V, 2006, Ispitivanje uticaja ekstrakta rizoma i korena kukureka (*Helleborus odorus* W. et K.) na promene vrednosti parametara krvne slike, koncentraciju proteina akutne faze i stepen fagocitoze kod Wistar pacova, *Magistarska teza*, Beograd.
76. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović, Jovanović M, 2006-a, Primena ekstrakta rizoma i korena kukureka (*H. odorus* Waldst. et Kit.) kao egzogenog imunomodulatora, *Simpozijum "Unapređenje poljoprivredne proizvodnje na teritoriji Kosova i Metohije"* sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka Banja 26-29. jun 2006., *Tematski zbornik*, 229-32.
77. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Hristov S, Relić R, Stanković B, 2006-b, Uticaj ekstrakta rizoma i korena kukureka (*Helleborus odorus* Waldst. et Kit.) na povećanje odbrambenih sposobnosti organizma, *XVII Inovacije u stočarstvu*, Beograd 16-17. novembar 2006., *Biotehnologija u stočarstvu*, 22, Poseban broj, 773-80.
78. Davidović V, Joksimović-Todorović M, Hristov S, Stanković B, 2007-a, Stimulacija imunog odgovora pacova soja Wistar primenom ekstrakta rizoma

i korena kukureka (*H. odoratus* Waldst. et Kit.), XII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 02-03. Mart 2007., Čačak, Zbornik radova, 12, 13, 61-6.

79. Davidović V, Joksimović-Todorović M, Hristov S, Stanković B, 2007-b, Haemolytic activity of rhizome and root extract of *Helleborus odoratus* Waldst. et Kit. applied on Wistar rats, 2nd International Congress on Animal Husbandry "New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Farming", 03-05 October 2007., Belgrade-Zemun, Serbia, Biotechnol Anim Husband, 23, 5-6, Book 2, 207-13.
80. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Jovanović M, 2010-a, Imunomodulatorno delovanje ekstrakta podzemnih organa kukureka (*Helleborus odoratus* W. et K.) kod Wistar pacova, XV Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 26-27. Mart 2010., Čačak, Zbornik radova, 15, 17, 547-52.
81. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Jovanović M, 2010-b, The effect of the extract of rhizome and root of hellebore (*Helleborus odoratus* W. et K.) on parameters of white blood count and degree of phagocytosis in Wistar rats, Acta Vet, Belgrade, 60, 5-6, 605-18.
82. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Jovanović M, Miljas N, 2010-c, Uticaj ekstrakta podzemnih organa *Helleborus odoratus* W. et K. na crvenu krvnu sliku Wistar pacova, Vet glasnik, 64, 3-4, 219-29.
83. Davies RJ, Sandle GI, Thompson SM, 1991, Inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase pump during induction of experimental colon cancer, Cancer Biochem Biophys, 12, 81-94.
84. Deepak D, Srivastava S, Khare NK, Khare A, 1996, Cardiac glycosides, Progr Chem Org Nat Prod, 69, 71-148.
85. Deichmann WB, Henschler D, Holmstedt B, Keil G, 1986, What is there that is not a poison? A study of the Third Defence by Paracelsus, Arch Toxicol, 58, 207-13.
86. Delebinski C, Kauczor G, Jesse P, Seeger K, Henze G, Seifert G, 2012, A root of extract of *Helleborus niger* possess cytotoxic properties in neuroblastoma cells, International Research Congress on Integrative Medicine and Health 2012, Portland, Oregon, USA, 15-18 May 2012, Complement Altern Med, 12, 1, 16.
87. Deltombe M, 1997, Helleborus, L' Homéopathie Européenne, 5, 1, 11-5, Publisher Méditios Carline, Paris, France.
88. Dhooghe E, Van Labeke MC, 2007, In vitro propagation of *Helleborus* species, Plant Cell Tiss Organ Cult, 91, 175-7.
89. Dhooghe E, Grunewald W, Leus L, Van Labeke MC, 2009, In vitro polyploidisation of *Helleborus* species, Euphytica, 165, 89-95.

90. Dilparić-Knežević E, 1977, Bufadienolidi i bazične supstancije u vrstama roda *Helleborus*, Magistarska teza, Zagreb.
91. Dilshad SMR, Ur-Rehman N, Iqbal Z, Muhammad G, Iqbal A, Ahmed N, 2008, An inventory of the ethnoveterinary practices for reproductive disorders in cattle and buffaloes, Sargodha District of Pakistan, *J Ethnopharmacol*, 117, 393-402.
92. Dima VF, Popescu L, Petrovici A, Petraşincu D, Murg B, Burghilea B, Ionescu MD, 1986, The influence of Boicil on some morphologic and physiologic traits of human diploid cells, *Arch Roum Pathol Exp Microbiol*, 45, 1, 13-32.
93. Dima VF, Popescu L, Petrovici A, Dima SV, Ionescu MD, Grigorescu A, Petraşincu D, Murg B, Kerek F, 1987, The influence of Boicil upon some metabolic, genetic and morphological traits of human diploid cells treated with endotoxin, collagenase and cholesterol, *Arch Roum Pathol Exp Microbiol*, 46, 2, 129-45.
94. Dinan L, 2001, Phytoecdysteroids: biological aspects, *Phytochemistry*, 57, 325-39.
95. Dinan L, Savchenko T, Whiting P, 2001, On the distribution of phytoecdysteroids in plants, *Cell Mol Life Sci*, 58, 8, 1121-32.
96. Dinan L, Savchenko T, Whiting P, 2002, Chemotaxonomic significance of ecdysteroid agonists and antagonists in the Ranunculaceae: phytoecdysteroids in the genera *Helleborus* and *Hepatica*, *Biochem System Ecol*, 30, 171-82.
97. Dirsch V, Lacaille-Dubois MA, Wagner H, 1993, Search for the antirheumatic principle in the roots of *Helleborus purpurascens*, *Planta Med*, 59 (Supplement), A586.
98. Dmitreva RI, Bagrov AY, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco D, Doris PA, 2000, Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage, *Hypertension*, 36, 3, 442-8.
99. Dmitrieva RI, Doris PA, 2002, Cardiotonic steroids: potential endogenous sodium pump ligands with diverse function, *Exp Biol Med*, 227, 8, 561-9.
100. Doris PA, Bagrov AY, 1998, Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress, *Exp Biol Med*, 218, 3, 156-67.
101. Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Salimi E, 2006, Antiinflammatory activity of *Sambucus ebulus* hexane extracts, *Fitoterapia*, 77, 146-8.
102. Eliades D, Pamnani MB, Swindall BT, Haddy FJ, 1991, Effects of bufalin on renal venous outflow, urine flow and natriuresis in the anesthetized dog, *Adv Exp Med Biol*, 308, 205-10.
103. Engel J, Isaac O, Posselt K, Thiemer K, Uthemann H, 1983, Synthesis of orally active cardiosteroid derivatives, *Arzneimittelforschung*, 33, 9, 1215-8.

104. Erdemoglu N, Küpeli E, Yeşilada E, 2003, Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine, *J Ethnopharmacol*, 89, 1, 123-9.
105. Evans WC, 1996, In: *Pharmacognosy*, 14th Ed. WB Saunders Company, London-Philadelphia, Toronto-Sydney-Tokyo.
106. Fábrián L, Argay G, Kálmán A, 1999, On the polymorphism of a saponin monohydrate induced by different rotations of water molecules, *Acta Crystallogr B*, 55, 5, 788-92.
107. Fain JN, Cheema P, Trichansky DS, Madan AK, 2008, Stimulation of human omental adipose tissue lipolysis by growth hormone plus dexamethasone, *Mol Cell Endocrinol*, 295, 101-5.
108. Fossati F, Bianchi A, Favali MA, 1999, *Farmacopea popolare del parmense: passato e presente*, *Informatore Botan Ital*, 31, 171-6.
109. Frohne D, Pfänder HJ, 2005, *Poisonous Plants*, Second edition, A Handbook for Doctors, Pharmacists, Toxicologists, Biologists and Veterinarians, Copyright © 2005 Manson Publishing Ltd.
110. Fuchs L, 1543, *New Kreüterbuch*, Basel, bei Michael Isingrin, Nachdruck bei Konrad Kölbl, München, 1964.
111. Fujita T, Sezik E, Tabata M, Yeşilada E, Honda G, Takeda Y, Tanaka T, Takaishi Y, 1995, Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea regions, *Econ Bot*, 49, 406-22.
112. Gajić M, 1992, *Fam. Ranunculaceae A. L. Juss. u Sarić RM i ost.: Flora Srbije 1*, *Srpska akademija nauka i umetnosti, Odeljenje prirodno matematičkih nauka*, Beograd, 274-80.
113. Gakuya DW, Mulei CM, Wekesa SB, 2011, Use of ethnoveterinary remedies in the management of foot and mouth disease lesions in a dairy herd, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8, 2, 165-9.
114. Gao H, Popescu R, Kopp B, Wang Z, 2011, Bufadienolides and their antitumor activity, *Nat Prod Rep*, 28, 953-69.
115. Gasparetto JC, Martins CA, Hayashi SS, Otuky MF, Pontarolo R, 2012, Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine, *J Pharm Pharmacol*, 64, 2, 172-89.
116. Gastaldo P, 1987, *Compendio della Flora Officinale Italiana*, Piccin, Padova.
117. Gaur RD, Sharma J, Painuli RM, 2010, Plants used in the traditional healthcare of livestock by Gujjar community of Sub-Himalayan tracts, Uttarakhand, India, *Indian J Nat Prod Res*, 1, 243-8.
118. Gerzilov V, Penchev G, Lyutskanov M, Bochukov A, Bozakova N, Popova-Ralcheva S, Sredkova V, 2011, Influence of the prebiotic Salgard and a herb mixture on Pekin ducklings in organic poultry production: II Histological and microbiological investigation, *Biotechnol Anim Husb*, 27, 2, 197-207.

119. Ghaisas MM, Ahire YS, Dandawate PR, Gandhi SP, Mule M, 2011, Effects of combination of thiazolidinediones with melatonin in dexamethasone-induced insulin resistance in mice, *Indian J Pharm Sci*, 73, 6, 601-7.
120. Ghorbani A, Langenberger G, Feng L, Sauerborn J, 2011, Ethnobotanical study of medicinal plants utilised by Hani ethnicity in Naban River Watershed National Nature Reserve, Yunnan, China, *J Ethnopharmacol*, 134, 651-67.
121. Giffen PS, Turton J, Andrews CM, Barrett P, Clarke CJ, Fung KW, Munday MR, Roman IF, Smyth R, Walshe K, York MJ, 2003, Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein, *Arch Toxicol*, 77, 7, 392-402.
122. Gluchoff-Fiasson K, Fiasson JL, Favre-Bonvin J, 1994, Quercetin glycosides from Antractic *Ranunculus* species, *Phytochemistry*, 37, 1629-33.
123. Gomez-Sanchez CE, 2009, Glucocorticoid production and regulation in thymus: of mice and birds, *Endocrinology*, 150, 9, 3977-9.
124. González JA, Garcia-Barriuso M, Amich F, 2011, Ethnoveterinary medicine in the Arribes del Duero, Western Spain, *Vet Res Commun*, 35, 5, 283-310.
125. Gostuški R, 1941, Lečenje bolesti lekovitim biljem, Drugo ispravljeno i dopunjeno izdanje, Izdavačko i knjižarsko preduzeće Geca Kon a.d., Beograd.
126. Grdović S, Mačukanović-Jocić M, 2006, Praktikum iz botanike sa radnom sveskom za studente Fakulteta veterinarske medicine, Beograd.
127. Gregory JL, Hall P, Leech M, Morand EF, Hickey MJ, 2009, Independent roles of macrophage migration inhibitory factor and endogenous, but not exogenous glucocorticoids in regulating leukocyte trafficking, *Microcirculation*, 16, 735-48.
128. Grossarth-Maticek R, Kiene H, Baumgartner SM, Ziegler R, 2001, Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study, *Altern Ther Health Med*, 7, 3, 57-78.
129. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ, 2005, Acute phase reaction and acute phase proteins, *J Zhejiang Univ Sci*, 6B, 11, 1045-56.
130. Guarrera PM, 1990, Usi tradizionali delle piante in alcune aree marchigiane, *Informatore Botan Ital*, 22, 155-67.
131. Guarrera PM, 1994, Il patrimonio etnobotanico del Lazio, Regione Lazio e Dipartimento di Biologia Vegetale, Roma, 301.
132. Hager M, Cowland JB, Borregaard N, 2010, Neutrophil granules in health and disease, *J Intern Med*, 268, 25-34.
133. Hajrulai Z, 2001, Efektot na ekstraktot *Helleborus odoros* vrz proteinskiot status kaj jagninjata, Doktorska disertacija, Skoplje.
134. Hajrulai Z, Dogani A, Mickova S, Tosevski J, 2002, The influence of BT cells on the protein status in sheep, 9th International Conference for Ovine and

Caprine Production, 7th International Symposium on Animal Reproduction, Ohrid, 78-79.

135. Hajrulai-Musliu Z, Tosevski J, Stojkovski V, 2004, Influence of *Helleborus odorus* extract on some electrolytes in lambs, XXXIX Croatian symposium on agriculture with International Participation, Opatija, Hrvatska, 741-2.
136. Halliwell B, Gutteridge JMC, 2007, Free radicals in biology and medicine, 4th Ed. Oxford University Press, Grune Strottan, New York.
137. Han KQ, Huang G, Gu W, Su YH, Huang XQ, Ling CQ, 2007, Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic on transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice, World J Gastroenterol, 13, 24, 3374-9.
138. Hanson JR, 2003, Natural Products: The Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, UK.
139. Harborne JB, 1965, Plant polyphenols – XIV.: Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses, Phytochemistry, 4, 107-20.
140. Harborne JB, 1967, Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London, New York, 136.
141. Hardman R, Benjamin TV, 1976, The co-occurrence of the ecdysones with bufadienolides and steroidal saponins in the genus *Helleborus*, Phytochemistry, 15, 10, 1515-6.
142. Hardman R, Benjamin T, 1980, The Detection of *Helleborus* Ecdysteroides by Mass Spectrometry and by GLC Analysis of their TSIM-ethers, Planta Med, 39, 148-52.
143. Hauser E, Linde HHA, Živanov D, 1972, Ein neues Bufadienolid aus *Helleborus odorus* Waldst. et Kit., Helv Chim Acta, 55, 7, 2625-8.
144. He XJ, Tang JS, Qiao AM, Wang GH, Jiang MM, Liu RH, Yao XS, 2006, Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus niger*, Steroids, 71, 5, 392-402.
145. Hegardt C, Andersson G, Oredsson SM, 2003, Spermine prevents cytochrome *c* release in glucocorticoid-induced apoptosis in mouse thymocytes, Cell Bio Int, 27, 115-21.
146. Hikino H, Takemoto T, 1972, Arthropod moulting hormones from plants, *Achyranthes* and *Cyathula*, Naturwissenschaften, 59, 3, 91-8.
147. Hilendarski medicinski kodeks N° 517, 1989, Prevod (priredio i uvodnu studiju napisao Relja Katić), Narodna biblioteka Srbije Beograd, Dečje novine Gornji Milanovac, Republički zavod za međunarodnu naučnu, prosvetnu, kulturnu i tehničku saradnju SR Srbije Beograd.
148. Hill R, van Heyningen R, 1951, Ranunculin: the precursor of of the vesicant substance of the buttercup, Biochem J, 49, 332-5.
149. Holliman A, Milton D, 1990, *Helleborus foetidus* poisoning of cattle, Vet Rec, 127, 13, 339-40.

150. Hong C, Shibayama-Imazu T, Masuda Y, Shinki T, Nakajo S, Nakaya K, 2007, Involvement of Tiam 1 in apoptosis induced by bufalin in HeLa cells, *Anticancer Res*, 27, 11, 245-9.
151. Horstmann B, Zinser E, Turza N, Kerek F, Steinkasserer A, 2008, MCS-18, a novel natural product isolated from *Helleborus purpurascens*, inhibits dendritic cell activation and prevents autoimmunity as shown *in vivo* using the EAE model, *Immunobiology*, 212, 839-53.
152. Hu J, Kinn J, Zirakzadeh AA, Sherif A, Norstedt G, Winström AC, Winqvist O, 2013, The effects of chemotherapeutic drugs on human monocyte-derived dendritic cell differentiation and antigen presentation, *Clin Exp Immunol*, 172, 3, 490-9.
153. Hualde C, Ormazábal A, 2002, Usos y prácticas de medicina y veterinaria popular en la Campina de Guadalajara, *Caudernos de Etnología de Guadalajara*, 34, 273-306.
154. Hue L, Taegtmeier H, 2009, The randle cycle revisited: a new head for an old hat, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, 578-91.
155. Husemann A, Marmé W, 1865, Über Helleborein und Helleborin, *Liebig's Annal Chem Pharm*, 135, 55.
156. Hussain A, Khan MN, Iqbal Z, Sajid MS, 2008, An account of the botanical antihelmintics used in traditional veterinary practices in Sahiwal district of Punjab, Pakistan, *J Ethnopharmacol*, 119, 185-90.
157. Idolo M, Motti R, Mazzoleni S, 2010, Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a longhistory protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines), *J Ethnopharmacol*, 127, 379-95.
158. Jäger AK, Gauguin B, Adersen A, Gudiksen L, 2006, Screening of plants used in Danish folk medicine to treat epilepsy and convulsions, *J Ethnopharmacol*, 105, 294-300.
159. Jain CN, 1993, *Essentials of Veterinary hematology*. Lea & Febiger Philadelphia.
160. James LF, Panter KE, Stegelmeir BL, Molyneux RJ, 1994, Effect of natural toxins on reproduction, *Vet Clin North Am: Food Anim Pract*, 10, 3, 587-603.
161. Jančić R, 2002, *Botanika farmaceutika*, Beograd.
162. Jarić S, Popović Z, Mačukanović-Jocić M, Đurđević L, Mijatović M, Karadžić B, Mitrović M, Pavlović P, 2007, An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia), *J Ethnopharmacol*, 111, 160-75.
163. Jesse P, Mottke G, Seifert G, Henze G, Prokop A, 2007, Apoptosis induced by extracts of *Helleborus niger* in different lymphoma and leukemia cell lines and primary lymphoblasts of children with ALL or AML is independent of Smac overexpression and executed via the mitochondrial pathway, *Society for Integrative Oncology 4th Annual Conference*, San Francisco, USA, Selected abstracts, 178.

164. Jesse P, Mottke G, Eberle J, Henze G, Prokop A, 2008, *Helleborus niger* as new cytostatic compound against lymphoma and leukemia in childhood, *Europ J Integrat Med*, 1, 1, 5-6.
165. Jesse P, Mottke G, Eberle J, Seifert G, Henze G, Prokop A, 2009, Apoptosis-inducing activity of *Helleborus niger* in ALL and AML, *Pediatr Blood Cancer*, 52, 464-9.
166. Johnson CT, Routledge JK, 1971, Suspected *Helleborus viridis* poisoning of cattle, *Vet Rec*, 89, 202.
167. Juan M, Mullor J, Roca-Ferrer J, Fuentes M, Pe'rez M, Vilardell C, Yagüe J, Picado C, 1999, Regulation of ICAM-3 and other adhesion molecule expressions on eosinophils *in vitro*. Effects of dexamethasone, *Allergy*, 54, 1293-8.
168. Judd SW, Campbell SC, Kellogg AE, Stevens FP, 1999, *Plant Systematics a Phylogenetic approach*, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts USA.
169. Kálmán A, Argay A, Ribár B, Živanov-Stakić D, Vladimirov S, 1985, Structure of the Steroid Sapogenin: Spirosta-5,25(27)-diene-1 β ,3 β ,11 α -triol Monohydrate, *Acta Cryst*, C41, 1645-7.
170. Kamano Y, Kotake A, Hashima H, Inoue M, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Nandachi N, Segawa T, Yukita A, Saitou K, Katsuyama M, Pettit GR, 1998, Structure-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides, *Bioorg Med Chem*, 6, 7, 1103-15.
171. Karrer W, 1943, Über Hellebrin, ein krystallisiertes Glykosid aus Radix *Hellebori nigri*, *Helv Chim Acta*, 26, 1353-67.
172. Kashin VA, Zvartau EE, Fedorova OV, Bagrov YY, Lakatta EG, Bagrov AY, 2008, Endogenous bufadienolide mediates pressor response to ethanol withdrawal in rats, *Eur Neuropsychopharmacol*, 18, 1, 74-7.
173. Keller O, Schöbel W, 1928, Über Inhaltsstoffe der Wurzeln von *Helleborus niger* und *viridis*; neue Alkaloide aus *Helleborus viridis*, *Arch Pharm*, 266, 545-72.
174. Kemertelidze EP, Dalakishvili TsM, 1996, *Biologicheski aktivnye lipidy rastenij Gruzii*, Tbilisi, Russian.
175. Kemertelidze EP, 2007, Biologically active compounds and original remedies from plants growing in Georgia, *Bull Georg Natl Acad Sci*, 175, 1, 91-6.
176. Kerek F, 1981, Boicil, a new and very efficient antialgic, spasmolytic and blood vessel regulation drug obtained from the plant *Helleborus*, *FECS Int Conf Chem Biotechnol Biol Act Nat Prod*, 2, 22-37.
177. Kerek F, 1997, *Offenlegungsschrift*, Patentnummer: DE 196 00 301 A1, Bioregulatorischer Wirkstoff, Verfahren zu seiner Herstellung sowie dessen Verwendung, Deutsches Patentamt, München, Germany.

178. Kerek F, Szegli G, Cremer L, Lupu AR, Durbaca S, Calugaru A, Herold A, Radu DL, 2008, The novel arthritis-drug substance MCS-18 attenuates the antibody production *in vivo*, *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55, 1, 15-31.
179. Kißmer B, Wichtl M, 1986, Bufadienolide aus Samen von *Helleborus odoratus*, *Planta Med*, 2, 152-3.
180. Kißmer B, Wichtl M, 1987, Ecdysone aus Wurzeln und Samen von Helleborus-Arten, *Arch Pharm (Weinheim)*, 320, 541-6.
181. Kišgeci J, 2002, *Lekovito bilje*, Partenon, Beograd.
182. Kofler L, Steidl G, 1934, Über das Vorkommen und die Verteilung von Saponinen in pflanzlichen drogen. II Blätter, Früchte, Rinden, Hölzer, Wurzeln und Rhizome, *Arch Pharmaz*, 272, 10-34, 300-12.
183. Koj A, Dubin A, Kasperczyk H, Bereta J, Gordon AH, 1982, Changes in the blood level and affinity to concanavalin A of rat plasma glycoproteins during acute inflammation and hepatoma growth, *Biochem J*, 206, 545-53.
184. Kojić M, Janjić V, 1991, *Otrovne biljke*, Naučna knjiga, Beograd.
185. Kolesnikov DG, Tropp MI, 1952, Cardiac glycosides from root of *Helleborus*, *Med Prom SSSR*, 6, 5, 17-20.
186. Koromila T, Baniwal SK, Song YS, Martin A, Yiong J, Frenvel B, 2013, Glucocorticoids antagonize RUNX2 during osteoblast differentiation in cultures of ST2 pluripotent mesenchymal cells, *J Cell Biochem*, doi:10.1002/jcb.24646.
187. Kovačević N, Jančić R, 2003, 100 lekovitih biljaka kroz tradiciju i savremeni život srpskog naroda, *Srpska školska knjiga*, Beograd.
188. Kovačević N, 2004, *Osnovi farmakognozije*, Srpska školska knjiga, Beograd.
189. Krenn L, Kopp B, 1998, Bufadienolides from animal and plant sources, *Phytochemistry*, 48, 1, 1-29.
190. Kültür S, 2007, Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey), *J Ethnopharmacol*, 111, 341-64.
191. Kuo PC, Kuo TH, Su CR, Liou MJ, Wu TS, 2008, Cytotoxic principles and α -pyrone ring opening derivatives of bufodienolides from *Kalanchoe hybrida*, *Tetrahedron*, 64, 15, 3392-6.
192. Kusenda M, Kaske M, Piechotta M, Locher L, Starke A, Huber K, Rehage J, 2013, Effects of dexamethasone-21-isonicotinate on peripheral insulin action in dairy cows 5 days after surgical correction of abomasal displacement, *J Vet Intern Med*, 27, 1, 200-6.
193. Kušan F, 1956, *Ljekovito i drugo korisno bilje*, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
194. Kušević V, 1962, Assay of digitalis in pigeons by intraperitoneal administration, *J Pharm Pharmacol*, 14, 1, 96-102.
195. Kuštrak D, 2005, *Farmakognozija-Fitofarmacija*, Tehnička knjiga, Zagreb.

196. Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, 2007-a, Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada, *Vet Parasitol*, 148, 325-40.
197. Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W, 2007-b, Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada, *J Ethnobiol Ethnomed*, 3, 11, doi:10.1186/1746-4269-3-11, (Source: <http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/11>).
198. Lans C, Turner N, Brauer G, Khan T, 2009, Medicinal plants used in British Columbia, Canada for reproductive health in pets, *Prev Vet Med*, 90, 268-73.
199. Lebreton P, 1986, Flavonoids, taxonomic markers in the *Ranunculaceae*, *Plant Med Phytother*, 20, 275-86.
200. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R, 2005, Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis, *J Clin Oncol*, 23, 2411-22.
201. Lentini F, 2000, The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily, *Fitoterapia*, 71, 83-8.
202. Leonard Jr. EC, 2004, Did some 18th and 19th century treatments for mental disorders act on the brain?, *Med Hypotheses*, 62, 219-21.
203. Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L, 2009, A comparasion of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited?, *J Ethnopharmacol*, 121, 2, 255-67.
204. Leporatti ML, Pavesi A, 1989, Usi nuovi, rari o interessanti di piante officinali di alcune zone della Calabria, *Webbia*, 43, 269-89.
205. Leporatti ML, Impieri M, 2007, Ethnobotanical notes about some uses of medicinal plants in Alto Tirrenco Cosentino area (Calabria, Southern Italy), *J Ethnobiol Ethnomed*, 3, 34, doi:10.1186/1746-4269-3-34, (Source: <http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/34>).
206. Li SQ, Eim C, Kirchs U, Lang RE, Schoner W, 1998, Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of Proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities, *Life Sci*, 62, 1023-33.
207. Li D, Qu X, Hou K, Zhang Y, Dong Q, Teng Y, Zhang J, Liu Y, 2009, PI3K/Akt is involved in bufatalin-induced apoptosis in gastric cancer cells, *Anticancer Drugs*, 20, 1, 59-64.
208. Li Z, Gao H, Wang J, Qu T, Chen L, Wang Z, Zhang Q, 2011, Inhibitory effect of total bufadienolides from toad venom against H22 tumor in mice and their metabolites, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 36, 21, 2987-93.
209. Liberati TA, Sansone SR, Feuston MH, 2004, Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls, *Vet Clin Pathol*, 33, 22, 68-72.
210. Liedtke S, Lorch E, Goedings P, Wichtl M, 1997, Isolierung von β -Ecdyson und Macranthosid I aus Wurzeln und Rhizomen von *Helleborus niger* subsp. *niger* (Ranunculaceae), *Pharmazie*, 52, 964-5.

211. Linde H, Isaac O, Linde H, Živanov D, 1971, Über die Konstitution eines neuen Sapogenins aus *Helleborus odoratus* Waldst. et Kit. und *Helleborus niger* L., *Helv Chim Acta*, 54, 6, 1703-8.
212. Lindholm P, Gullbo J, Claeson P, Göransson U, Johansson S, Backlund A, Larsson R, Bohlin L, 2002, Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts, *J Biomolec Screen*, 7, 4, 333-40.
213. Linke S, Dufter C, Kerek F, Jung M, Watzlik A, Jung T, Opelz G, Terness P, 1998, Functional Characterization of HP12: A Novel Immunosuppressant Purified from Helleborus Species, *Transplant Proc*, 30, 4106-7.
214. Littmann L, Rößner S, Kerer F, Steinkasserer A, Zinser E, 2008, Modulation of murine bone marrow-derived dendritic cells and B-cells by MCS-18 natural product isolated from *Helleborus purpurascens*, *Immunobiology*, 213, 871-8.
215. Lukić P, 1993, *Farmakognozija, Naučna knjiga*, Beograd.
216. Ma XC, Cui J, Zheng J, Guo DA, 2007, Microbial transformation of three bufadienolides by *Penicillium aurantigriseum* and its application for metabolite identification in rat, *J Mol Catal B: Enzym*, 48, 1-2, 42-50.
217. Ma XC, Xin XL, Liu KX, Han J, Guo DA, 2008, Microbial transformation of cinobufagin by *Syncephalastrum racemosum*, *J Nat Prod*, 71, 7, 1268-70.
218. Macfarlane DP, Forbes S, Wolker BR, 2008, Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: Fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome, *J Endocrinol*, 197, 189-204.
219. Madsen SH, Andreassen KV, Christensen ST, Karsdal MA, Sverdrup FM, Bay-Jensen AC, Henriksen K, 2011, Glucocorticoids exert context-dependent effects on cells of the joint *in vitro*, *Steroids*, 76, 13, 1474-82.
220. Maksimović Z, 1998, *Farmakognozijsko proučavanje Helleborus serbicus* Adam., *Ranunculaceae*, Magistarska teza, Beograd.
221. Maleš Ž, Medić-Šarić M, 2001, Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *J Pharm Biomed Anal*, 24, 3, 353-9.
222. Marinković S, Baumann H, 1990, Structure, hormonal regulation, identification of the interleukin-6 and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene, *Mol Cell Biol*, 10, 4, 1573-83.
223. Martin ML, San Roman L, Dominguez A, 1990, In vitro activity of protoanemonin, an antifungal agent, *Planta Med*, 56, 66-9.
224. Martin ML, Mathias E, Mc Corkle CM, 2001, *Ethnoveterinary medicine: an annotated bibliography of community animal health care*, ITDG, London.
225. Martinek AV, 1973, Über ein unbekanntes, gut kristallisierbares glycosid aus den getrockneten blättern von *Helleborus niger*, *Planta Med*, 24, 73-82.
226. Martinek AV, 1974-a, Quantitative bestimmung eines neuen glycosids aus *Helleborus niger*, *Planta Med*, 25, 376-84.

227. Martinek AV, 1974-b, Ranuncosid als inhaltsstoff der getrockneten blätter, stengel und blüten von *Helleborus niger*, *Planta Med*, 26, 218-24.
228. Martínez GJ, Luján MC, 2011, Medicinal plants used for traditional veterinary in the Sierras de Córdoba (Argentina): an ethnobotanical comparison with human medicinal uses, *J Ethnobiol Ethnomed*, 7, 1, 23.
229. Martinis Z, 1974, Oblici i razvoj trihoma i trihomoidnih tvorevina na listovima nekih vrsta roda *Helleborus* i njihovo značenje za taksonomiju roda, *Acta Bot Croat*, 33, 93-109.
230. Mathew B, 1989, *Hellebores*, Alpine Garden Society Publications, Woking.
231. Mathias E, 2004, Ethnoveterinary medicine: harnessing its potential, *Vet Bull*, 74, 27-37.
232. Mattioli PA, 1568, I discorsi di M. Pietro Andrea Mattioli nelli sei libri di Pedacio Dioscoride Anazarbeo, Vincenzo Valgrisi, Venezia, 1282.
233. Mačukanović-Jocić M, Blaženčić Ž, 2000, Najčešće korišćene biljne vrste u fitoterapiji domaćih životinja, *Arh farm*, 3-4, 372-3.
234. Машковский МД, 1977, Лекарственные средства, часть I-II, Медицина, Москва.
235. McLewin W, Mathew B, 1995, *Hellebores*: the first of a series of articles discussing the genus *Helleborus*, *New Plantsm*, 2, 112-22.
236. Meiners J, Debener T, Schweizer G, Winkelmann T, 2011, Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers, *Scient Horticult*, 128, 38-47.
237. Meiners J, Winkelmann T, 2012, Evaluation of reproductive barriers and realisation of interspecific hybridisations depending on genetic distances between species in the genus *Helleborus*, *Plant Biol (Stuttg)*, doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00542.x.
238. Mellor S, 2000, Alternatives to antibiotics, *Feed Mix*, Special edition, 6-8.
239. Meng Y, Whiting P, Šik V, Rees HH, Dinan L, 2001, Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborus torquatus* (Ranunculaceae), *Phytochemistry*, 57, 401-7.
240. Menković N, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S., Vincek D, 2011, Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro), *J Ethnopharmacol*, 133, 97-107.
241. Mijatović T, Quaquebeke EV, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R, 2007, Cardiac steroids on the road to anti-cancer therapy, *Biochim Biophysica Acta*, 1776, 32-57.
242. Mijatović T, De Nève N, Gailly P, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, Lapeira J, Decaestecker C, Facchini V, Kiss R, 2008, Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity, *Mol Cancer Ther*, 7, 5, 1285-96.

243. Milanović S, Lazarević M, Jovanović M, 2004, Uticaj ekstrakta korena *Helleborus odoratus* na imunski sistem pacova soja Wistar, Zbornik radova, 6. međunarodno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, Budva, 355-7.
244. Milbradt A, Kerek F, Moroder I, Renerr C, 2003, Structural Characterization of Hellethionins from *Helleborus purpurascens*, Biochemistry, 42, 2404-11.
245. Milićević MĐ, 1894, Život Srba seljaka, Državna štamparija, Beograd.
246. Mimaki Y, Watanabe K, Sakuma C, Sakagami H, Sashida Y, 2003, Novel polyoxygenated spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*, Helv Chim Acta, 86, 2, 398-407.
247. Mimaki Y, Matsuo Y, Watanabe K, Sakagami H, 2010, Furostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*, J Nat Med, 64, 452-9.
248. Mitruka BJ, Rawnsley HM, 1981, Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. 2nd ed. New York: Masson.
249. Mladenović M, Stefanović O, 1963, Prilog upoznavanju azotnih materija *Helleborusa*, Glasnik hemijskog društva, 28, 157-61.
250. Moodley N, Crouch NR, Mulholland DA, 2007, Bufadienolides from *Drimia macrocentra* and *Urginea riparia* (Hyacinthaceae: Urgineoideae), Phytochemistry, 68, 19, 2415-9.
251. Moore MD, 2000, Chapter 189: Hematology of the Rat (*Rattus norvegicus*) in Feldman FB et al.: Fifth edition Schalm's Veterinary Hematology, Copyright © 2000 Lippincott Williams & Wilkins.
252. Muhr P, Kerek F, Dreveny D, Likussar W, Schubert-Zsilavec M, 1995, The Structure of Hellebrin, Liebig's Ann, 443-4.
253. Mulet L, 1991, Estudio Ethnobotánico de la Provincia de Castellón, Diputación de Castellón, Castellón, Spain, 596.
254. Murray MT, 1995, The healing power of herbs, Rocklin, Calif, Prima.
255. Muzashvili T, Skhirtladze A, Sulakvelidze Ts, Kemertelidze E, 2006-a, Phytoecdysteroid from underground parts of *Helleborus caucasicus* A. Br., Georgia Chem J, 6, 6, 680-1.
256. Muzashvili T, Skhirtladze A, Sulakvelidze Ts, Benidze M, Mshvildadze V, Legault J, Pichette A, Kemertelidze E, 2006-b, Cytotoxic activity of *Helleborus caucasicus* A. Br., Georgia Chem J, 6, 6, 684-5.
257. Muzashvili T, Perrone A, Napolitano A, Kemertelidze E, Pizza C, Piacente S, 2011, Caucasicosides E-M, furostanol glycosides from *Helleborus caucasicus*, Phytochemistry, 72, 17, 2180-8.

258. Napolitano M, Sennato S, Botham KM, Bordi F, Bravo E, 2013, Role of macrophage activation in the lipid metabolism of postprandial triacylglycerol-rich lipoproteins, *Exp Biol Med (Maywood)*, 238, 1, 98-110.
259. Narla A, Dutt S, Mc Auley JR, Al-Shahrour F, Hurst S, Mc Conkey M, Neuberg D, Ebert BL, 2011, Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis, *Blood*, 118, 8, 2296-304.
260. Neascu C, Ciobanu C, Barbu I, Toader O, Szegli G, Kerek F, 2010, Substance MCS-18 isolated from *Helleborus purpurascens* is a potent antagonist of the capsaicin receptor, TRPV1, in rat cultured sensory neurons, *Physiol Res*, 59, 289-98.
261. Ngo D, Beaulien E, Gu R, Leaney A, Santos L, Fan H, Yang Y, Kao W, Xu J, Escriou V, Loiler S, Vervoordeldonk MJ, Morand EF, 2013, Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models in inflammation and arthritis, *Arthritis Rheum*, 65, 5, 1203-12.
262. Nica S, Stanescu L, Krejci G, 2005, A randomised double-blind phase II study with injection constaining MCS-18 as active substance in 3+1 doses versus placebo in the treatment of painful shoulder periartthritis, *Clin Trial Rep*, 1-216.
263. Ning J, Wu TH, Tian Y, Wang CY, Tian G, Zhang BJ, Liu KX, Ma XC, 2010, Identification of cinobufagin metabolites in the bile of rats, *Xenobiotica*, 40, 1, 48-54.
264. Nissen RM, Yamamoto KR, 2000, The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interferinf with serine-2 posphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domaim, *Genes Dev*, 14, 18, 2314-29.
265. Nueleanu VI, 2007, Research concerning the imunostimulator effect of *Helleborus purpurascens* extract upon the young sheep, *Buletin USAMV-Cluj-Napoca, Anim Sci Biotechnol*, 63, 1-2, 211-5.
266. Nueleanu VI, 2008, The effect of the unspecific therapy with hellebore (*Helleborus purpurascens*) on young sheep, *Proceedings, 43rd Croatian and 3td International Symposium on Agriculture, 18-21 February 2008, Opatija, Croatia, Anim Husb*, 791-4.
267. Olinescu A, Hristescu S, Poliopol M, Agache F, 1986, Effects of Boicil[®] on some immunocompetent cells I. In vitro modulation of the human peripheral blood lymphocyte function, *Arch Roum Pathol Exp Microbiol*, 45, 1, 33-45.
268. Olinescu A, Hristescu S, Poliopol M, Agache F, Kerek F, 1987, The effects of Boicil[®] on some immunocompetent cells II. In vitro and in vivo modulation of the mouse cellular and humoral immune response, *Arch Roum Pathol Exp Microbiol*, 46, 2, 147-58.
269. O'Neil LA, 2006, How Tool-like receptors signal: what we know and what we don't know, *Curr Opin Immunol*, 18, 3-9.

270. Opiro R, Akol AM, Okello-Onen J, 2010, Ethnoveterinary botanicals used for tick kontrol in the acholi sub region of Uganda, *J Anim Vet Advances*, 9, 2951-4.
271. Pan J, Ju D, Wang Q, Zhang M, Xia D, Zhang L, Yu H, Cao X, 2001, Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway, *Immunol Lett*, 76, 3, 153-61.
272. Paris RR, Moyse H, 1981, In: *Précis de Matière Médicale*, Volumi 3, Masson (Eds), Paris, 152-3.
273. Pascual-Villalobos MJ, Robledo A, 1998, Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants, *Ind Crop Product*, 8, 183-94.
274. Passalacqua NG, De Fine G, Guarrera PM, 2006, Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region (Southern Italy), *J Ethnobiol Ethnomed*, 2, 52-68.
275. Păun-Roman G, Neagu E, Radu GL, 2010, Membrane processes for the purification and concentration of *Helleborus purpurascens* extracts and evaluation of antioxidant activity, *Rev Chim (Bucharest)*, 61, 877-81.
276. Păun Roman G, Litescu SC, Neagu E, Tache A, Radu GL, 2013, Evaluation of *Geranium* spp., *Helleborus* spp. and *Hyssopus* spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and α -chymotrypsin, *J Enzyme Inhib Med Chem*, doi: 10.3109/14756366.2012.749399.
277. Pěnčík A, Rolčík J, Novák O, Magnus V, Barták P, Buchtík R, Salopek-Sondi B, Strnad M, 2009, Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction, *Talanta*, 80, 651-5.
278. Perić L, Žikić D, Lukić M, 2009, Application of alternative growth promoters in broiler production, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25, 5-6, 387-97.
279. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH, 2004, Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry, *Vet Res*, 35, 163-87.
280. Petričić J, Petričić V, Barišić Poljak N, 1967, Određivanje i izolacija helebrina podzemnih dijelova biljke *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *Acta Pharm Jug*, 17, 29-34.
281. Petričić J, Holik L, Tarle Đ, 1968, O pripremi nekih bufodienolida i usporedbi njihovih bioloških vrijednosti s kardenolidima tipa strofantidina, *Farmac glasnik*, 24, 7, 285-91.
282. Petričić J, Tarle Đ, Kupinić M, 1969, Über die Struktur des Macranthogenins, des Hauptaglykons der Saponine aus den unterirdischen Teilen von *Helleborus macranthus* Freyn., *Acta Pharm Jug*, 19, 149-53.
283. Petričić J, Tarle Đ, Dražin V, 1970, Priprema sapogenina iz podzemnih dijelova biljke *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *Acta Pharm Jug*, 20, 33-4.

284. Petričić J, Tarle D, Holik L, 1971-a, Über das vorkommen des hellebrins in den unterirdischen teilen der *Helleborus*-arten Jugoslawiens, *Planta Med*, 20, 4, 143-6.
285. Petričić J, Tarle D, Abinun S, 1971-b, Hemolitička djelotvornost nekih vrsta roda *Helleborus*, *Acta Pharm Jug*, 21, 71-8.
286. Petričić J, Tarle Đ, Holik L, 1972, Heleborogenon - nova supstancija izolirana iz podzemnih dijelova vrsta *Helleborus*, *Acta Pharm Jug*, 22, 153-8.
287. Petričić J, 1974, The Genus *Helleborus*: Chemistry of Subterranean Parts, *Acta Pharm Jug*, 24, 179-85.
288. Petričić J, Tarle Đ, Knežević E, 1977, *Helleborus* chemotypes from Yugoslavia recognizable by hellebrin contents, *Acta Pharm Jug*, 27, 127-9.
289. Petruț H, Bolte S, 2001, Comportamentul tumorilor Walker 256 sub tratamentul cu extractul purificat de *Helleborus*, *Lucrări științifice med vet*, XXXIV, Timișoara, 291-8.
290. Philianos S, Harvala C, Paris R, 1983, Sur les constituants des feuilles basales d' *Helleborus cyclophyllus* Boiss, *Plantes médicinales et phytothérapie*, XVII, 2, 83-8.
291. Phondani PC, Maikhuri RK, Kala CP, 2010, Ethnoveterinary uses of medicinal plants among traditional herbal healers in Alaknanda catchment of Uttarakhand, India, *Afric J Trad Complement Altern Med*, 7, 195-206.
292. Pieroni A, 2000, Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy, *J Ethnopharmacol*, 70, 235-73.
293. Pieroni A, Howard P, Volpato G, Santoro RF, 2004, Natural remedies and nutraceuticals used in ethnoveterinary practices in inland southern Italy, *Vet Res Commun*, 28, 55-80.
294. Prassas I, Diamandis EP, 2008, Novel therapeutic applications of cardiac glycosides, *Nat Rev Drug Discov*, 7, 11, 926-35.
295. Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje, 2002, "Službeni list SRJ", 51/2002, Zakon o organskoj proizvodnji Republike Srbije, "Službeni list SRJ", 28/2000.
296. Prelovsek O, Mars T, Jevsek M, Podbregar M, Grubić Z, 2006, High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, 1651-6.
297. Prieto JM, Siciliano T, Braca A, 2006, A new acylated quercetin glycoside and other secondary metabolites from *Helleborus foetidus*, *Fitoterapia*, 77, 3, 203-7.

298. Prieto JM, Schaffner U, Barker A, Braca A, Siciliano T, Boevé JL, 2007, Sequestration of furostanol saponins by *Monophadnus* sawfly larvae, *J Chem Ecol*, 33, 513-24.
299. Pritchett KR, Corning BF, 2004, *Biology and Medicine of Rats*, In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, Reuter JD and Suckow MA (Eds.), International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).
300. Puglisi S, Speciale A, Acquaviva R, Ferlito G, Ragusa S, De Pasquale R, Iauk L, 2009, Antibacterial activity of *Helleborus bocconeii* Ten. subsp. *siculus* root extracts, *J Ethnopharmacol*, 125, 175-7.
301. Puschett JB, Agunanne E, Uddin MN, 2010, Marinobufagenin, resibufagenin and preeclampsia, *Biochim Biophys Acta*, 1802, 12, 1246-53.
302. Qi F, Li A, Inagaki Y, Kokudo N, Tamura S, Nakata M, 2011, Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor, *Internat Immunopharmacol*, 11, 3, 342-9.
303. Qing L, Lv L-L, Wu M, Zhang X-L, Liu B-C, Liu H, 2013, Dexamethasone prevents monocyte-induced tubular epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells, *J Cell Biochem*, 114, 632-8.
304. Quave CL, Lohani U, Verde A, Fajardo J, Rivera D, Obon C, Valdes A, Pieroni A, 2010, A comparative assessment of zootherapeutic remedies from selected areas in Albania, Italy, Spain and Nepal, *J Ethnobiol*, 30, 92-125.
305. Raimondo FM, Lentini F, 1990, Indagini etnobotaniche in Sicilia, I. Le piante della flora locale nella tradizione popolare delle Madonie (Palermo), *Nat Sicil*, 3/4, 77-99.
306. Ranta F, Avram D, Berchtold S, Düfer M, Drews G, Lang F, Ullrich S, 2006, Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4, *Diabetes*, 4, 1380-90.
307. Rashan LJ, Franke K, Khine MM, Kelter G, Fiebig HH, Neumann J, Wessjohann LA, 2011, Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*, *J Ethnopharmacol*, 134, 3, 781-8.
308. Resnitschenko AA, Tropp MJ, Kolesnikov DG, 1961, Neue Angaben über die Bufadienolid-Zusammensetzung des *H. purpurascens* W. u. K. und *H. caucasius* A. Br. (russ.), *Med Prom*, 3, 15-17.
309. Rhen T, Cidlowski JA, 2006, Estrogens and glucocorticoids have opposing effects on the amount and latent activity of complement proteins in the rat uterus, *Biol Reprod*, 74, 2, 265-74.
310. Ribár B, Kapor A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Argay G, Kálmán A, 1986, Structure of Spirosta-5,25(27)-diene-3 β ,11 α -diol, *Acta Cryst*, C42, 1780-2.
311. Ribeiro JC, Vagnaldo FF, Ribiero MZ, Barreiro EJ, Lima LM, Ricardo NM, Amaral de Moraes ME, Odorico de Moraes M, 2012, Potential inhibitory

effect of LASSBIO-596, a new thalidomide hybrid, on inflammatory corneal angiogenesis in rabbits, *Ophthalmic Res*, 48, 4, 177-85.

312. Rico A, 1984, Veterinary Drugs and Public Health: the General Problem of Safety, In: Safety and Quality in Food, DSA Symposium, Brussels, Elsevier Pub, 89-96.
313. Ristoska D, 2002, Vlijanieto na ekstraktot od *Helleborus odorus* vrz krvnata slika i proteinemijata kaj svinjite, Magistarska teza, Skoplje.
314. Ristoska D, Ristoski T, Tosevski J, Ulčar I, 2002, Use of the *Helleborus odorus* extract in early detection of pathological conditions in pig production, 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Grugliasco (Turin) Italy, 215.
315. Ro KE, Keener CS, McPheron BA, 1997, Molecular phylogenetic study of the *Ranunculaceae*: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships, *Mol Phylogenet Evol*, 8, 117-27.
316. Rosselli S, Maggio A, Formisano C, Napolitano F, Senatore F, Spadaro V, Bruno M, 2007, Chemical composition and antibacterial activity of extracts of *Helleborus bocconei* Ten. subsp. *intermedius*, *Nat Prod Commun*, 2, 675-9.
317. Rosselli S, Maggio A, Bruno M, Spadaro V, Formisano C, Irace C, Maffettone C, Mascolo N, 2009, Furostanol saponins and ecdysones with cytotoxic activity from *Helleborus bocconei* ssp. *intermedius*, *Phytother Res*, 23, 1243-9.
318. Saklatvala J, 2002, Glucocorticoids: do we know how they work?, *Arthritis Res*, 4, 3, 146-50.
319. Sampey AV, Hutchinson P, Morand EF, 2000, Annexin I and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synoviocytes, *Mediators Inflamm*, 9, 3-4, 125-32.
320. Sarić RM, 1989, Lekovite biljke SR Srbije, SANU, Posebna izdanja, knjiga DXCVIII, Odeljenje prirodno matematičkih nauka, knjiga 65, Beograd.
321. Savković T, Jokanović M, Tojagić S, Ristić M, 2006, Upotreba lekovitog i bilja u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, IV Međunarodna Eko-Konferencija Zdravstveno bezbedna hrana (Safe Food), 20-23. septembar 2006, Novi Sad, Temarski zbornik-Proceedings (II), 217-22.
322. Schepetkin IA, Quinn MT, 2006, Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential, *Internat Immunopharmacol*, 6, 317-33.
323. Schermer S, 1967, The blood morphology of laboratory animals, Philadelphia: FA Davis.
324. Scherrer AM, Motti R, Weckerle CS, 2005, Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy), *J Ethnopharmacol*, 97, 129-43.

325. Schmelz EA, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Bowers WS, 2002, Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids, Arch Insect Biochem Physiol, 51, 4, 204-21.
326. Schmutz J, 1949, Die Konstitution des Hellebrigenins, Helv Chim Acta, 32, 1442-52.
327. Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W, 1998, Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of sodium pump, J Biol Chem, 273, 2, 784-92.
328. Schoner W, 2002, Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones, Eur J Biochem, 269, 2440-8.
329. Schoner W, Scheiner-Bobis G, 2007, Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action, Am J Cardiovasc Drugs, 7, 3, 173-89.
330. Schreiber G, Tsykin A, Aldred AR, Thomas T, Fung WP, Dickson PW, Cole T, Birch H, De Jong FA, Milland J, Ann NY, 1989, The acute phase response in the rodent, Acad Sci, 557, 61-85.
331. Secoy DM, Smith AE, 1983, Use of plants in control of agricultural and domestic pests, Econ Bot, 37, 1, 28-57.
332. Seifarth C, Littmann L, Resheq Y, Rössner S, Goldwisch A, Pangratz N, Kerek F, Steinkasserer A, Zinser E, 2011, MCS-18, a novel natural plant product prevents autoimmune diabetes, Immunol Lett, 139, 58-67.
333. Serebryakov VSh, 1982, Inhibition of guinea pig kidney cortex Na, K- ATP-ase by plant lipids from *Helleborus abchasicus*, Soobshch Akad Nauk Gruz SSR, 106, 3, 605-8.
334. Sharma N, Singh NK, Singh OP, Pandey V, Verma PK, 2011, Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows, Asian-Aust J Anim Sci, 24, 4, 479-84.
335. Shashidhara KC, Sudharshan Murthy KA, Basavana Gowdappa H, Abhijith B, 2013, Effect of high dose of steroid on platelet count in acute stage of dengue fever with thrombocytopenia, J Clin Diagn Research, 7, 7, 1397-400.
336. Shimada K, Ishii N, Ohishi K, Ro JS, Nambara T, 1986, Structure-activity relationship of cardiac steroids having a doubly linked sugar and related compounds for the inhibition of the Na⁺, K⁺-adenosine triphosphates, J Pharmacobio-Dyn, 9, 9, 755-9.
337. Shimizu Y, Inoue E, Ito C, 2004, Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice, Biol Pharm Bull, 27, 2, 256-60.
338. Shubov MI, 1952, Clinical findings on the effect of Helleborus glycosides (corelborine) in circulatory insufficiency, Klin Med (Moskva), 30, 11, 25-30.
339. Sieburg E, 1913, Ueber Helleborein, Arch Pharmaz, 251, 1-4, 154-83.

340. Simonović D, 1959, Botanički rečnik – imena biljaka, Srpska akademija nauka, Posebna izdanja, knjiga CCCXVIII, Institut za srpskohrvatski jezik, knjiga 3, Naučno delo, Beograd.
341. Singh CU, Streeper R, 2005, Patent Application Publication: US 2005/0026849 A1, Water soluble formulations of digitalis glycosides for treating cell-proliferative and other diseases, United States.
342. Slavík J, Bochořáková J, Slavíková L, 1987, Occurrence of magnoflorine and corytuberine in some wild or cultivated plants of Czechoslovakia, Collection Czechoslovak Chem Commun, 52, 804-12.
343. Sligl WI, Milner Jr DA, Sundar S, Mphatswe W, Majumdar SR, 2009, Safety and efficacy of corticosteroids for treatment of septic shock: a systematic review and meta-analysis, Clin Infect Dis, 49, 1, 93-101.
344. Sordillo LM, Aitken SL, 2009, Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle, Vet Immunol Immunopathol, 128, 104-9.
345. Soriano J, Riley J, Potter M, Bowers W, 2004, Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic Nematodes, J Chem Ecol, 30, 1885-99.
346. Souto WM, Mourão JS, Barboza RR, Mendonca LE, Lucena RF, Confessor MV, Vieira WL, Montenegro PF, Lopez LC, Alves RR, 2011-a, Medicinal animals used in ethnoveterinary practices of the "Cariri Paraibano", NE Brazil, J Ethnobiol and Ethnomed, 7, 30, doi:10.1186/1746-4269-7-30, (Source: <http://www.ethnobiomed.com/content/7/1/30>).
347. Souto WM, Mourão JS, Barboza RR, Alves RR, 2011-b, Parallels between zootherapeutic practices in ethnoveterinary and human complementary medicine in northeastern Brazil, J Ethnopharmacol, 134, 3, 753-67.
348. Spoerke JrDG, Smolinske SC, 1990, Toxicity of Houseplants, CRC Press: Boca Raton, FL, 37-9.
349. Sprung CL, Caralis PV, Marcial Eh, Pierce M, Gelbard MA, Long WM, Duncan RC, Tendler MD, Karpf M, 1984, The effects of high-dose corticosteroids in patient with septic shock. A perspective, controlled study, N Engl J Med, 311, 18, 1137-43.
350. Stefanović O, Mladenović M, 1960, Steroli *Helleborusa*, Acta Pharm Jug, 10, 85-9.
351. Stefanović O, 1962, Ispitivanje glucida *Helleborusa* biohemijskom metodom, Acta Pharm Jug, 12, 139-46.
352. Stefanović O, Mladenović M, 1963, Prilog ispitivanju ugljenih hidrata domaćih vrsta *Helleborus-a*, Glasnik hemijskog društva, 28, 163-5.
353. Steinegger E, Hänsel R, 1972, Lehrbuch d. allgemeinen Pharmakognosie, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 192.
354. Steyn PS, Van Heerden FR, 1998, Bufadienolides of plant and animal origin, Nat Prod Reports, 15, 397-413.
355. Stochmal A, Perrone A, Piacente S, Oleszek W, 2010, Saponins in aerial parts of *Helleborus viridis* L., Phytochem Lett, 3, 129-32.

356. Stojanović D, Jezdimirović M, Ratajac R, Stojanov I, 2006, Moguća alternativa upotrebi antibiotika u veterinarskoj medicini, IV Međunarodna Eko-Konferencija Zdravstveno bezbedna hrana (Safe Food), 20-23. septembar 2006, Novi Sad, Temarski zbornik-Proceedings (II), 83-8.
357. Stojkovski V, Tosevski J, Hajrulai Z, Dimovska J, 1999, Effects of a *Helleborus odoratus* extract on some macroelements in swine blood serum, 37th IUPAC Congress, Frontiers in Chemistry: Molecular Basis of the Life Sciences, Berlin, Germany, APP-2-139, 756.
358. Stroman F, Jakovlev V, Metzenauer P, Roth E, Thiemer K, 1984, The pharmacology of a new cardiosteroid, a partially synthetic derivative of the aglycone hellebrigenin (acrihellin), *Arzneimittelforschung*, 34, 7, 769-79.
359. Sultana N, Afolayan AJ, 2011, A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton, *J Asian Nat Prod Res*, 13, 12, 1158-64.
360. Sun L, Chen T, Wang X, Chen Y, Wie X, 2009, Bufatalin Induces Reactive Oxygen Species Dependent Bax Translocation and Apoptosis in ASTC-a-1-cells, *Evidence-Based Complementary Altern Med (eCAM)*, vol 2011.
361. Szegli G, Herold A, Cramer L, Calugaru A, Matache C, Durbaca S, Lupu A, 2005, Immunopharmacology studies on MCS-18, *Invest Med Prod Doissier*, Part 2.2, 1-42.
362. Tabuti JRS, Dhillon SS, Lye KA, 2003, Ethnoveterinary medicines for cattle (*Bos indicus*) in Bulamogi country, Uganda: plant species and mode of use, *J Ethnopharmacol*, 88, 279-86.
363. Tang JI, Seckl JR, Nyirenda MJ, 2011, Prenatal glucocorticoid overexposure causes permanent increases in renal erythropoietin expression and red blood cell mass in the rat offspring, *Endocrinology*, 152, 7, 2716-21.
364. Tappy L, Randin D, Vollenweider P, 1994, Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans, *J Clin Endocrinol Metab*, 79, 1063-9.
365. Tasić S, Šavkin Fodulović K, Menković N, 2004, Vodič kroz svet lekovitog bilja, Valjevo.
366. Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, de Andrade Jr HF, Antoniazzi MM, Jared C, 2008, Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion, *Toxicon*, 52, 13-21.
367. Terness P, Dufter C, Linke F, Kerek F, Jung T, Watzlik A, Opelz G, 1999, HP12: A Highly Purified Helleborus Species Extract Strongly Potentiates the T-Cell Suppressive Effect of Cyclosporine A, *Transplant Proc*, 31, 1174-5.
368. Terness P, Navolan D, Dufter C, Kopp B, Opelz G, 2001-a, The T-cell suppressive effect of bufadienolides: structural requirements for their immunoregulatory activity, *Internat Immunopharmacol*, 1, 119-34.

369. Terness P, Navolan D, Dufter C, Kopp B, Opelz G, 2001-b, Exquisitely small amounts of nonglucocorticoid natural steroids suppress the human allogeneic T-cell response, *Transplant Proc*, 33, 547-8.
370. Thaeter K, 1897, Ueber die Glukoside der Wurzel von *Helleborus niger*: Helleborein und Helleborin, *Arch Pharmaz*, 235, 6-7, 414-24.
371. Tonomura N, Mc Laughlin K, Grimm L, Goldsby RA, Osborne BA, 2003, Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity, *J Immunol*, 170, 2469-78.
372. Tosevski J, Stojkovski V, Ulčar I, 1999, Odreduvanje na temperaturen koeficient na svinjite so upotreba na ekstrakt od bilkata *Helleborus odorus*, *Zbornik na trudovi, XXIV sredba "Fakultet - stopanstvo" '99*, 7, Skopje, 177-89.
373. Tosevski J, Ulčar I, Hajrulai-Musliu Z, Ristoska D, Lončarević A, 2004, Primena mitogenih sastojaka biljnog porekla u veterinarskoj praksi, *Zbornik radova, 6. međunarodno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja*, Budva, 100-6.
374. Trenin DS, Volodin VV, 1999, 20-hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: In vitro evaluation, *Arch Insect Biochem Physiol*, 41, 156-61.
375. Tschesche R, 1972, Biosynthesis of Cardenolides, Bufadienolides and Steroid Sapogenins, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sci*, 180, 187-202.
376. Tschesche R, Welmar K, Wulff G, Snatzke G, 1972, Über Folgeprodukte einer unbekanntem genuinen Vorstufe des Ranunculins in Ranunculaceen, *Chem Ber*, 105, 290-300.
377. Tschesche R, Wirth W, Welmar W, 1981, 5-hydroxylevulinic acid, a new intermediate in the biosynthesis of protoanemonin, *Phytochemistry*, 20, 8, 1835-9.
378. Tschesche R, Wagner R, Chandra Jha C, 1984, A furostanol glycoside from *Helleborus macranthus*, *Phytochemistry*, 23, 3, 695-6.
379. Tsiotra PC, Boutati E, Dimitriadis G, Raptis SA, 2013, High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells, *Biomed Res Int*, 2013, Article ID 487081, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/487081>.
380. Tucakov J, 1996, Lečenje biljem, Rad, Beograd.
381. Turova AD, 1974, Лекарственные растения СССР и их применение, Медицина, Москва.
382. Tutin TG, 1964, Ranunculaceae in *Flora Europaea* (Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, eds), Volume 1,

Lycopodiaceae to Platanaceae, The Syndics of the Cambridge University Press, London, 206-8.

383. Uncini Manganelli RE, Camangi F, Tomei PE, 2001, Curing animals with plants: traditional usage in Tuscany (Italy), *J Ethnopharmacol*, 78, 171-91.
384. Van der Walt JJ, van Rooyen JM, Kellerman TS, Carmeliet EE, Verdonck F, 1997, Neurospecificity of the phyto-bufadienolides is not related to differences in Na⁺/K⁺ pump inhibition, *Eur J Pharmacol*, 329, 201-11.
385. Van Tellingen C, 2007, Pliny's pharmacopoeia of the Roman treatment, *Neth Heart J*, 15, 118-20.
386. Veronesi B, Oortgiesen M, 2006, The TRPV1 receptor: target of toxicants and therapeutics, *Toxicol Sci*, 89, 1-3.
387. Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R, 2003, A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank, *J Ethnopharmacol*, 89, 221-44.
388. Viegi L, Vangelisti R, 2011, Toxic plants used in ethnoveterinary medicine in Italy, *Nat Prod Commun*, 6, 7, 999-1000.
389. Vitalini S, Braca A, Fico G, 2011, Study on secondary metabolite content of *Helleborus niger* L. leaves, *Fitoterapia*, 82, 152-4.
390. Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Ribár B, 1991, A steroidal sapogenin from *Helleborus multifidus* subsp. *serbicus*, *Phytochemistry*, 30, 5, 1724-5.
391. Vochita G, Mihai CT, Gherghel D, Iurea D, Roman G, Radu GL, Rotinberg P, 2011, New potential antitumoral agents of polyphenolic nature obtained from *Helleborus purpurascens* by membranary micro-and ultrafiltration techniques, *SAAIC*, 12, 41-51.
392. Watanabe K, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y, 2003, Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*, *J Nat Prod*, 66, 236-41.
393. Watanabe K, Sakagami H, Mimaki Y, 2005, Four new steroidal saponins from the rhizomes of *Helleborus orientalis*, *Heterocycles*, 65, 4, 775-85.
394. Weidemann H, 2005, Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development - A hypothesis, *Front Biosci*, 10, 2165-76.
395. Werner K, Ebel F, 1994, Zur Lebensgeschichte der Gattung *Helleborus* L. (*Ranunculaceae*), *Flora*, 189, 97-130.
396. Wissner W, Kating H, 1971, Untersuchungen über die Hellebrinführung der unterirdischen organe von *Helleborus*-arten, *Planta Med*, 20, 4, 344-9.
397. Wissner W, 1973, 14-Hydroxy-3-oxo-1,4,20,22-bufatetraenolid, eine neue verbindung aus den unterirdischen organen von *Helleborus*-arten, *Planta Med*, 24, 3, 201-10.
398. Wissner W, Kating H, 1974-a, Botanische und phytochemische untersuchungen an den Europäischen und Kleinasiatischen arten der gattung *Helleborus*, I.

Zur Verbreitung, Morphologie, Anatomie und Kultur der Helleborus-Arten, *Planta Med*, 26, 128-43.

399. Wissner W, Kating H, 1974-b, Botanische und phytochemische untersuchungen an den Europäischen und Kleinasiatichen arten der gattung *Helleborus*, II. Vergleichende phytochemische Untersuchungen der Herzglykosid- und Saponin- Führung, *Planta Med*, 26, 228-49.
400. Wissner W, Kating H, 1974-c, Botanische und phytochemische untersuchungen an den Europäischen und Kleinasiatichen arten der gattung *Helleborus*, III. Die quantitative Hellebrinführung in Pflanzen am natürlichen Wuchsort und in der Kultur, *Planta Med*, 26, 364-74.
401. World Health Organization, 1991, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, Geneva: WHO, in *HerbalGram*, 1993, 28, 17-20.
402. World Health Organization, 2002, Tradicional medicine strategy 2002-2005, Geneve.
403. www.bastabalkana.com/2010/05/kukurek-biljka-antickog-pedigrea, Đorđević-Milutinović D, Kukurek – biljka antičkog pedigrea
404. www.scbaghdad.com/e-library/biobooks/PDR_for_Herbal_medicines.2nd.ed-1563633612.pdf, PDR for Herbal Medicines, 2000, published by Medicinal Economics Company, Inc. at Montvale, NJ 07645-1742
405. Xie CM, Chan WY, Yu S, Zhao J, Cheng CH, 2011, Bufatalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation, *Free Radic Biol Med*, 51, 7, 1365-75.
406. Yang J, Zhang Y, Miao F, Zhou L, Sun W, 2010, Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch, *Fitoterapia*, 81, 636-9.
407. Ye M, Ning LL, Zhan JX, Guo HZ, Guo DA, 2003, Biotransformation of cinobufagin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *Platycodon grandiflorum*, *J Mol Catal B: Enzym*, 22, 1-2, 89-95.
408. Ye M, Qu G, Guo H, Guo D, 2004, Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 91, 87-98.
409. Ye M, Guo DA, 2008, A new bufadienolide obtained from the biotransformation of cinobufagin by *Alternaria alternata*, *Nat Prod Res*, 22, 1, 26-30.
410. Yeşilada E, Üstün O, Sezik E, Takaischi Y, Ono Y, Honda G, 1997, Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor α , *J Ethnopharmacol*, 58, 59-73.
411. Yeşilada E, 2002, Biodiversity in Turkish Folk Medicine, In: Sener, B (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, 119-35.

412. Yu CH, Kan SF, Pu HF, Chien EJ, Wang PS, 2008, Apoptotic signaling in bufatalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells, *Cancer Sci*, 99, 12, 2467-76.
413. Zhang L, Shen KL, Zhou T, Xue YQ, Yang P, 2004, Effects of hydrocortisone on oxygen free radicals released by polymorphonuclear neutrophils in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice, *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 42, 9, 659-62.
414. Zhang J, Sun Y, Liu JH, Yu BY, Xu Q, 2007, Microbial transformation of three bufadienolides by *Nocardia* sp. and some insight for the cytotoxic structure-activity relationship (SAR), *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 22, 6062-5.
415. Zhang X, Ye M, Dong Y, Hu H, Tao S, Yin J, Guo D, 2011, Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucreata*, *Phytochemistry*, 72, 14-15, 1779-85.
416. Zhao J, Guan SH, Chen XB, Wang W, Ye M, Guo DA, 2007, Two new compounds derived from bufalin, *Chin Chem Lett*, 18, 1316-8.
417. Zimmermann-Meinzingen O, Čičovački D, 1938, Über Helborsid und seine Beziehungen zur Strophanthintherapie, *Münch Med Wochenschr*, 1, 505.
418. Zingg W, Morgan CD, Anderson DE, 1971, Blood viscosity, erythrocyte sedimentation rate, packed cell volume, osmolality, and plasma viscosity of the Wistar rat, *Lab Anim Sci*, 21, 740-2.
419. Zonneveld BJM, 2001, Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (*Ranunculaceae*) discriminate between species and sectional divisions, *Plant Syst Evol*, 229, 125-30.
420. Zoz IG, 1956, Морозники-источник новых лекарственных сердечных средств, *Ботанический журнал*, 41, 9, 1318-24.
421. Đorđević N, Grubić G, Vitorović D, Joksimović-Todorović M, Jokić Ž, Stojanović B, Davidović V, 2006, Contemporary achievements in preparing feeds and domestic animal nutrition, *Biotechnol Anim Husbandry*, Special issue, 22, 85-102.
422. Đurić V, 1985, Dodatak Čajkanovićevom »Rečniku« u Čajkanović V: Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama, Srpska književna zadruga, SANU, Beograd.
423. Živanov-Stakić D, Mladenović M, 1970-a, Novi postupak dobijanja triterpenskih saponozida biljke *Helleborus odoratus*, *Acta Pharm Jug*, 20, 183-6.
424. Živanov-Stakić D, Mladenović M, 1970-b, Novi reagens za identifikaciju nekih steroida i šećera na tankoslojnom hromatogramu, *Arh farm*, 4, 251-3.
425. Živanov-Stakić D, Mladenović M, 1971-a, Identifikacija nekih ugljenih hidrata i steroida biljke *Helleborus odoratus* hromatografijom na tankom sloju, *Arh farm*, 4, 187-91.
426. Živanov-Stakić D, Mladenović M, 1971-b, Masne materije biljke *Helleborus odoratus*, *Arh farm*, 5, 283-9.

427. Čajkanović V, 1985, Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama, Srpska književna zadruga, SANU, Beograd.
428. Čakar J, Parić A, Vidić D, Haverić A, Haverić A, Maksimović M, Bajrović K, 2011, Antioxidant and antiproliferative activities of *Helleborus odoratus* Waldst. & Kit., *H. multifidus* Vis. and *H. hercegovinus* Martinis, Nat Prod Res, 25, 20, 1969-74.
429. Čučković D, 1939, Prilog farmakognoškom istraživanju crnocrvenog kukurijeka (*Helleborus atrirubens* Waldst. et Kit.), Doktorska disertacija, Zagreb.
430. Čupić V, Dobrić S, Trailović D, Pejčić Z, 2004, Savremeni pravci razvoja i upotrebe antimikrobnih lekova u veterinarskoj medicini, Vet glasnik, 58, 5-6, 577-94.
431. Ševaljević L, Mačvanin M, Žakula Z, Kanazir DT, Ribarac-Septić N, 1998, Adrenalectomy and dexamethasone treatment alter the patterns of basal and acute phase response-induced expression of acute phase protein genes in rat liver, J Steroid Biochem Mol Biol, 66, 5-6, 347-53.
432. Šikl VD, Bauer Š, Masler L, 1961, Glykoside aus Purpurnieswurz (*Helleborus purpurascens* W. und K.), Planta Med, 9, 1, 64-9.
433. Šilić Č, 1988, Šumske zeljaste biljke, »Svjetlost« OOUR Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

9. PRILOZI

Prilog 1. Sekcije sa vrstama roda *Helleborus* L., njihova distribucija i boja cveta

Vrste, podvrste (ssp.) (Werner i Ebel, 1994)	Vrste (Meiners i sar., 2011)	Distribucija (Tutin, 1964; Meiners i sar., 2011; Werner i Ebel, 1994)	Boja cveta (Meiners i sar., 2011)
Section <i>Griphopus</i> Spach em. Schiffner <i>H. foetidus</i> L.	Section <i>Griphopus</i> <i>H. foetidus</i>	Zapadna, centralna i južna Evropa	Zelena, visuljci
Section <i>Chenopus</i> Schiffner <i>H. lividus</i> Aiton	Section <i>Chenopus</i> <i>H. lividus</i>	Majorka, Balearska ostrva	Krem, zeleno rozikasta
<i>H. argutifolius</i> Viv. [<i>H. lividus</i> Aiton ssp. <i>corsicus</i> (Briq.) P. Fourn.]	<i>H. argutifolius</i>	Korzika, Sardinija	Zelena
Section <i>Helleborus</i> [sect. <i>Chionorhodon</i> Spach] <i>H. niger</i> L.	Section <i>Helleborus</i> <i>H. niger</i>	Jugoistočni Alpi do severozapadne Italije	Bela do ljubičasta
Section <i>Syncarpus</i> Schiffner <i>H. vesicarius</i> Aucher	Section <i>Syncarpus</i> <i>H. vesicarius</i>	Južna Turska, Sirija	Zelena sa crveno / braon širom ogrlicom
Section <i>Dicarpon</i> Ulbrich <i>H. thibetanus</i> Franch.	Section <i>Dicarpon</i> <i>H. thibetanus</i>	Zapadna Kina	Belo-roze, žilica
Section <i>Helleborastum</i> Spach <i>H. orientalis</i> Lam. ssp. <i>orientalis</i> ssp. <i>abchasicus</i> (A. Braun) Mathew ssp. <i>guttatus</i> (A. Braun et Sauer) Mathew <i>H. cyclophyllus</i> (A. Braun) Boiss. <i>H. odor</i> Waldst. et Kit.	Section <i>Helleborastum</i> <i>H. orientalis</i>	Severna Turska, Kavkaz, Ukrajina	Bela-krem-pink, šaren ili ne
<i>H. viridis</i> L. <i>H. dumetorum</i> Waldst. et Kit. ex Willd.	<i>H. cyclophyllus</i> <i>H. odor</i>	Alb., Grčka, Bugarska, Italija, Srbija, BiH, Albanija, Rumunija, Mađarska	Zelena do žuto-zelena Zelena do žuto-zelena
<i>H. atrorubens</i> Waldst. et Kit.	<i>H. viridis</i> <i>H. dumetorum</i>	Cent. i zap. Evropa Austrija, Mađarska, Rumunija, Hrvatska Slovenija, severna Hrvatska	Zelena Zelena Zelena do tamno ljubičasta Zelena
<i>H. multifidus</i> Vis. ssp. <i>multifidus</i> ssp. <i>istriacus</i> (Schiffner) Merxm. et Podl.	<i>H. atrorubens</i>	Hrvatska, BiH, Albanija	Zelena do žuto-zelena Zelena do belo-zelena Zelena do ljubičasta
ssp. <i>hercegovinus</i> (Martinis) Mathew	<i>H. multifidus</i>	Severozapadna Hrvatska, sever. Italija BiH, Crna Gora	Zelena
ssp. <i>bocconeii</i> (Ten.) Mathew	<i>H. istriacus</i> <i>H. hercegovinus</i>	Sicilija, Kalabrija	Zelena do žuto-zelena Zelena do belo-zelena Zelena do ljubičasta
<i>H. torquatus</i> Archer-Hind [<i>H. serbisus</i> Adamović]	<i>H. bocconeii</i> <i>H. torquatus</i>	Hrvatska, Srbija, BiH, Crna Gora	Zelena do ljubičasta
<i>H. purpurascens</i> Waldst. et Kit.	<i>H. purpurascens</i>	Rumunija, Češka, Mađarska, Poljska, Ukrajina	Ljubičasto-braon-zelena
	<i>H. occidentalis</i> <i>H. abruzzicus</i>	Zapadna Evropa Abruzija (Italija)	Zelena Žuto-zelena do svetlo žuta
	<i>H. croaticus</i> <i>H. liguricus</i>	Severna Hrvatska Ligurijska, Toskana	Zelena-ljub. Bela

Prilog 2. Vrste i podvrste roda *Helleborus* L. i nazivi biljaka ovog roda u narodu

Vrste, podvrste (ssp.) (Tutin, 1964)	Nazivi biljaka roda <i>Helleborus</i> L. u narodu (Simonović, 1959)
<i>H. foetidus</i> L.	Kukurek, kukurijek, kukurik, kukurjak, srdljivi sprež, čemerika, e. Setterwort, Stinking Hellebore, n. Stinkende Nieswurz, f. Favalau, Herbe printanière, Museivroz, Pan au lau, Patte d' Ours, Oied de Griffon
<i>H. lividus</i> Aiton ssp. <i>lividus</i> ssp. <i>corsicus</i> (Willd.) Tutin	Kukurek
<i>H. niger</i> L. ssp. <i>niger</i> ssp. <i>macranthus</i> (Freyn) Schiffner	Kukurek, alon, božićnjak, glavobolka, devetik, zavlačni koren, zdravac, zdravinjak, kukurijek, kukuvijek, kukurijek, kukurik, kukurjak, kurica, kurice, kurja slep, kurjica, kurjice, kurjovec, kurjovc, papigača, petkož, pitkošek, popigača, popova gača, purić, sprež, sprež, sprž, talov, talovna trava, talovo, talog, talun, telovnek, teloh, tolač, trpoglavka, crna čemerika, crni kukurek, crni kukurijek, crni sprež, crnoglavac, čemerika, čemerica, čemeričica, črni teloh, črnoglavac, r. moroznik, čemerica, e. Christmas-rose, Christ's hellebore, n. Schneerose, f. Hellebore noir, Herbe de feu, Rose de Noël
<i>H. orientalis</i> Lam. <i>H. cyclophyllus</i> Boiss.	Kukurek Kukurek
<i>H. odorus</i> Waldst. et Kit. ssp. <i>odorus</i> ssp. <i>laxus</i> (Host) Merxm. et Podl.	Kukurek, kukurijek mirisavi, kukuriječak, sprež
<i>H. viridis</i> L. ssp. <i>viridis</i> ssp. <i>occidentalis</i> (Reuter) Schiffner	Kukurek, bili sprež, zdravac, zeleni kukurijek, kukurek, kukurijek, kukuriječak, kukurjak, mali sprež, mlajevina, pastorka, patorka, prtlovo perje, petrak, sprež, sprežac, sprež, sprž, kurji slep, kurjica, e. Bear's foot, n. Grüne Nieswurz, F. Herbe à la bosse, Herbe à sétons, Pommelière
<i>H. dumetorum</i> Waldst. et Kit. in Willd. ssp. <i>dumetorum</i> ssp. <i>atrорubens</i> (Waldst. et Kit.) Merxm. et Podl.	Kukurek
<i>H. multifidus</i> Vis. ssp. <i>multifidus</i> ssp. <i>serbicus</i> (Adamović) Merxm. et Podl. ssp. <i>istriacus</i> (Schiffner) Merxm. et Podl.	Kukurek, kukurijek rascepkani, patorka, sprež Srpski kukurek
<i>H. bocconei</i> Ten. ssp. <i>bocconei</i> ssp. <i>siculus</i> (Schiffner) Merxm. et Podl.	Kukurek
<i>H. purpurascens</i> Waldst. et Kit.	Kukurek *Nazivi za rod u celini: -zavlačni koren, zdravac, jesenak, kokošji slijep, kukurek, kukurijek, kukurik, kukurjak, kuri cvit, kurje oko, kurji slep, kurjica, kurosljep, lučenika, lučec, petrak, podrijemuh, podrimuh, prlj, prlje, prpriš, purić, sesamojda, slepica, smrtnica, sprež, sprež, sprž, talovje, talovnica, talog, telovnik, telog, teloh, čemerika, r. zimovnik, moroznik, e. Hellebore, Bear's foot, n. Nieswurz, Christblume, F. Hellébore, Ellébore

Prilog 3. Morfologija vrsta, podvrsta roda i hibrida *Helleborus* L. (www.wikipedia.org; www.joyofgardens.com; www.gardenphotos.com; www.evolution-plants.com)



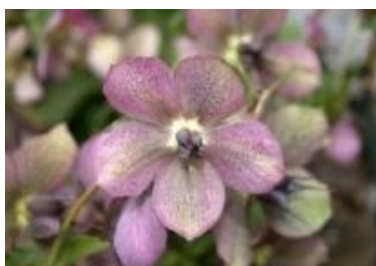
H. foetidus L.



H. lividus Aiton



H. argutifolius Viv.



H. niger ssp. *niger*



H. niger
ssp. *macranthus* (Freyn) Sch.



H. vesicarius Aucher



H. thibetanus Franch.



H. orientalis ssp. *orientalis*



H. orientalis
ssp. *abchasicus* Mathew



H. orientalis ssp. *guttatus*



H. cyclophyllus Boiss.



H. odoratus Waldst. et Kit.

Prilog 3. (Nastavak)



H. odorus Waldst. et Kit.



H. odorus Waldst. et Kit.
(prizemni list)



H. odorus Waldst. et Kit.
(prizemni list sa delom rizoma)



H. viridis L. ssp. *viridis*



H. viridis L.
ssp. *occidentalis* (Reuter) Sch.



H. dumetorum Waldst. et Kit.



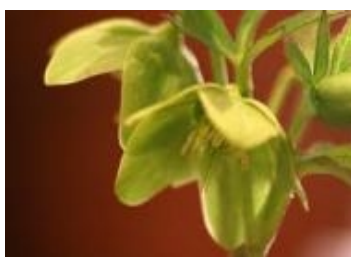
H. atrorubens Waldst. et Kit.



H. multifidus ssp. *multifidus*



H. multifidus
ssp. *serbicus* Adamović



H. multifidus
ssp. *istriacus* Merxm. et Podl.



H. multifidus
ssp. *hercegovinus* Mathew



H. multifidus
ssp. *bocconeii* Mathew

Prilog 3. (Nastavak)



H. torquatus Archer-Hind



H. purpurascens Waldst. et Kit.



H. croaticus



H. abruzzicus



H. liguricus



H. caucasicus A. Br.



Hibrid *H. ericsmithii*
(*H. niger* × *H. sternii*)



Hibrid *H. nigercos*
(*H. niger* × *H. argutifolius*)



Hibrid *H. sternii*
(*H. argutifolius* × *H. lividus*)



Hibrid *H. ballardiae*
(*H. niger* × *H. lividus*)

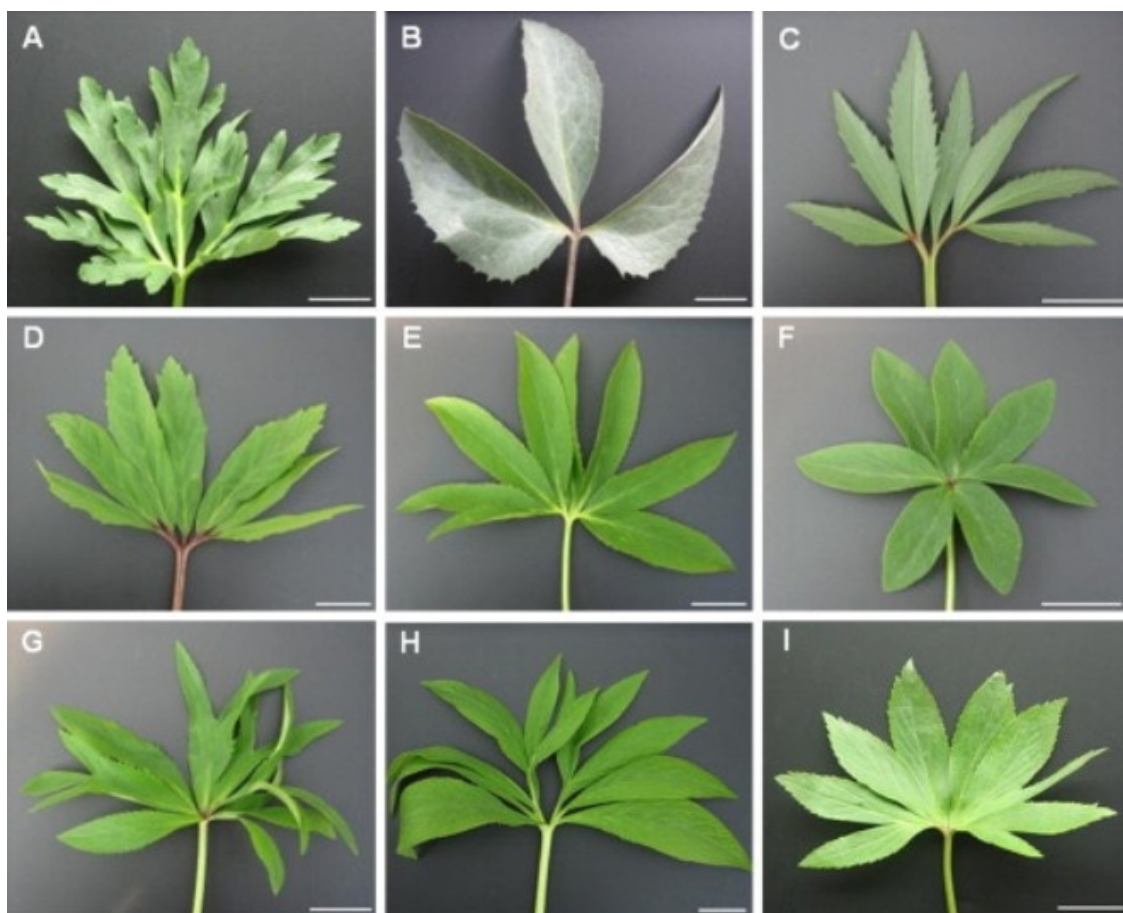


Hibrid *H. ballardiae*
(*H. niger* × *H. lividus*)

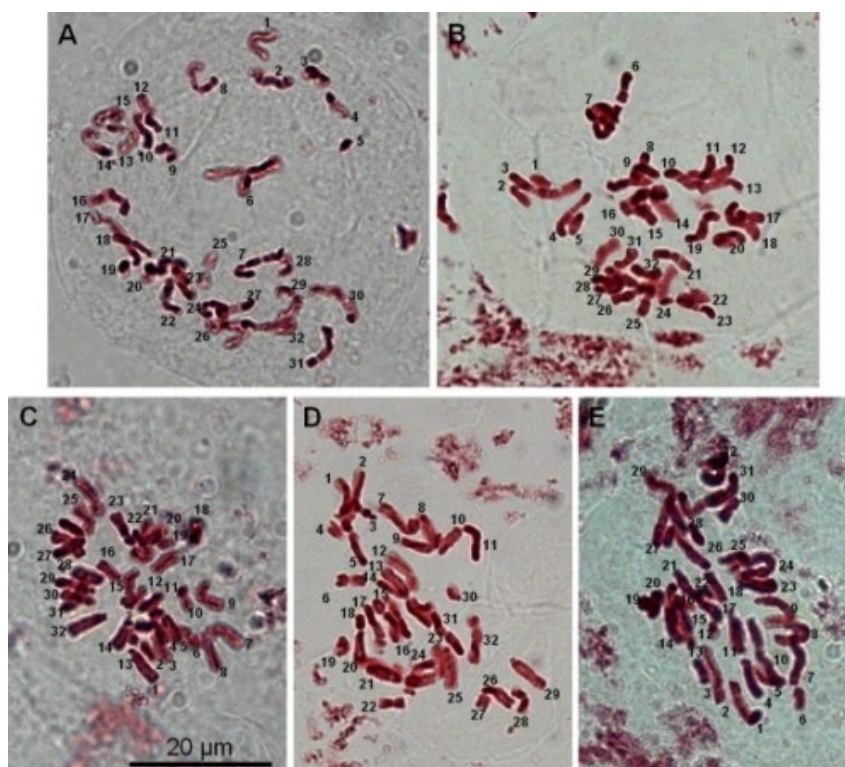


Hibrid *H. sternii*
(*H. argutifolius* × *H. lividus*)

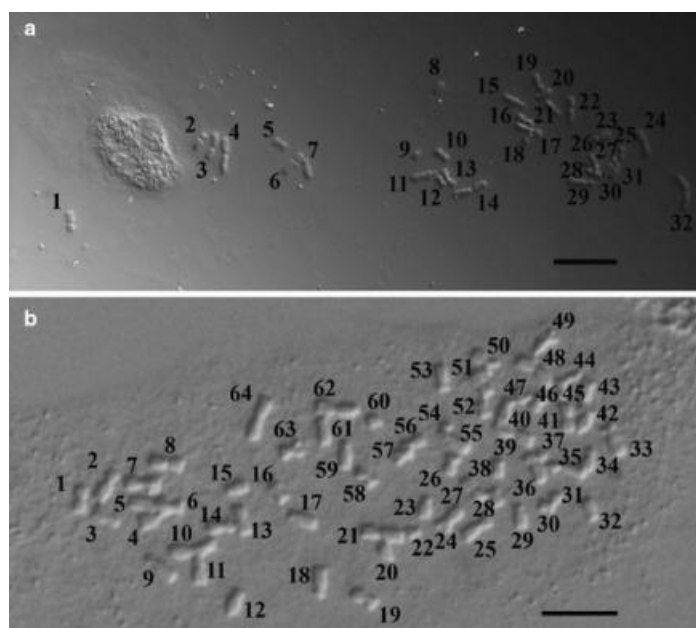
Prilog 4. Morfologija listova različitih *Helleborus* sp.: A: *H. vesicarius* Aucher; B: *H. lividus* Aiton; C: *H. foetidus* L.; D: *H. niger* L.; E: *H. × hybridus*; F: *H. cyclophyllus* Boiss.; G: *H. dumetorum* Waldst. et Kit; H: *H. torquatus* Archer-Hind; I: *H. thibetanus* Franch.; crtica predstavlja 3 cm (Meiners i sar., 2011)



Prilog 5. Diploidni broj hromozoma ($2n=2x=32$) u korenu različitih *Helleborus* sp. bojenih sa aceto-orceinom: A: *H. argutifolius* Viv.; B: *H. foetidus* L.; C: *H. niger* L.; D: *H. odorus* Waldst. et Kit.; E: *thibetanus* Franch. (Meiners i sar., 2011)



Prilog 6. Broj hromozoma u korenu hibrida *H. niger*cos (*H. niger* × *H. argutifolius*): a. diploidna biljka ($2n=2x=32$), b. trifluralin indukovani tetraploid ($2n=4x=64$); crtica predstavlja 50 µm (Dhooghe i sar., 2009)



Prilog 7. Kukurek u legendama, mitovima, magijskim obredima i bajalicama

Kukurek u antičkim i biblijskim legendama i mitovima

Lekovito i toksično delovanje kukureka su poznati još od antičkih vremena, a sudeći po starim zapisima i legendama, lečio je junake, trovao careve i dobijao ratove. Zbog svojih otrovno-lekovitih svojstava je bio veoma značajna biljka tog doba. Stari Grci su ga koristili za lečenje mahnitosti i ludila, kao i za efikasno i brzo trovanje neprijatelja (www.bastabalkana.com/2010/05/kukurek-biljka-antickog-pedigrea).

Po jednoj legendi, Melampod iz Pila, koji je znao nemušti jezik, izlečio je kćerke kralja Preta od ludila koje ih je obuzelo lekom pripremljenim od kukureka, a u zamenu je dobio trećinu kraljevine Argolide. Antički heroj Herakle je takođe izlečen od ludila lekom koji je iscelitelj Antikiros napravio od otrovnog crnog kukureka, a naselje u čijoj je okolini rastao kukurek nazvano je Antikira i Helleborus.

Kukurek lako može dovesti i do smrtnog ishoda. Neki istoričari smatraju da je Aleksandar Makedonski umro od prevelike doze kukureka koji je dugo vremena uzimao kao lek. Prema legendi, Fokidani iz grada Kira su godinama presretali i pljačkali hodočasnike koji su išli u Delfe. Delfi su se pobunili i započeo je Prvi Sveti Rat, koji je trajao 10 godina (585-595 p.n.e.). Vojnici iz Kire su pobeđeni tako što im je voda zatrovana kukurekom donetim iz Antikire. Nakon trovanja kukurekom, imali su stomačne tegobe i srčane aritmije, tako da nisu bili sposobni da se dalje bore.

Po biblijskoj legendi, crni kukurek zvani Božićna ruža je anđeoskog porekla, a nastao je pre nešto više od 2000 godina. Tri mudraca su nosila začine, zlato i mirtu na poklon tek rođenom Isusu u Vitlejem, a pratili su ih pastiri koji su nosili med i voće. Prelazili su preko polja prekrivenog snegom, kada ih je ugledala mala pastirica Madelon i veoma se rastužila jer nije imala da na poklon ponudi ni običan cvet. Jedna suza se otkotrljala niz njen obraz i pala u sneg. Tada je anđeo krilima dodirnuo zemlju i na tom mestu su iznikli krupni beli cvetovi Božićne ruže.

Magijska svojstva kukureka

U narodu postoji verovanje da biljke imaju određeno delovanje samo ako se sakupljaju i upotrebljavaju u određenom vremenskom periodu i uz strogo utvrđen, obično veoma složen ritual (Kovačević i Jančić, 2003). Čajkanović (1985) u Rečniku srpskih narodnih verovanja o biljkama navodi, da se kukurek zajedno sa ostalim lekovitim biljkama, tradicionalno bere na

Biljani petak (petak pred Đurđevdan) i na Cveti (nedelja pre Uskrsa). Veruje se da kukurek donosi nesreću ukućanima i da kokoške neće nositi jaja celog leta, ako se unese u kuću pre Đurđevdana. Na Đurđevdan se kukurek stavlja u gnezda da bi kokoške nosile jaja, posipa oko tora i karlica u koje se razliva toplo mleko da se ne bi kvarilo i unosi u kuću, kako bi se životinje i ljudi zaštitili od vradžbina (Đurić, 1985). Dodole su stavljale korenove kukureka u kotao sa vodom i njima prskale decu za vreme praznika.

Prema predanju italijanskog naroda, biljna vrsta *H. bocconeii* Ten subsp. *siculus* mora biti sakupljena 24. juna na dan Svetog Jovana, da bi imala lekovito delovanje (Lentini, 2000). Stanovnici Kalabrije i Sicilije sakupljaju ovu biljku samo petkom, jer smatraju da se tako povećavaju njene terapijske mogućnosti (Passalacqua i sar., 2006).

U knjizi Život Srba seljaka (Milićević, 1894) zabeleženo je da u nekim krajevima, početkom proleća, deca pevaju bajalicu prvim cvetovima kukureka, koje nađu u šumi: "Kukurek s brda zove: Oženite me! Lepa ruža ruku pruža: Povedite me!"

Prilog 8. Hemijski sastav biljaka roda *Helleborus* L. – bufadienolidni heterozidi iz podzemnih organa

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Bufadienolidni heterozidi (glukozidi, glikozidi)	Heleborein	Heleboretin-gluko-glukozid Heleboretin-gluko-arabinozid	Husemann i Marmé (1865), Thaeter (1897), Sieburg (1913), Kofler i Steidl (1934), Čučković (1939)
	Helebrin	Helebrigenin-gluko-ramnozid	Karrer (1943), Schmutz (1949), Chen i sar. (1950), Baytop i Malkoc (1965), Petričić i sar. (1967, 1968, 1971-a, 1974, 1977), Živanov-Stakić i Mladenović (1971-a), Tschesche (1972), Wissner i Kating (1971, 1974-b,c), Dilparić-Knežević (1977), Coassini Lokar i sar. (1982), Colombo i sar. (1990), Muhr i sar. (1995), Maksimović (1998)
	* Desglukohelebrin	Helebrigenin Helebrigenin-ramnozid	Bassarello i sar. (2008), Yang i sar. (2010) Wissner i Kating (1971, 1974-b), Colombo i sar. (1990), Maksimović (1998), Bassarello i sar. (2008)
	*	Bufa-20,22-dienolide-3,5,14-trihidroksi-19-okso-(3 β ,5 β)-helebrigenin	Colombo i sar. (1990)
	Korelborin K	Helebrigenin -ramnozid	Kolesnikov i Tropp (1952), Šikl i sar. (1961), Resnitschenko i sar. (1961)
	Korelborin P	Helebrigenin-gluko-ramnozid	Resnitschenko i sar. (1961), Šikl i sar. (1961)
	Heleborogenon	14-hidroksi-3-keto-bufa-1,4,20,22-tetraenolid	Petričić i sar. (1972), Dilparić-Knežević (1977)
	Heleborogenon	14-hidroksi-3-okso-1,4,20,22-bufatetranolid	Wissner (1973), Colombo i sar. (1990)
	Glukohelebrin	Helebrigenin-2 glukoze-ramnozid	Wissner i Kating (1974-b,c)
	5 α bufalon	14-hidroksi-3-okso-5 α ,14 β -bufa-20,22-dienolid	Hauser i sar. (1972)
	*	5 β ,14 β -dihidroksi-19-okso-3 β -[(α -L-ramnopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid	Watanabe i sar. (2003) Yang i sar. (2010)
	*	5 β ,14 β -dihidroksi-19-okso-3 β -[(β -D-glukopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid	Watanabe i sar. (2003)
	Ramnozid	5 β ,14 β ,16 β -trihidroksi-19-okso-3 β -[(α -L-ramnopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid	Watanabe i sar. (2003)
	Tigenkaozid A	14 β ,16 β -dihidroksi-3 β -[(β -D-glukopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid	Yang i sar. (2010)
Tigenkaozid B	14 β ,16 β -dihidroksi-3 β -[(β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glukopiranozil)oksi]bufa-20,22-dienolid	Yang i sar. (2010)	

Prilog 9. Hemijski sastav biljaka roda *Helleborus* L. – bufadienolidni, flavonoidni i fenolni heterozidi iz nadzemnih organa

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Bufadienolidni, flavonoidni i fenolni heterozidi (glukozidi, glikozidi)	Ranunkulin	β -D-glukopiranozid	Hill i van Heyningen (1951), Tschesche i sar. (1981), Bonora i sar. (1985)
	Izoranunkulin	4-(β -D-glukopiranoziloksi)-2-penten-5-olid	Hill i van Heyningen (1951), Tschesche i sar. (1981)
	Ranunkozid	*	Tschesche i sar. (1972, 1981), Martinek (1973, 1974-a,b)
	Ranunkulozid	*	Tschesche i sar. (1972, 1981)
	*	5-hidroksilevulinska kiselina	Martinek (1974-b) Tschesche i sar. (1981)
	Helebrin Desglukohelebrin *	Helebrigenin-gluko-ramnozid Helebrigenin-ramnozid 11 α -hidroksi-desglukohelebrin	Kiřmer i Wichtl (1986) Kiřmer i Wichtl (1986) Kiřmer i Wichtl (1986)
	Helebortin A	(5-[β -D-glukopiranoziloksi]-10,14,16-trihidroksi-19-nor-{5 β ,10 β ,14 β ,16 β }-bufa-3,20,22-trienolid)	Meng i sar. (2001)
	Helebortin B	5-[β -D-glukopiranoziloksi]-3,4-epoksi-14-hidroksi-19-okso-bufa-20,22-dienolid	Meng i sar. (2001)
	Helebortin C	5-[β -D-glukopiranoziloksi]-3,4-epoksi-10,14-dihidroksi-19-nor-bufa-20,22-dienolid	Meng i sar. (2001)
	Protoanemonin	5-metilen-2-oksodihidrofuran	Hill i van Heyningen (1951), Tschesche i sar. (1981), Bonora i sar. (1985, 1987)
	Anemonin	*	Prieto i sar. (2006)
	Flavonoidni (kvercetin) glikozidi	3-(kafeoilsoforozid)-7-glukozid 3-(ksilozilglukozid)-7-glukozid	Harborne (1965)
	Flavonoidni (kemferol) glukozidi	3-sambubiozid-7-glukozid 3-sambubiozid 3-glukozid-7-glukozid kemferol-3-soforozid	Harborne (1967)
	Flavonoidi, fenolne kiseline (parakumarinska, vanilinska, kafena, hlorogenska)	*	Philianos i sar. (1983)
Flavonoidi (derivati kemferola i kvercetina), fenolne kiseline (ferulinska, kafena, hlorogenska)	*	Maleř i Medić-Šarić (2001)	

Prilog 9. (Nastavak)

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Bufadienolidni, flavonoidni i fenolni heterozidi (glukozidi, glikozidi)	Flavonoidni (kvercetin) glikozidi *	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2- <i>E</i> -kafeoil)- α -L-arbinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozid-7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Braca i sar. (2004)
	*	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2- <i>E</i> -kafeoil)- α -L-arbinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozid	
	*	Kvercetin 3- <i>O</i> - α -L-arbinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozid	
	Flavonoidni (kvercetin) glikozid	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2- <i>trans</i> -kafeoil)- α -L-arbinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid	Prieto i sar. (2006)
	Fenolni glikozidi	β -D-glukozil- <i>p</i> -hidroksifeniletil alkohol 1- β - <i>O</i> -kafeoil-D-glukoza	Prieto i sar. (2006)
	Fenolni glikozid	Fenilaktik acid 2- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Vitalini i sar. (2011)
	Flavonoidni glikozidi *	Kvercetin 3- <i>O</i> -2-(<i>E</i> -kafeoil)- α -L-arabinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid-7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid;	Vitalini i sar. (2011)
	*	Kemferol 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozid-7- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	
	Flavonoidni, fenolni i proanticijanogeni glikozidi	*	Čakar i sar. (2011)
*	Helebrigenin 3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)	

Prilog 10. Hemijski sastav biljaka roda *Helleborus* L. - spirostanol saponozidi

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Spirostanol saponozidi	Heleborin	Heleborezin-glukoza	Husemann i Marmé(1865), Keller i Schöbel (1928), Čučković (1939), Berger (1960), Steinegger i Hänsel (1972)
	*	Makrantogenin (25/27-dehidro-sarsapogenin odn. 25/27-dehidro-5 β -spirostan-3- β -ol)	Petričić i sar. (1969)
	*	Atrorubogenin	Petričić i sar. (1970), Petričić (1974)
	*	*	Živanov-Stakić i Mladenović (1970-a,b), Petričić i sar. (1971-b)
	*	*	Maksimović (1998)
	*	Spirost-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α - triol	Linde i sar. (1971), Wissner i Kating (1971-b), Colombo i sar. (1990), Bassarello i sar. (2008)
	Polimorf A	Sprosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α - triol monohidrat	Kálmán i sar. (1985)
	Polimorf B	1 β ,3 β ,11 α -trihidroksi-spirosta-5,25(27)-dien monohidrat	Argay i sar. (1998)
	*	Spirosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -diol	Ribár i sar. (1986)
	*	3 β ,11 α -dihidroksispirosta-5,25(27)-dien	Vladimirov i sar. (1991)
	*	(23 <i>S</i>)-3 β ,23-dihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1 β -il <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopiranosid	Watanabe i sar. (2003)
	*	(23 <i>S</i> ,24 <i>S</i>)-3 β ,23,24-trihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1 β -il <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopiranosid	Watanabe i sar. (2003)
	*	(23 <i>S</i> ,24 <i>S</i>)-21-acetoksi-3 β ,23,24-trihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1 β -il <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopiranosid	Watanabe i sar. (2003)
	*	(23 <i>S</i> ,24 <i>S</i>)-21-acetoksi-24-[(<i>O</i> - β -D-glukopiranozil)oksi]-3 β ,23-dihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1 β -il <i>O</i> - β -D-apifuranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopiranosid	Watanabe i sar. (2003)
	*	(23 <i>S</i> ,24 <i>S</i>)-21-acetoksi-3 β ,23-dihidroksi24-[(<i>O</i> - β -D-kuinovopiranozil)-oksi]spirosta-5,25(27)-dien-1 β -il <i>O</i> - β -D-apifuranosil-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetil- α -L-ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopiranosid	Watanabe i sar. (2003), Bassarello i sar. (2008)

Prilog 10. (Nastavak)

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
<p align="center">Spirostanol saponozidi</p>	<p>Helebosaponin A</p>	<p>(1β,3β,23<i>S</i>,24<i>S</i>)-21-(acetiloksi)-24-[(β-D-fukopiranozil)oksi]-3,23-dihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1-il <i>O</i>-β-D-apiofuranozil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-(4-<i>O</i>-acetil-α-L-ramnopiranozil)-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-[β-D-ksilopiranozil-(1\rightarrow3)]-α-L-arabinopiranozid</p>	<p>Mimaki i sar. (2003), Bassarello i sar. (2008)</p>
	<p>Helebosaponin B</p>	<p>(1β,3β,23<i>S</i>,24<i>S</i>)-21-(acetiloksi)-24-[[<i>O</i>-β-D-glukopiranozil-(1\rightarrow4)-β-D-fukopiranozil]oksi]-3,23-dihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1-il <i>O</i>-β-D-apiofuranozil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-(4-<i>O</i>-acetyl-α-L-ramnopiranozil)-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-[β-D-ksilopiranozil-(1\rightarrow3)]-α-L-arabinopiranozid</p>	<p>Mimaki i sar. (2003), Bassarello i sar. (2008)</p>
	<p>Helebosaponin C</p>	<p>(1β,3β,23<i>S</i>,24<i>S</i>)-24-[(β-D-fukopiranozil)oksi]-21-[[<i>O</i>-β-D-glukopiranozil-(1\rightarrow2)-β-D-galaktopiranozil]oksi]-3,23-dihidroksispirosta-5,25(27)-dien-1-il <i>O</i>-β-D-apiofuranozil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-(4-<i>O</i>-acetil-α-L-ramnopiranozil)-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-[β-D-ksilopiranozil-(1\rightarrow3)]-α-L-arabinopiranozid</p>	<p>Mimaki i sar. (2003)</p>

Prilog 11. Hemijski sastav biljaka roda *Helleborus* L.- furostanol saponozidi, ekdisteroidi, alkaloidi

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Furostanol saponozidi	Makrantozid I	25/27-dehidro-5 β -furostan-3 β ,22,26-trio-3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid, 26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Tschesche i sar. (1984), Liedtke i sar. (1997)
	*	*	Živanov-Stakić i Mladenović (1970-a,b)
	Furostanol saponozidi Furospirostanol saponozidi	* *	Watanabe i sar. (2005) Watanabe i sar. (2005), Rosselli i sar. (2009)
	Heleborozid A	26-[(β -D-glukopiranozil)oksi]-22 α -hidroksifurosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -triol	Akin i Anil (2007), Rosselli i sar. (2009), Bassarello i sar. (2008), Muzashvili i sar. (2011)
	Heleborozid B	26-[(β -D-glukopiranozil)oksi]-22 α -metoksifurosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α -triol	Akin i Anil (2007), Rosselli i sar. (2009), Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid A	Furosta-5,20(22),25(27)-trien-1 β ,3 β ,11 α ,26-tetrol 26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Bassarello i sar. (2008), Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid B	26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozilfurosta-5,20(22),25(27)-trien-1 β ,3 β ,11 α ,26-tetrol 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid	Bassarello i sar. (2008)
	Kavkazoid C	26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-22 α -metoksifurosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,11 α ,26-tetrol 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid	Bassarello i sar. (2008)
	Kavkazoid D	26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozilfurosta-5,20(22),25(27)-trien-1 β ,3 β ,26-triol 3- <i>O</i> - β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)-4- <i>O</i> -sulfo- α -L-arabinopiranozid	Bassarello i sar. (2008)
	*	(25 <i>S</i>)-22 α ,25-epoksifurost-5-en-3 β ,11 α ,26-triol 26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozid	Bassarello i sar. (2008)
	*	(25 <i>R</i>)-3 β ,11 α -dihidroksi-22 α -metoksifurost-5-en-26-il β -D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
*	3 β ,11 α -dihidroksi-22 α -metoksifurosta-5,25(27)-dien-26-il β -D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)	
*	(25 <i>R</i>)-26-[(β -D-glukopiranozil)oksi]-11 α -hidroksi-22 α -metoksifurost-5-en-3 β -il <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)	

Prilog 11. (Nastavak)

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Furostanol saponozidi	*	26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-11α-hidroksi-22α-metoksifurosta-5,25(27)-dien-3β-il <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	(25 <i>R</i>)-26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-11α-hidroksi-22α-metoksifurost-5-en-3β-il <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1 → 6)- <i>O</i> -[α-L-ramnopiranozil-(1 → 2)]-β-D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-11α-hidroksi-22α-metoksifurosta-5,25(27)-dien-3β-il <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1 → 6)- <i>O</i> -[α-L-ramnopiranozil-(1 → 2)]-β-D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	(25 <i>R</i>)-1β,3β,11α-trihidroksi-22α-metoksifurost-5-en-26-il β-D-glukopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-3β-hidroksi-22α-metoksifurosta-5,25(27)-dien-1β-il <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1 → 2)-α-L-arabinopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-3β-hidroksi-22α-metoksifurosta-5,25(27)-dien-1β-il <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1 → 2)- <i>O</i> -[β-D-ksilopiranozil-(1 → 3)]-α-L-arabinopiranozid	Mimaki i sar. (2010)
	*	(25 <i>R</i>)-26-[(α-L-ramnopiranozil)oksi]-22α-metoksifurost-5-en-3β-il <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→3)- <i>O</i> -[6-acetil-β-D-glukopiranozil-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Braca i sar. (2004), Prieto i sar. (2007)
	*	(25 <i>R</i>)-26-[(α-L-ramnopiranozil)oksi]-22α-metoksifurost-5-en-3β-il <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→3)- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Braca i sar. (2004), Prieto i sar. (2007)
	*	25 <i>R</i> ,26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-22α-hidroksi-5β-furostan-3-β-il <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1→4)-β-D-glukopiranozid	Prieto i sar. (2006, 2007)
	*	25 <i>R</i> ,26-[(β-D-glukopiranozil)oksi]-22α-metoksi-5β-furostan-3-β-il <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1→4)-β-D-glukopiranozid	Prieto i sar. (2007)
*	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-5β-furostan-3β,22α,26-triol 3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→6)- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Stochmal i sar. (2010)	

Prilog 11. (Nastavak)

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Furostanol saponozidi	*	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-5α-furostan-3β,22α,26-triol 3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→6)- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Stochmal i sar. (2010)
	*	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-furost-5-en-1β,3β,22α,26-tetraol 1- <i>O</i> -{α-L-ramnopiranozil-(1→2)- <i>O</i> -[β-D-glukopiranozil-(1→3)]-6- <i>O</i> -acetoksi-β-D-glukopiranozid}	Stochmal i sar. (2010)
	Kavkazoid E	(25 <i>R</i>)-furost-5-en-1β,3β,11α, 22α,26-pentaol 26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid F	(25 <i>R</i>)-5β-furostan-1β,3β,11α, 22α,26-pentaol 26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid G	(25 <i>R</i>)-22α-metoksi-5β-furostan-1β,3β,11α,26-tetraol 26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid H	(25 <i>R</i>)-5β-furost-20(22)-en-1β,3β,11α,26-tetraol 26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid I	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-5β-furostan-3β,22α,26-triol 3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→6)-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid J	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-22α-metoksi-5β-furostan-3β,26-diol 3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→6)-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid K	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-22α-metoksi-5β-furostan-3β,26-diol 3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-(1→6)-β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid L	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-5β-furostan-3β, 22α,26-triol 3- <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Kavkazoid M	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-22α-metoksi-5β-furostan-3β,26-diol 3- <i>O</i> -α-L-ramnopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	*	(25 <i>R</i>)-furosta-5,20(22)-diene-1β,3β,11α,26-tetraol 26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	*	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil-22α-metoksi-furost-5-en-1β,3β,11α,26-tetraol	Muzashvili i sar. (2011)

Prilog 11. (Nastavak)

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Furostanol saponozidi	*	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-5 β -furostan-3 β ,22 α ,26-triol 3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
	Ceparozid A	*	Muzashvili i sar. (2011)
	Ruskopontikozid E	*	Muzashvili i sar. (2011)
	*	26- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil-22 α -metoksi-furosta-5,25(27)-dien-1 β ,3 β ,26-triol 1- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranozid	Muzashvili i sar. (2011)
Ekdisteroidi	Ekdisteron	20-hidroksiekdison (2 β ,3 β ,14 α ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i> ,25-heksahidroksi- 5 β -holesten-7-en-6-on)	Hardman i Benjamin (1980), Meng i sar. (2001), Muzashvili i sar. (2006-a), Muzashvili i sar. (2011)
	Polipodin B	5 β ,20-dihidroekdison	Hardman i Benjamin (1980)
	β -ekdison	2 β ,3 β ,14 α ,20 β ,22,25-heksahidroksi-7-holesten-6-on	Ki β mer i Wichtl (1987), Colombo i sar. (1990), Colombo i Tome (1993), Liedtke i sar. (1997)
	*	5- α -hidroksiekdison	Ki β mer i Wichtl (1987)
	*	5- α -hidroksiekdison 3- β -D-glukoziid	Ki β mer i Wichtl (1987)
	*	5- β -hidroksiekdison 3- β -D-glukoziid	Ki β mer i Wichtl (1987)
	Polipodin B	5 β -hidroksiekdisteron	Colombo i sar. (1990), Colombo i Tome (1993), Rosselli i sar. (2009)
Ekdisteron	20-hidroksi- β -ekdison-3- <i>O</i> - β -D-glikoziid	Meng i sar. (2001), Akin i Anil (2007), Bassarello i sar. (2008), Puglisi i sar. (2009), Rosselli i sar. (2009)	
Alkaloidi	Celiamin, spirintilamin, spirintilin i alkaloid V	*	Keller i Schöbel (1928)
	*	*	Dilparić-Knežević (1977)
	Magnoflorin, korituberin	*	Slavik i sar. (1987)
	*	*	Maksimović (1998)

Prilog 12. Hemijski sastav biljaka roda *Helleborus* L.- ugljeni hidrati, lipidne materije, aminokiseline, peptidi

Grupa	Naziv sastojka	Hemijski sastav	Autor, godina
Ugljeni hidrati (glucidi)	Saharoza, rafinoza, stahioza	*	Stefanović (1962)
	Rafinoza, saharoza, galaktoza, glukoza, fruktoza, ramnoza, liksoza	*	Stefanović i Mladenović (1963)
	Glukoza, fruktoza, saharoza	*	Baytop i Malkoc (1965), Maksimović (1998)
	Glukoza, fruktoza, galaktoza, saharoza, rafinoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza, maltoza	*	Živanov-Stakić i Mladenović (1970-b; 1971-a)
Lipidne materije	β sitosterol, slobodni i esterifikovani fitosteroli	*	Stefanović i Mladenović (1960), Živanov Stakić i Mladenović (1971-b), Serebryakov (1982), Anguladze i sar. (1983), Maksimović (1998)
	Miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska i linoleinska kiselina	*	Čučković (1939), Serebryakov (1982), Anguladze i sar. (1983), Dalakishvili (1983), Colombo i sar. (1991), Maksimović (1998)
	*	Stigmast-5-en-3 β -ol monohidrat	Argay i sar. (1996)
AK i peptidi	Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Arg, Lys, Thr, Leu, Ile, His, Ala, Pro, Met, Val	*	Mladenović i Stefanović (1963)
	Heletionin D	*	Milbradt i sar. (2003)
	Indol-3-sirćetna kiselina i njeni aminokiselinski konjugati	*	Pěňčík i sar. (2009)

Prilog 13. ROS/RNS vrste značajne za pojavu oksidativnog stresa

1. Radikali i neradikali kiseonika

a. Slobodni radikali

- superoksidni anjon, $O_2^{\cdot -}$
- hidroksilni radikal, OH^{\cdot}
- peroksilni radikal, ROO^{\cdot}
- alkoksilni radikal, RO^{\cdot}
- hidroperoksilni radikal, HO_2^{\cdot}

b. Spojevi koji nisu slobodni radikali

- vodonik peroksid, H_2O_2
- hipohlorna kiselina, $HClO$
- ozon, O_3
- singlet kiseonik, $1O_2$

2. Radikali i neradikali azota

RNS (reaktivni azotni spojevi)

a. Slobodni radikali

- azot-(II)-oksid, NO^{\cdot}
- azot-(IV)-oksid, NO_2^{\cdot}

b. Spojevi koji nisu slobodni radikali

- nitrozil, NO^+
- nitritna kiselina, HNO_2
- peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
- alkilperoksinitrit, $ROONO$
- azot oksid anjon, NO_2^-
- azot (III) oksid, N_2O_3
- nitril hlorid, N

Prilog 14. Broj ukupnih leukocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	7,98	8,06	7,14	8,76	7,40	8,68	7,46	7,93	0,63	0,24	7,97	7,14-8,76
FR	9,14	9,41	8,58	8,14	8,37	8,20	8,14	8,61	0,57	0,22	6,62	8,14-9,41
PEK 50	12,00	12,10	9,99	10,50	10,60	9,00	9,20	10,48	1,23	0,46	11,69	9,00-12,10
PEK 100	7,09	10,40	4,21	4,95	4,93	4,57	9,35	6,50	2,50	0,95	38,47	4,21-10,40
PEK 200	7,93	7,67	9,37	7,79	8,18	7,72	7,09	7,96	0,70	0,27	8,83	7,09-9,37
HEK 50	4,94	4,71	5,24	5,43	7,96	7,55	7,10	6,13	1,36	0,51	22,10	4,71-7,96
HEK 100	7,27	6,79	8,63	10,50	8,85	7,99	7,46	8,21	1,25	0,47	15,19	6,79-10,50
HEK 200	8,38	6,88	7,38	8,35	7,82	6,57	8,04	7,63	0,71	0,27	9,32	6,57-8,38
MEK 50	12,80	8,53	13,30	5,92	5,90	9,87	9,90	9,46	2,95	1,12	31,22	5,90-13,30
MEK 100	15,00	13,80	12,90	12,10	13,10	12,20	12,00	13,01	1,09	0,41	8,36	12,00-15,00
MEK 200	19,20	19,60	21,20	20,80	19,30	16,90	13,70	18,67	2,59	0,98	13,88	13,70-21,20
EK 50	7,73	5,97	13,00	13,00	6,66	9,14	15,10	10,09	3,59	1,36	35,58	5,97-15,10
EK 100	9,75	9,57	11,90	12,10	11,20	9,27	10,30	10,58	1,15	0,43	10,87	9,27-12,10
EK 200	9,04	11,60	17,70	17,50	13,20	17,10	10,50	13,81	3,62	1,37	26,21	9,04-17,70
DM1	6,54	6,50	8,58	7,59	9,13	8,53	7,25	7,73	1,04	0,39	13,46	6,50-9,13
DM1+FR	16,20	10,90	12,30	10,90	17,80	18,00	16,70	14,69	3,20	1,21	21,78	10,90-18,00
DM1+MEK50	30,10	18,30	17,60	18,00	21,70	30,90	20,80	22,49	5,68	2,15	25,27	17,60-30,90
DM1+MEK100	25,70	17,30	24,70	28,50	25,70	31,20	25,60	25,53	4,27	1,61	16,73	17,30-31,20
DM1+MEK200	21,90	12,50	11,90	18,10	11,00	21,80	22,80	17,14	5,23	1,98	30,50	11,00-22,80
DM1+EK50	20,10	19,80	13,40	11,00	23,10	22,80	17,00	18,17	4,61	1,74	25,38	11,00-23,10
DM1+EK100	8,51	9,00	10,50	18,80	15,20	18,40	18,80	14,17	4,73	1,79	33,35	8,51-18,80
DM1+EK200	18,10	17,90	17,90	18,60	11,00	8,62	8,33	14,35	4,79	1,81	33,38	8,33-18,60

Prilog 15. Broj neutrofilnih granulocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	2,42	2,69	1,17	2,23	2,53	3,29	2,98	2,47	0,68	0,26	27,30	1,17-3,29
FR	2,74	2,52	2,17	2,59	2,01	2,35	2,62	2,43	0,26	0,10	10,85	2,01-2,74
PEK 50	4,06	5,16	5,31	5,73	5,33	4,68	4,30	4,94	0,61	0,23	12,30	4,06-5,73
PEK 100	2,56	4,10	1,10	1,68	1,30	1,41	2,06	2,03	1,04	0,39	51,16	1,10-4,10
PEK 200	2,41	2,44	3,11	2,20	2,47	1,99	1,83	2,35	0,41	0,16	17,60	1,83-3,11
HEK 50	1,64	1,54	1,73	1,73	2,44	2,17	2,00	1,89	0,32	0,12	17,11	1,54-2,44
HEK 100	2,69	2,31	3,10	3,20	3,28	2,26	2,98	2,83	0,42	0,16	14,77	2,26-3,28
HEK 200	2,60	2,55	2,36	2,62	2,99	1,92	2,35	2,48	0,33	0,12	13,19	1,92-2,99
MEK 50	5,96	4,55	8,18	3,26	3,22	4,90	4,89	4,99	1,71	0,64	34,15	3,22-8,18
MEK 100	8,39	6,61	6,73	7,75	9,15	9,29	8,51	8,06	1,08	0,41	13,38	6,61-9,29
MEK 200	17,00	15,40	17,80	18,20	15,80	11,30	11,70	15,31	2,79	1,06	18,23	11,30-18,20
EK 50	4,51	3,55	9,46	9,87	4,05	4,62	8,01	6,30	2,72	1,03	43,16	3,55-9,87
EK 100	8,30	8,30	8,37	8,08	7,85	7,33	6,07	7,76	0,83	0,31	10,67	6,07-8,37
EK 200	5,61	10,00	15,80	15,80	12,10	15,30	5,12	11,39	4,64	1,75	40,76	5,12-15,80
DM1	4,32	4,80	7,03	6,33	5,64	7,27	6,03	5,92	1,09	0,41	18,42	4,32-7,27
DM1+FR	12,40	8,15	8,82	7,25	12,80	12,50	11,50	10,49	2,34	0,88	22,29	7,25-12,80
DM1+MEK50	28,80	14,90	15,10	15,20	19,50	27,90	19,30	20,10	5,97	2,26	29,68	14,90-28,80
DM1+MEK100	23,80	15,50	21,80	24,40	23,70	26,60	19,90	22,24	3,64	1,37	16,35	15,50-26,60
DM1+MEK200	19,50	10,40	9,81	15,10	9,38	19,00	19,50	14,67	4,75	1,80	32,39	9,38-19,50
DM1+EK50	16,00	14,90	10,20	6,11	19,40	19,90	14,70	14,46	4,91	1,85	33,94	6,11-19,90
DM1+EK100	7,23	8,12	9,26	17,60	13,20	15,10	15,10	12,23	4,02	1,52	32,87	7,23-17,60
DM1+EK200	15,50	15,80	15,40	15,00	7,43	6,13	6,22	11,64	4,75	1,79	40,77	6,13-15,80

Prilog 16. Procenat neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	30,30	33,40	16,40	25,50	34,20	37,90	39,90	31,09	8,03	3,03	25,82	16,40-39,90
FR	29,10	26,80	25,20	31,80	24,10	28,60	32,20	28,26	3,10	1,17	10,97	24,10-32,20
PEK 50	33,60	42,60	53,20	54,10	50,10	52,10	46,70	47,49	7,32	2,77	15,42	33,60-54,10
PEK 100	36,20	39,40	26,00	33,90	26,30	30,90	22,10	30,69	6,22	2,35	20,26	22,10-39,40
PEK 200	30,30	31,80	33,10	28,20	30,20	25,8	25,80	29,31	2,83	1,07	9,67	25,80-33,10
HEK 50	33,10	32,70	33,00	31,90	30,70	28,80	28,20	31,20	2,03	0,77	6,51	28,20-33,10
HEK 100	37,00	34,00	35,90	30,30	37,00	28,20	40,00	34,63	4,13	1,56	11,92	28,20-40,00
HEK 200	31,00	37,00	32,00	31,30	38,20	29,20	29,20	32,56	3,62	1,37	11,11	29,20-38,20
MEK 50	46,40	53,30	61,30	55,20	54,60	49,60	49,40	52,83	4,90	1,85	9,28	46,40-61,30
MEK 100	55,90	47,70	52,10	63,90	69,60	75,60	70,70	62,21	10,50	3,97	16,88	47,70-75,60
MEK 200	88,60	78,90	84,00	87,80	81,80	67,00	85,30	81,91	7,38	2,79	9,01	67,00-88,60
EK 50	58,40	59,40	72,70	75,90	60,90	50,60	52,80	61,53	9,50	3,59	15,44	50,60-75,90
EK 100	85,20	86,70	70,30	66,30	69,80	79,10	59,00	73,77	10,23	3,87	13,87	59,00-86,70
EK 200	62,00	86,50	89,40	90,70	91,70	89,60	48,60	79,79	17,24	6,52	21,61	48,60-91,70
DM1	66,10	73,90	82,00	83,50	61,80	85,20	83,10	76,51	9,39	3,55	12,28	61,80-85,20
DM1+FR	76,90	74,60	71,70	66,00	71,90	69,70	68,80	71,37	3,64	1,38	5,10	66,00-76,90
DM1+MEK50	95,90	81,90	85,70	84,40	89,80	90,20	92,60	88,64	4,90	1,85	5,53	81,90-95,90
DM1+MEK100	92,60	89,30	88,30	85,80	92,40	85,40	77,50	87,33	5,18	1,96	5,93	77,50-92,60
DM1+MEK200	89,40	83,10	82,00	83,20	84,90	87,30	85,70	85,09	2,61	0,99	3,07	82,00-89,40
DM1+EK50	79,80	75,40	76,70	55,10	84,00	87,60	86,20	77,83	11,04	4,17	14,19	55,10-87,60
DM1+EK100	85,00	90,20	87,70	93,60	87,10	81,90	80,50	86,57	4,57	1,73	5,28	80,50-93,60
DM1+EK200	85,90	88,70	86,10	80,70	67,30	71,10	74,60	79,20	8,30	3,14	10,48	67,30-88,70

Prilog 17. Broj limfocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	5,03	4,95	5,78	6,13	4,32	5,07	3,97	5,04	0,75	0,28	14,97	3,97-6,13
FR	5,48	6,50	5,88	5,34	5,90	5,49	5,09	5,67	0,47	0,18	8,21	5,09-6,50
PEK 50	7,47	5,96	3,97	4,08	4,38	3,71	4,10	4,81	1,39	0,52	28,83	3,71-7,47
PEK 100	4,00	4,94	2,60	3,10	3,60	2,67	6,58	3,93	1,43	0,54	36,31	2,60-6,58
PEK 200	4,55	4,30	5,63	5,35	5,30	5,68	5,19	5,14	0,53	0,20	10,22	4,30-5,68
HEK 50	2,85	2,75	3,13	3,26	5,23	5,33	4,65	3,89	1,14	0,43	29,35	2,75-5,33
HEK 100	4,20	4,13	5,15	7,04	4,79	5,14	3,97	4,92	1,05	0,40	21,42	3,97-7,04
HEK 200	5,63	3,59	4,63	4,87	4,40	4,20	5,54	4,69	0,73	0,27	15,50	3,59-5,63
MEK 50	6,32	3,72	4,52	2,45	2,47	4,40	4,47	4,05	1,34	0,51	33,19	2,45-6,32
MEK 100	5,69	6,22	4,85	4,01	3,36	2,05	2,88	4,15	1,52	0,57	36,55	2,05-6,22
MEK 200	1,82	2,84	1,95	1,53	1,93	3,46	1,12	2,09	0,80	0,30	38,09	1,12-3,46
EK 50	2,44	1,87	3,04	2,01	2,33	3,56	5,44	2,96	1,24	0,47	42,06	1,87-5,44
EK 100	0,90	0,92	2,98	3,38	2,65	1,15	2,94	2,13	1,09	0,41	51,21	0,90-3,38
EK 200	2,94	0,92	1,01	0,98	0,68	1,04	4,25	1,69	1,36	0,51	80,62	0,68-4,25
DM1	1,65	1,41	1,03	0,90	2,68	0,79	0,90	1,34	0,67	0,25	50,00	0,79-2,68
DM1+FR	2,79	2,40	2,90	2,76	4,17	4,29	4,10	3,34	0,80	0,30	24,06	2,40-4,29
DM1+MEK50	0,80	1,76	1,63	1,75	1,86	1,95	0,94	1,53	0,46	0,17	30,22	0,80-1,95
DM1+MEK100	1,46	1,38	1,61	2,13	1,53	2,10	3,29	1,93	0,67	0,25	34,81	1,38-3,29
DM1+MEK200	1,18	1,62	1,67	2,40	1,43	1,15	2,08	1,65	0,46	0,17	27,91	1,15-2,40
DM1+EK50	3,12	3,48	2,51	4,53	2,04	1,77	1,75	2,74	1,03	0,39	37,54	1,75-4,53
DM1+EK100	0,95	0,69	0,86	0,73	1,18	2,64	2,81	1,41	0,91	0,35	64,94	0,69-2,81
DM1+EK200	1,71	1,29	1,61	2,18	2,32	1,83	1,68	1,80	0,35	0,13	19,40	1,29-2,32

Prilog 18. Procenat limfocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	63,00	61,40	80,90	70,00	58,40	58,40	53,20	63,61	9,20	3,48	14,46	53,20-80,90
FR	58,20	69,10	68,50	65,60	70,50	66,90	62,50	65,90	4,28	1,62	6,50	58,20-70,50
PEK 50	61,80	49,20	39,70	38,50	41,20	41,30	44,60	45,19	8,15	3,08	18,30	38,50-61,80
PEK 100	56,50	47,60	61,70	62,60	73,10	58,50	70,40	61,49	8,59	3,24	13,96	47,60-73,10
PEK 200	57,40	56,10	60,10	68,60	64,80	73,60	73,20	64,83	7,25	2,74	11,18	56,10-73,60
HEK 50	57,80	58,50	59,60	59,90	65,70	70,60	65,50	62,51	4,80	1,81	7,67	57,80-70,60
HEK 100	57,70	60,80	59,70	66,60	54,20	64,30	53,20	59,50	4,94	1,87	8,30	53,20-66,60
HEK 200	67,20	52,20	62,80	58,40	56,20	63,90	68,90	61,37	6,04	2,28	9,84	52,20-68,90
MEK 50	49,10	43,60	33,90	41,40	41,80	44,60	45,10	42,79	4,67	1,77	10,92	39,90-49,10
MEK 100	37,90	44,90	37,60	33,10	25,50	16,70	23,90	31,37	9,77	3,69	31,15	16,70-44,90
MEK 200	9,50	14,50	9,20	7,30	9,90	20,40	8,10	11,27	4,63	1,75	41,12	7,30-20,40
EK 50	31,60	31,40	23,40	15,40	35,00	39,00	35,90	30,24	8,18	3,09	27,05	15,40-39,00
EK 100	9,30	9,60	25,00	27,70	23,60	12,40	28,50	19,44	8,64	3,27	44,43	9,30-28,50
EK 200	32,60	8,00	5,70	5,60	5,10	6,10	40,30	14,77	15,00	5,67	101,57	5,10-40,30
DM1	25,20	21,70	12,00	11,80	29,40	9,30	12,40	17,40	7,90	2,99	45,40	9,30-29,40
DM1+FR	17,20	21,90	23,60	25,10	23,30	23,80	24,50	22,77	2,65	1,00	11,65	17,20-25,10
DM1+MEK50	2,70	9,60	9,20	9,70	8,60	6,30	4,50	7,23	2,78	1,05	38,44	2,70-9,70
DM1+MEK100	5,70	7,90	6,50	7,50	5,90	6,70	12,80	7,57	2,44	0,92	32,20	5,70-12,80
DM1+MEK200	5,40	12,90	13,90	13,20	13,00	5,30	9,10	10,40	3,78	1,43	36,36	5,30-13,90
DM1+EK50	15,50	17,60	18,80	40,90	8,80	7,80	10,30	17,10	11,36	4,29	66,41	7,80-40,90
DM1+EK100	11,20	7,80	8,10	3,90	7,70	14,30	14,90	9,67	3,98	1,50	41,15	3,90-14,90
DM1+EK200	9,40	7,20	9,00	11,70	21,00	21,20	20,20	14,24	6,28	2,37	44,09	7,20-21,20

Prilog 19. Neutrofilno/limfocitni indeks kontrolne grupe i grupa pacova tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	48,11	54,34	20,24	36,38	58,56	64,89	75,06	51,08	18,30	6,92	35,82	20,24-75,06
FR	50,00	38,77	36,90	48,50	34,07	42,80	51,47	43,22	6,90	2,61	15,96	34,07-51,47
PEK 50	54,35	81,54	133,75	140,44	121,69	126,15	104,88	108,97	31,13	11,77	28,57	54,35-140,44
PEK 100	64,00	86,57	42,31	54,19	36,11	52,81	31,31	52,47	18,79	7,10	35,80	31,31-86,57
PEK 200	21,98	56,74	55,24	41,12	46,60	35,03	35,26	41,71	12,31	4,65	29,51	21,98-56,74
HEK 50	57,54	56,00	55,27	53,07	46,65	40,71	43,01	50,32	6,78	2,56	13,47	40,71-57,54
HEK 100	64,05	55,93	60,19	45,45	68,47	43,97	75,06	59,02	11,50	4,35	19,49	43,97-75,06
HEK 200	46,18	71,03	50,97	53,80	67,95	45,71	42,42	54,01	11,24	4,25	20,81	42,42-71,03
MEK 50	94,30	122,31	180,97	133,06	130,36	111,36	109,39	125,96	27,69	10,46	21,98	94,30-180,97
MEK 100	147,45	106,27	138,76	193,27	272,32	453,17	295,49	229,53	120,89	45,69	52,67	106,27-453,17
MEK 200	934,06	542,25	912,82	1189,54	363,63	326,59	1044,64	759,08	344,37	130,16	45,37	326,59-1189,54
EK 50	184,84	189,84	311,18	491,04	173,82	129,77	147,24	232,53	128,06	48,40	55,07	129,77-491,04
EK 100	922,22	902,17	280,87	239,05	296,23	637,39	206,46	497,77	316,93	119,79	63,67	206,46-922,22
EK 200	190,28	1086,96	1564,36	1612,24	1779,41	1471,15	120,47	1117,92	690,58	261,01	61,77	120,47-1779,41
DM1	261,81	340,42	682,52	703,34	210,45	920,25	670,00	541,26	269,04	101,69	49,71	210,45-920,25
DM1+FR	444,45	339,58	304,14	262,68	306,95	291,37	280,49	318,52	60,48	22,86	18,99	262,68-444,45
DM1+MEK50	3600,0	846,59	926,38	868,57	1048,39	1430,77	2053,19	1539,13	1005,71	380,12	65,34	846,59-3600,00
DM1+MEK100	1630,14	1123,19	1354,04	1145,54	1549,02	1266,67	604,86	1239,07	338,47	127,93	27,32	604,86-1630,14
DM1+MEK200	1652,54	641,97	587,43	629,17	655,95	1652,17	937,50	965,25	483,20	182,63	50,06	587,43-1652,54
DM1+EK50	512,82	428,16	406,37	134,88	950,98	1124,29	840,00	628,21	351,44	132,83	55,94	134,88-1124,29
DM1+EK100	761,05	1176,81	1076,74	2410,95	1118,64	571,97	537,37	1093,36	637,09	240,80	58,27	537,37-2410,95
DM1+EK200	906,43	1224,81	956,52	688,07	320,26	334,97	370,24	685,90	357,95	135,29	52,19	320,26-1224,81

Prilog 20. Broj monocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	0,53	0,42	0,19	0,40	0,55	0,32	0,51	0,42	0,13	0,05	31,00	0,19-0,55
FR	1,19	0,39	0,53	0,21	0,46	0,36	0,43	0,51	0,32	0,12	61,93	0,21-1,19
PEK 50	0,55	0,98	0,71	0,78	0,92	0,60	0,80	0,76	0,16	0,06	20,60	0,55-0,98
PEK 100	0,52	1,36	0,52	0,17	0,03	0,48	0,71	0,54	0,43	0,16	79,18	0,03-1,36
PEK 200	0,97	0,93	0,63	0,23	0,41	0,05	0,07	0,47	0,38	0,15	81,71	0,05-0,97
HEK 50	0,45	0,41	0,39	0,45	0,28	0,05	0,45	0,35	0,15	0,06	41,54	0,05-0,45
HEK 100	0,39	0,35	0,38	0,33	0,78	0,60	0,51	0,48	0,16	0,06	34,52	0,33-0,78
HEK 200	0,15	0,74	0,39	0,86	0,44	0,45	0,16	0,46	0,27	0,10	58,73	0,15-0,86
MEK 50	0,58	0,26	0,64	0,20	0,21	0,57	0,54	0,43	0,20	0,07	45,53	0,20-0,64
MEK 100	0,93	1,02	1,32	0,37	0,64	0,94	0,64	0,84	0,31	0,12	37,20	0,37-1,32
MEK 200	0,36	1,28	1,45	1,00	1,60	2,13	0,90	1,25	0,56	0,21	45,35	0,36-2,13
EK 50	0,77	0,55	0,51	1,13	0,27	0,95	1,71	0,84	0,48	0,18	56,91	0,27-1,71
EK 100	0,54	0,36	0,56	0,73	0,74	0,79	1,29	0,82	0,28	0,12	33,53	0,56-1,29
EK 200	0,49	0,64	0,87	0,64	0,43	0,75	1,17	0,71	0,25	0,09	35,09	0,43-1,17
DM1	0,57	0,28	0,52	0,36	0,80	0,47	0,33	0,48	0,18	0,07	37,31	0,28-0,80
DM1+FR	0,96	0,39	0,58	0,98	0,85	1,16	1,12	0,86	0,28	0,11	32,83	0,39-1,16
DM1+MEK50	0,42	1,56	0,90	1,06	0,35	1,09	0,60	0,85	0,43	0,16	50,25	0,35-1,56
DM1+MEK100	0,45	0,48	1,27	1,93	0,44	2,46	2,49	1,36	0,94	0,35	68,90	0,44-2,49
DM1+MEK200	1,15	0,50	0,48	0,65	0,23	1,62	1,20	0,83	0,50	0,19	59,78	0,23-1,62
DM1+EK50	0,95	1,38	0,61	0,45	1,67	1,06	0,60	0,96	0,45	0,17	46,64	0,45-1,67
DM1+EK100	0,33	0,20	0,44	0,47	0,79	0,69	0,86	0,54	0,25	0,09	45,49	0,20-0,86
DM1+EK200	0,86	0,74	0,88	1,42	1,30	0,67	0,43	0,90	0,35	0,13	38,80	0,43-1,42

Prilog 21. Procenat monocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	6,70	5,20	2,70	4,50	7,40	3,70	6,90	5,30	1,77	0,67	33,49	2,70-7,40
FR	12,70	4,10	6,30	2,60	5,40	4,50	5,30	5,84	3,24	1,23	55,49	2,60-12,70
PEK 50	4,60	8,20	7,10	7,40	8,70	6,60	8,70	7,33	1,45	0,55	19,74	4,60-8,70
PEK 100	7,40	13,00	12,20	0,60	0,60	10,60	7,60	7,43	5,12	1,93	68,89	0,60-13,00
PEK 200	12,30	12,10	6,80	3,00	5,10	0,60	1,00	5,84	4,85	1,83	83,07	0,60-12,30
HEK 50	9,10	8,80	7,30	8,20	3,60	0,60	6,30	6,27	3,12	1,18	49,78	0,60-9,10
HEK 100	5,30	5,20	4,40	3,10	8,80	7,50	6,80	5,87	1,95	0,74	33,14	3,10-8,80
HEK 200	1,80	10,80	5,20	10,30	5,60	6,90	1,90	6,07	3,60	1,36	59,22	1,80-10,80
MEK 50	4,50	3,10	4,80	3,40	3,50	5,80	5,50	4,37	1,07	0,40	24,41	3,10-5,80
MEK 100	6,20	7,40	10,20	3,00	4,90	7,70	5,40	6,40	2,31	0,87	36,07	3,00-10,20
MEK 200	1,90	6,50	6,80	4,80	8,30	12,60	6,50	6,77	3,27	1,24	48,26	1,90-12,60
EK 50	10,00	9,20	3,90	8,70	4,10	10,40	11,30	8,23	3,01	1,14	36,54	3,90-11,30
EK 100	5,50	3,70	4,70	6,00	6,60	8,50	12,50	7,66	3,03	1,36	39,58	4,70-12,50
EK 200	5,40	5,50	4,90	3,70	3,20	4,40	11,10	5,46	2,63	0,99	48,17	3,20-11,10
DM1	8,70	4,40	6,10	4,70	8,80	5,50	4,50	6,10	1,91	0,72	31,26	4,40-8,80
DM1+FR	5,90	3,50	4,70	8,90	4,70	6,50	6,70	5,84	1,76	0,67	30,15	3,50-8,90
DM1+MEK50	1,40	8,50	5,10	5,90	1,60	3,50	2,90	4,13	2,55	0,96	61,70	1,40-8,50
DM1+MEK100	1,70	2,80	5,10	6,80	1,70	7,90	9,70	5,10	3,17	1,20	62,16	1,70-9,70
DM1+MEK200	5,20	3,90	4,00	3,60	2,10	7,40	5,30	4,50	1,67	0,63	37,10	2,10-7,40
DM1+EK50	4,70	7,00	4,60	4,10	7,20	4,70	3,50	5,11	1,42	0,54	27,82	3,50-7,20
DM1+EK100	3,90	2,20	4,20	2,50	5,20	3,80	4,60	3,77	1,08	0,41	28,67	2,20-5,20
DM1+EK200	4,70	4,10	4,90	7,60	11,80	7,70	5,20	6,57	2,71	1,02	41,19	4,10-11,80

Prilog 22. Broj eritrocita ($10^{12}/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	7,10	6,89	6,60	6,02	5,86	5,26	6,82	6,36	0,67	0,25	10,49	5,26-7,10
FR	6,51	6,88	7,01	6,94	7,00	6,94	7,01	6,90	0,18	0,07	2,58	6,51-7,01
PEK 50	8,23	7,96	6,92	7,13	7,29	6,56	7,27	7,34	0,58	0,22	7,89	6,56-8,23
PEK 100	6,87	6,67	7,19	7,40	7,56	6,82	6,99	7,07	0,32	0,12	4,59	6,67-7,56
PEK 200	7,47	7,50	6,23	7,48	6,71	6,21	5,42	6,72	0,81	0,31	12,06	5,42-7,50
HEK 50	7,01	7,01	6,07	5,97	5,64	6,64	6,60	6,42	0,53	0,20	8,32	5,64-7,01
HEK 100	7,03	7,27	6,95	7,10	7,44	6,95	6,82	7,08	0,21	0,08	3,00	6,82-7,44
HEK 200	6,05	7,36	7,17	7,31	7,20	7,18	6,37	6,95	0,52	0,20	7,45	6,05-7,36
MEK 50	6,33	5,80	6,11	5,98	6,09	6,54	6,61	6,21	0,30	0,11	4,78	5,80-6,61
MEK 100	7,65	7,28	7,86	5,93	5,50	6,08	6,10	6,63	0,94	0,36	14,21	5,50-7,86
MEK 200	8,98	7,50	9,04	9,19	8,09	6,23	5,99	7,86	1,34	0,51	17,03	5,99-9,19
EK 50	7,27	6,69	7,78	7,19	6,93	7,64	8,13	7,38	0,50	0,19	6,82	6,69-8,13
EK 100	7,67	7,54	7,17	6,93	6,41	8,31	8,47	7,50	0,74	0,28	9,81	6,41-8,47
EK 200	7,50	9,07	8,77	8,52	9,69	8,75	7,34	8,52	0,84	0,32	9,84	7,34-9,69
DM1	7,62	7,98	8,06	8,00	7,84	7,33	5,66	7,50	0,85	0,32	11,34	5,66-8,06
DM1+FR	8,27	8,25	9,72	8,63	7,18	7,18	6,61	7,98	1,06	0,40	13,31	6,61-9,72
DM1+MEK50	9,01	5,69	5,35	5,33	8,99	7,26	9,27	7,27	1,82	0,69	25,07	5,33-9,27
DM1+MEK100	8,18	6,65	5,91	6,30	8,17	6,85	5,86	6,85	0,98	0,37	14,26	5,86-8,18
DM1+MEK200	9,15	8,25	8,27	6,99	6,31	9,09	8,11	8,02	1,04	0,39	13,00	6,31-9,15
DM1+EK50	7,71	7,42	8,56	9,23	8,23	8,41	8,50	8,29	0,59	0,22	7,15	7,42-9,23
DM1+EK100	7,29	5,02	7,16	7,89	7,32	8,26	8,67	7,37	1,18	0,45	15,98	5,02-8,67
DM1+EK200	8,66	8,57	8,84	6,38	7,03	8,39	7,74	7,94	0,93	0,35	11,75	6,38-8,84

Prilog 23. Broj trombocita ($10^9/L$) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	649	849	680	727	826	683	583	713,86	95,25	36,00	13,34	583-849
FR	933	512	887	688	856	701	485	723,14	178,68	67,53	24,71	485-933
PEK 50	887	665	619	787	838	768	772	762,29	93,11	35,19	12,21	619-887
PEK 100	1193	1060	1143	1108	1387	1280	1219	1198,57	110,36	41,71	9,21	1060-1387
PEK 200	936	1014	833	840	723	1071	865	897,43	118,41	44,76	13,19	723-1071
HEK 50	628	632	774	688	764	606	675	681,00	66,41	25,10	9,75	606-774
HEK 100	627	668	640	631	612	842	583	657,57	85,35	32,26	12,98	583-842
HEK 200	639	710	700	575	678	677	582	651,57	54,72	20,68	8,40	575-710
MEK 50	1024	905	887	1142	1085	1011	1075	1018,43	94,10	35,57	9,24	887-1142
MEK 100	764	770	710	603	520	746	858	710,14	113,48	42,89	15,98	520-858
MEK 200	664	649	889	882	602	579	670	705,00	127,61	48,23	18,10	579-889
EK 50	541	528	316	262	394	153	400	370,57	139,85	52,86	37,74	153-541
EK 100	646	769	370	393	329	643	772	560,29	191,60	72,42	34,20	329-772
EK 200	418	912	888	872	922	904	854	824,29	180,69	68,29	21,92	418-922
DM1	607	645	650	774	842	465	347	618,57	169,92	64,22	27,47	347-842
DM1+FR	498	563	586	390	642	582	492	536,14	82,94	31,35	15,47	390-642
DM1+MEK50	958	753	967	914	679	727	820	831,14	116,65	44,09	14,03	679-967
DM1+MEK100	611	490	291	324	512	263	269	394,29	140,55	53,12	35,65	263-611
DM1+MEK200	347	859	843	623	315	341	670	571,14	237,36	89,71	41,56	315-859
DM1+EK50	703	711	557	448	644	671	753	641,00	105,28	39,79	16,42	448-753
DM1+EK100	526	401	323	418	404	452	422	420,86	60,95	23,04	14,48	323-526
DM1+EK200	488	485	499	597	701	593	561	560,57	78,39	29,63	13,98	485-701

Prilog 24. Koncentracija hemoglobina (g/L) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	127,00	125,00	116,00	115,00	125,00	122,00	130,00	122,86	5,58	2,11	4,54	115-130
FR	120,00	115,00	120,00	119,00	121,00	116,00	116,00	118,14	2,41	0,91	2,04	115-121
PEK 50	129,00	126,00	114,00	119,00	121,00	119,00	122,00	121,43	4,93	1,86	4,06	114-129
PEK 100	140,00	139,00	154,00	154,00	156,00	144,00	147,00	147,71	7,04	2,66	4,77	139-156
PEK 200	158,00	155,00	120,00	151,00	139,00	128,00	109,00	137,14	18,79	7,10	13,70	109-158
HEK 50	128,00	129,00	119,00	122,000	115,00	134,00	127,00	124,86	6,52	2,46	5,22	115-134
HEK 100	131,00	135,00	131,00	133,00	143,00	133,00,	130,00	133,71	4,42	1,67	3,31	130-143
HEK 200	114,00	139,00	135,00	132,00	141,00	133,00	126,00	131,43	9,11	3,44	6,93	114-141
MEK 50	131,00	124,00	134,00	134,00	134,00	145,00	146,00	135,43	7,74	2,93	5,72	124-146
MEK 100	150,00	144,00	156,00	128,00	123,00	132,00	133,00	138,00	12,18	4,60	8,83	123-156
MEK 200	146,00	125,00	154,00	153,00	131,00	104,00	120,00	133,29	18,65	7,05	13,99	104-154
EK 50	151,00	139,00	147,00	140,00	144,00	152,00	161,00	147,71	7,70	2,91	5,21	139-161
EK 100	151,00	147,00	134,00	139,00	124,00	126,00	130,00	135,86	10,32	3,90	7,60	124-151
EK 200	114,00	155,00	143,00	143,00	135,00	132,00	142,00	137,71	12,75	4,82	9,26	114-155
DM1	131,00	132,00	127,00	136,00	133,00	123,00	95,00	125,29	14,01	5,29	11,18	95-136
DM1+FR	115,00	124,00	141,00	130,00	113,00	113,00	120,00	122,29	10,36	3,91	8,47	113-141
DM1+MEK50	136,00	111,00	104,00	110,00	138,00	123,00	140,00	123,14	15,04	5,68	12,21	104-140
DM1+MEK100	138,00	107,00	104,00	108,00	136,00	114,00	105,00	116,00	14,71	5,56	12,68	104-138
DM1+MEK200	141,00	148,00	140,00	124,00	113,00	143,00	141,00	135,71	12,46	4,71	9,18	113-148
DM1+EK50	127,00	125,00	131,00	147,00	130,00	130,00	134,00	132,00	7,21	2,73	5,46	125-147
DM1+EK100	114,00	113,00	123,00	109,00	110,00	130,00	129,00	118,29	8,90	3,36	7,53	109-130
DM1+EK200	126,00	127,00	126,00	102,00	109,00	132,00	124,00	120,86	10,96	4,14	9,07	102-132

Prilog 25. Hematokritska vrednost (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	37,60	40,20	35,20	34,80	34,90	36,10	35,90	36,39	1,94	0,73	5,32	34,80-40,20
FR	37,90	37,00	40,00	37,60	39,30	37,70	37,30	38,11	1,11	0,42	2,90	37,00-40,00
PEK 50	36,70	33,90	31,20	30,60	33,40	32,30	33,50	33,09	2,01	0,76	6,09	30,60-36,70
PEK 100	39,00	39,80	42,70	44,30	45,30	41,40	41,40	41,99	2,28	0,86	5,43	39,00-45,30
PEK 200	42,70	42,50	32,90	41,10	37,20	35,60	31,20	37,60	4,65	1,76	12,35	31,20-42,70
HEK 50	36,10	36,20	34,70	34,80	32,40	38,00	36,00	35,46	1,74	0,66	4,90	32,40-38,00
HEK 100	35,70	37,40	35,60	35,50	38,00	35,10	35,90	36,17	1,09	0,41	3,00	35,10-38,00
HEK 200	32,00	37,80	38,70	37,40	38,40	36,10	35,60	36,57	2,31	0,87	6,33	32,00-38,70
MEK 50	36,80	35,50	37,20	37,10	37,50	39,60	40,50	37,74	1,72	0,65	4,56	35,50-40,50
MEK 100	43,20	39,60	41,30	32,70	34,30	36,80	37,90	37,97	3,74	1,41	9,84	32,70-43,20
MEK 200	45,90	38,20	47,80	47,70	41,20	33,10	34,50	41,20	6,16	2,33	14,94	33,10-47,80
EK 50	39,00	35,70	39,40	35,80	37,40	39,30	41,90	38,36	2,22	0,84	5,78	35,70-41,90
EK 100	39,30	39,40	35,70	36,50	31,90	40,10	41,80	37,81	3,34	1,26	8,84	31,90-41,80
EK 200	38,50	49,40	47,30	45,40	46,60	45,70	39,10	44,57	4,16	1,57	9,32	38,50-49,40
DM1	43,30	44,30	42,90	44,90	44,10	38,00	30,90	41,20	5,09	1,92	12,35	30,90-44,90
DM1+FR	35,80	34,20	40,10	37,20	31,50	30,300	36,60	35,10	3,39	1,28	9,66	30,30-40,10
DM1+MEK50	39,50	36,40	35,20	45,40	41,40	32,30	41,70	38,84	4,48	1,69	11,52	32,30-45,40
DM1+MEK100	37,60	27,50	26,60	27,40	35,70	28,70	27,40	30,13	4,53	1,71	15,04	26,60-37,60
DM1+MEK200	41,40	44,30	43,00	33,40	34,10	42,90	45,10	40,60	4,83	1,82	11,89	33,40-45,10
DM1+EK50	43,40	41,30	44,30	50,40	44,40	45,10	46,20	45,01	2,82	1,07	6,26	41,30-50,40
DM1+EK100	33,70	34,50	37,80	34,70	34,10	38,20	41,60	36,37	2,92	1,11	8,04	33,70-41,60
DM1+EK200	43,70	43,30	43,60	35,20	38,00	43,600	41,00	41,20	3,38	1,28	8,20	35,20-43,70

Prilog 26. Brzina sedimentacije eritrocita posle 15 min (mm/15min) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	1	0	0	1	0	0	0	0,29	0,49	0,18	170,78	0-1
FR	1	1	1	0	0	0	0	0,43	0,53	0,20	124,72	0-1
PEK 50	1	1	1	1	1	1	0	0,86	0,38	0,14	44,10	0-1
PEK 100	0	0	1	0	0	1	0	0,29	0,49	0,18	170,78	0-1
PEK 200	1	1	1	1	1	1	1	1,00	0,00	0,00	0,00	1-1
HEK 50	2	2	3	5	2	1	3	2,57	1,27	0,48	49,48	1-5
HEK 100	1	0	0	0	1	1	0	0,43	0,53	0,20	124,72	0-1
HEK 200	3	1	3	2	1	1	0	1,57	1,13	0,43	72,16	0-3
MEK 50	6	6	10	7	5	4	3	5,86	2,27	0,86	38,72	3-10
MEK 100	4	1	2	1	3	3	2	2,29	1,11	0,42	48,68	1-4
MEK 200	2	2	3	2	1	1	1	1,71	0,76	0,29	44,10	1-3
EK 50	1	1	1	2	3	0	0	1,14	1,07	0,40	93,54	0-3
EK 100	2	2	3	2	2	6	5	3,14	1,68	0,63	53,33	2-6
EK 200	1	2	1	1	2	2	1	1,43	0,53	0,20	37,42	1-2
DM1	0	0	0	1	0	0	0	0,14	0,38	0,00	0,00	0-0
DM1+FR	1	1	0	0	1	1	1	0,71	0,49	0,18	68,31	0-1
DM1+MEK50	0	1	3	5	15	5	5	4,86	4,91	1,86	101,16	0-15
DM1+MEK100	1	1	1	2	1	1	2	1,29	0,49	0,18	37,95	1-2
DM1+MEK200	2	1	0	0	1	1	1	0,86	0,69	0,26	80,51	0-2
DM1+EK50	0	1	4	1	1	5	5	2,43	2,15	0,81	88,50	0-5
DM1+EK100	3	3	3	2	3	3	3	2,86	0,38	0,14	13,23	2-3
DM1+EK200	3	1	1	2	4	4	6	3,00	1,83	0,69	60,86	1-6

Prilog 27. Brzina sedimentacije eritrocita posle 30 min (mm/30min) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	2	2	1	2	1	2	1	1,57	0,53	0,20	34,02	1-2
FR	2	2	3	3	1	1	1	1,86	0,90	0,34	48,45	1-3
PEK 50	2	4	4	3	3	4	3	3,29	0,76	0,29	23,01	2-4
PEK 100	1	1	2	1	1	2	1	1,29	0,49	0,18	37,95	1-2
PEK 200	4	4	3	4	6	2	4	3,86	1,21	0,46	31,50	2-6
HEK 50	5	4	6	9	5	3	6	5,43	1,90	0,72	35,04	3-9
HEK 100	5	2	2	4	3	2	2	2,86	1,21	0,46	42,52	2-5
HEK 200	6	2	8	7	3	4	2	4,57	2,44	0,92	53,37	2-8
MEK 50	15	16	27	17	11	10	9	15,00	6,14	2,32	40,92	9-27
MEK 100	10	4	7	6	7	6	5	6,43	1,90	0,72	29,59	4-10
MEK 200	4	4	4,50	4	2	5	4	3,93	0,93	0,35	23,73	2-5
EK 50	6	7	10	10	12	2	4	7,29	3,59	1,36	49,31	2-12
EK 100	25	19	12	10	11	11	10	14,00	5,77	2,18	41,24	10-25
EK 200	10	11	12	10	10	12	10	10,71	0,95	0,36	8,88	10-12
DM1	1	1	1	2	1	1	1	1,14	0,38	0,14	33,07	1-2
DM1+FR	2	2	1	2	2	2	2	1,86	0,38	0,14	20,35	1-2
DM1+MEK50	10	10	12	30	30	35	30	22,43	11,16	4,22	49,77	10-35
DM1+MEK100	17	15	13	10	14	15	9	13,29	2,87	1,08	21,60	9-17
DM1+MEK200	7	8	5	6	10	11	13	8,57	2,88	1,09	33,58	5-13
DM1+EK50	5	6	12	2	5	15	17	8,86	5,76	2,18	65,00	2-17
DM1+EK100	5	5	10	5	5	6	6	6,00	1,83	0,69	30,43	5-10
DM1+EK200	15	5	10	6	20	10	25	13,00	7,39	2,79	56,87	5-25

Prilog 28. Brzina sedimentacije eritrocita posle 45 min (mm/45min) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	4	5	5	2	2	2	2	3,00	0,58	0,22	19,25	2-4
FR	3	4	3	3	2	3	3	3,14	1,46	0,55	46,58	2-5
PEK 50	3	5	5	4	4	5	4	4,29	0,76	0,29	17,64	3-5
PEK 100	2	3	3	2	1	3	2	2,29	0,76	0,29	33,07	1-3
PEK 200	10	7	7	9	10	4	7	7,71	2,14	0,81	27,72	4-10
HEK 50	7	8	8	14	9	5	9	8,57	2,76	1,04	32,20	5-14
HEK 100	10	4	4	10	10	4	3	6,43	3,36	1,27	52,26	3-10
HEK 200	8	3	10	11	5	6	3	6,61	3,23	1,22	48,85	3-11
MEK 50	21	24	34	26	22	20	14	23,00	6,14	2,32	26,68	14-34
MEK 100	14	8	10	9	11	9	8	9,86	2,12	0,80	21,46	8-14
MEK 200	8	7	8	7	15	13	12	10,00	3,27	1,23	32,66	7-15
EK 50	10	11	16	22	23	5	8	13,57	6,95	2,63	51,20	5-23
EK 100	36	30	22	20	25	16	15	23,43	7,57	2,86	32,31	15-36
EK 200	20	21	24	21	22	21	23	21,71	1,38	0,52	6,36	20-24
DM1	2,50	2	2	4	2	2	2	2,36	0,75	0,28	31,73	2-4
DM1+FR	2	2	2	3	3	4	3	2,71	0,76	0,29	27,85	2-4
DM1+MEK50	25	24	35	47	42	50	48	38,71	10,89	4,12	28,13	24-50
DM1+MEK100	32	30	27	17	28	30	16	25,71	6,50	2,46	25,27	16-32
DM1+MEK200	14	15	12	15	20	25	28	18,43	6,08	2,30	32,99	12-28
DM1+EK50	15	15	45	25	23	30	32	26,43	10,52	3,98	39,80	15-45
DM1+EK100	8	10	18	9	11	15	13	12,00	3,56	1,35	29,66	8-18
DM1+EK200	30	16	15	20	30	15	45	24,43	11,21	4,24	45,88	15-45

Prilog 29. Brzina sedimentacije eritrocita posle 60 min (mm/60min) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	4	5	4	4	3	5	6	4,43	0,98	0,37	22,04	3-6
FR	6	7	3	3	3	5	5	4,57	1,62	0,61	35,40	3-7
PEK 50	6	9	10	8	6	9	8	8,00	1,53	0,58	19,09	6-10
PEK 100	3	5	6	3	2	4	5	4,00	1,41	0,53	35,36	2-6
PEK 200	16	10	14	15	15	8	13	13,00	2,94	1,11	22,65	8-16
HEK 50	8	9	11	18	11	7	11	10,71	3,59	1,36	33,53	7-18
HEK 100	16	6	7	14	13	7	6	9,86	4,30	1,62	43,61	6-16
HEK 200	10	4	12	14	7	8	5	8,57	3,64	1,38	42,52	4-14
MEK 50	25	28	39	31	26	24	17	27,14	6,77	2,56	24,94	17-39
MEK 100	18	12	16	14	17	13	12	14,57	2,44	0,92	16,74	12-18
MEK 200	17	18	15	14	29	26	24	20,43	5,86	2,21	28,66	14-29
EK 50	14	16	22	36	35	10	14	21,00	10,54	3,98	50,17	10-36
EK 100	42	36	38	27	34	26	20	31,86	7,76	2,93	24,34	20-42
EK 200	30	32	35	30	29	29	37	31,71	3,15	1,19	9,92	29-37
DM1	4	4	4	5	4	3	3	3,86	0,69	0,26	17,89	3-5
DM1+FR	4	3	4	5	4	5	4	4,14	0,69	0,26	16,66	3-5
DM1+MEK50	40	38	50	59	58	65	60	52,86	10,46	3,95	19,80	38-65
DM1+MEK100	46	45	43	50	43	45	46	45,43	2,37	0,90	5,22	43-50
DM1+MEK200	28	29	26	31	34	38	40	32,29	5,25	1,98	16,26	26-40
DM1+EK50	25	25	60	40	39	42	45	39,43	12,09	4,57	30,68	25-60
DM1+EK100	11	18	28	15	18	22	20	18,86	5,37	2,03	28,46	11-28
DM1+EK200	50	26	25	28	45	25	60	37,00	14,45	5,46	39,04	25-60

Prilog 30. Koncentracija albumina (g/L) u krvnoj plazmi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	45,00	42,00	41,00	38,00	21,00	41,00	35,00	37,57	7,96	3,01	21,17	21-45
FR	45,00	51,00	43,00	25,00	33,00	23,00	31,00	35,86	10,64	4,02	29,66	23-51
PEK 50	30,00	31,00	20,00	32,00	21,00	23,00	25,00	26,00	4,97	1,88	19,10	20-32
PEK 100	25,00	23,00	50,00	55,00	40,00	41,00	45,00	39,86	12,01	4,54	30,12	23-55
PEK 200	41,00	31,00	45,00	40,00	28,00	38,00	37,00	37,14	5,87	2,22	15,81	28-45
HEK 50	44,00	47,00	30,00	36,00	37,00	37,00	40,00	38,71	5,59	2,11	14,44	30-47
HEK 100	34,00	33,00	33,00	28,00	40,00	35,00	32,00	33,57	3,60	1,36	10,72	28-40
HEK 200	44,00	48,00	37,00	45,00	44,00	48,00	44,00	44,29	3,68	1,39	8,32	37-48
MEK 50	37,00	22,00	21,00	23,00	22,00	25,00	27,00	25,29	5,56	2,10	21,99	21-37
MEK 100	36,00	37,00	32,00	28,00	32,00	26,00	35,00	32,29	4,11	1,55	12,73	26-37
MEK 200	30,00	20,00	29,00	28,00	30,00	20,00	16,00	24,71	5,85	2,21	23,68	16-30
EK 50	45,00	28,00	40,00	29,00	30,00	36,00	33,00	34,43	6,29	2,38	18,28	28-45
EK 100	24,00	21,00	28,00	30,00	29,00	27,00	28,00	26,71	3,15	1,19	11,78	21-30
EK 200	21,00	26,00	22,00	23,00	27,00	29,00	27,00	25,00	3,00	1,13	12,00	21-29
DM1	45,00	29,00	39,00	38,00	34,00	38,00	42,00	37,86	5,21	1,97	13,76	29-45
DM1+FR	33,00	28,00	30,00	33,000	32,00	34,00	30,00	31,43	2,15	0,81	6,84	28-34
DM1+MEK50	34,00	36,00	26,000	30,00	36,00	25,00	32,00	31,29	4,50	1,70	14,38	25-36
DM1+MEK100	28,00	18,00	17,00	21,00	13,00	24,00	37,00	22,57	8,02	3,03	35,52	13-37
DM1+MEK200	32,00	31,00	33,00	27,00	30,00	20,00	27,00	28,57	4,43	1,67	15,50	20-33
DM1+EK50	32,00	21,00	39,00	38,00	32,00	39,00	27,00	32,57	6,80	2,57	20,89	21-39
DM1+EK100	24,00	21,00	28,00	34,00	35,00	29,00	30,00	28,71	5,02	1,90	17,50	21-35
DM1+EK200	30,00	31,00	28,00	31,00	32,00	27,00	28,00	29,57	1,90	0,72	6,43	27-32

Prilog 31. Koncentracija fibrinogena (g/L) u krvnoj plazmi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR-Tween80	1,30	1,60	1,00	1,10	1,40	1,20	1,50	1,30	0,22	0,08	16,62	1,00-1,60
FR	1,50	1,70	1,50	1,70	1,40	1,40	1,30	1,50	0,15	0,06	10,18	1,30-1,70
PEK 50	0,80	0,90	1,10	0,70	0,90	0,80	1,50	0,96	0,27	0,10	28,20	0,70-1,50
PEK 100	1,20	1,10	1,40	2,00	1,60	1,40	1,10	1,40	0,32	0,12	22,96	1,10-2,00
PEK 200	1,70	1,60	2,00	2,10	1,90	2,00	1,60	1,84	0,21	0,08	11,23	1,60-2,10
HEK 50	0,80	1,20	0,90	0,60	1,00	0,60	0,80	0,84	0,21	0,08	25,50	0,60-1,20
HEK 100	0,90	1,00	0,70	0,60	0,50	0,60	0,90	0,74	0,19	0,07	25,61	0,50-1,00
HEK 200	0,60	0,50	1,00	0,50	1,50	0,60	0,80	0,79	0,36	0,14	46,14	0,50-1,50
MEK 50	1,10	0,80	0,80	0,70	0,70	1,00	0,60	0,81	0,18	0,07	21,77	0,60-1,10
MEK 100	2,80	2,60	2,20	2,80	2,40	3,10	3,50	2,77	0,43	0,16	15,69	2,20-3,50
MEK 200	3,50	3,00	2,50	2,70	3,50	2,80	2,90	2,99	0,38	0,15	12,89	2,50-3,50
EK 50	1,40	1,70	1,80	1,40	1,70	1,90	1,30	1,60	0,23	0,09	14,43	1,30-1,90
EK 100	2,80	2,70	2,60	2,70	2,60	2,60	2,80	2,69	0,09	0,03	3,35	2,60-2,80
EK 200	3,50	4,50	4,00	3,40	3,60	4,60	3,80	3,91	0,48	0,18	12,20	3,40-4,60
DM1	1,40	1,00	1,10	1,50	1,30	1,60	1,60	1,36	0,24	0,09	17,47	1,00-1,60
DM1+FR	1,70	1,60	2,10	1,80	1,70	2,10	2,40	1,91	0,29	0,11	15,21	1,60-2,40
DM1+MEK50	3,00	5,90	3,30	3,50	4,80	3,50	4,20	4,03	1,02	0,39	25,38	3,00-5,90
DM1+MEK100	5,70	3,30	3,60	5,80	3,70	5,10	3,40	4,37	1,12	0,42	25,53	3,30-5,80
DM1+MEK200	2,70	2,80	1,80	2,40	3,00	2,00	2,30	2,43	0,43	0,16	17,90	1,80-3,00
DM1+EK50	5,00	4,00	4,50	6,30	3,70	3,80	5,20	4,64	0,93	0,35	20,08	3,70-6,30
DM1+EK100	2,50	2,80	2,60	3,50	2,60	3,00	2,60	2,80	0,35	0,13	12,54	2,50-3,50
DM1+EK200	3,00	3,70	3,10	4,20	3,00	3,50	5,80	3,76	1,00	0,38	26,65	3,00-5,80

Prilog 32. Koncentracija haptoglobina (g/L) u krvnoj plazmi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih ekstraktom kukureka (50, 100 ili 200 mg/kg TM) ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i ekstraktom

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR	0,26	0,30	0,42	0,25	0,35	0,29	0,31	0,31	0,06	0,02	18,67	0,25-0,42
MEK 50	0,51	1,15	1,10	0,69	2,04	1,19	0,90	1,08	0,49	0,19	45,37	0,51-2,04
MEK 100	1,65	2,04	1,45	1,06	0,74	0,80	1,05	1,26	0,48	0,18	37,95	0,74-2,04
MEK 200	2,25	4,00	3,23	3,50	3,14	1,90	1,91	2,85	0,83	0,31	29,10	1,90-4,00
EK 50	1,77	1,43	1,94	1,18	0,83	2,22	1,90	1,61	0,49	0,18	30,18	0,83-2,22
EK 100	3,38	1,89	3,82	2,70	3,39	2,85	2,75	2,97	0,63	0,24	21,17	1,89-3,82
EK 200	4,11	2,34	3,19	3,26	2,70	2,90	3,31	3,12	0,56	0,21	17,94	2,34-4,11
DM1	0,53	1,42	3,85	1,52	1,45	4,12	2,00	2,13	1,34	0,51	63,17	0,53-4,12
DM1+FR	0,49	0,91	0,57	1,86	0,54	0,56	1,20	0,88	0,50	0,19	57,66	0,49-1,86
DM1+MEK50	1,72	4,30	2,20	4,28	1,95	2,49	2,70	2,81	1,06	0,40	37,93	1,72-4,30
DM1+MEK100	3,59	0,64	1,83	0,88	2,92	2,30	2,20	2,05	1,05	0,40	51,20	0,64-3,59
DM1+MEK200	1,22	0,30	1,23	0,63	0,50	0,21	1,10	0,74	0,44	0,17	58,90	0,21-1,23
DM1+EK50	1,60	3,72	2,68	2,42	3,29	3,07	4,60	3,05	0,96	0,36	31,48	1,60-4,60
DM1+EK100	1,05	1,25	1,62	2,49	1,62	2,00	1,80	1,69	0,48	0,18	28,18	1,05-2,49
DM1+EK200	3,35	1,83	2,45	3,14	5,60	1,90	1,72	2,86	1,37	0,52	48,01	1,72-5,60

Prilog 33. Stepen fagocitoze neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih metanolnim i vodenim ekstraktom kukureka u dozi od 200 mg/kg TM ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i metanolnim i vodenim ekstraktom kukureka u dozi od 100 mg/kg TM

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR	51,07	52,48	40,26	36,42	35,61	45,12	44,82	43,68	2,51	6,65	15,21	35,61-52,48
MEK 200	95,09	93,29	93,91	96,01	85,14	90,76	89,43	91,95	1,43	3,79	4,12	85,14-96,01
EK 200	80,71	81,04	90,41	63,57	89,93	86,10	88,91	82,95	3,57	9,43	11,37	63,57-90,41
DM1	72,60	83,76	66,48	65,95	56,61	56,72	79,37	68,78	3,96	10,47	15,22	56,61-83,76
DM1+FR	86,65	86,12	64,23	64,84	86,66	87,96	90,57	81,00	4,29	11,35	14,01	64,23-90,57
DM1+MEK100	90,96	88,26	84,29	94,00	91,70	88,54	85,73	89,07	1,29	3,41	3,83	84,29-94,00
DM1+EK100	87,95	85,68	89,83	89,85	88,89	86,38	92,32	88,70	0,86	2,27	2,55	85,68-92,32

Prilog 34. Intenzitet oksidativnog praska neutrofilnih granulocita (%) u krvi pacova kontrolne grupe i grupa tretiranih metanolnim i vodenim ekstraktom kukureka u dozi od 200 mg/kg TM ili deksametazonom u kombinaciji sa FR i metanolnim i vodenim ekstraktom kukureka u dozi od 100 mg/kg TM

Tretman	Pacov							Statistički parametri				
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	SD	SE	CV%	IV
FR	37,15	42,00	20,28	28,48	24,73	32,01	42,45	32,44	3,23	8,53	26,30	20,28-42,45
MEK 200	79,76	71,56	71,36	54,47	50,09	77,62	59,47	66,33	4,40	11,63	17,54	50,09-79,76
EK 200	34,83	36,28	33,15	28,61	34,03	32,74	62,47	37,44	4,27	11,29	30,15	28,61-62,47
DM1	25,77	42,85	38,52	38,78	30,77	26,92	30,64	33,46	2,48	6,57	19,64	25,77-42,85
DM1+FR	61,85	59,76	25,63	25,49	64,81	62,32	68,13	52,57	7,04	18,64	35,45	25,49-68,13
DM1+MEK100	40,90	81,29	41,41	42,48	39,55	33,06	80,75	51,35	7,75	20,50	39,92	33,06-81,29
DM1+EK100	65,27	52,90	48,66	48,73	46,46	43,64	42,11	49,68	2,93	7,74	15,58	42,11-65,27

10. BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Vesna Davidović je rođena 25.05.1968. god. u Čačku, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju. Na Fakultetu veterinarske medicine (smer: Veterinarska medicina) Univerziteta u Beogradu je diplomirala 28.06.1999. godine sa prosečnom ocenom na studijama 8,95, a iste godine je upisala poslediplomske magistarske studije (smer: Morfologija i fiziologija životinja). Ispite predviđene nastavnim planom i programom je položila sa prosečnom ocenom 9,80, a magistarsku tezu odbranila 06.07.2006. godine na istom fakultetu.

Od 01.04.2000. godine je angažovana kao saradnik i asistent pripravnik, a od 21.12.2006. godine je zaposlena kao asistent (Uža naučna oblast: Anatomija i fiziologija domaćih i gajenih životinja) na Institutu za zootehniku, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.

U svom dosadašnjem radu je u saradnji sa drugim autorima objavila 74 rada, od čega 3 rada sa SCI liste i koautor je poglavlja u monografiji. Služi se engleskim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Vesna M. Davidović

Broj upisa -

Izjavljujem

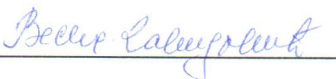
da je doktorska disertacija pod naslovom:

**UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. ET KIT.)
NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE
NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Vesna M. Davidović

Broj upisa -

Studijski program Odbranjena magistarska teza, smer Morfologija i fiziologija životinja

Naslov rada UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. *ET* KIT.) NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA

Mentor Prof. dr Miodrag Lazarević

Potpisana Vesna M. Davidović

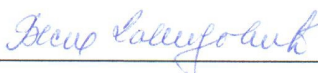
Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. ET KIT.)
NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE
NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

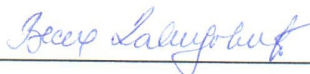
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Vesna M. Davidović

Broj upisa -

Izjavljujem

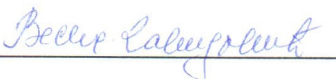
da je doktorska disertacija pod naslovom:

**UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. ET KIT.)
NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE
NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Vesna M. Davidović

Broj upisa -

Studijski program Odbranjena magistarska teza, smer Morfologija i fiziologija životinja

Naslov rada UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. *ET* KIT.) NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA

Mentor Prof. dr Miodrag Lazarević

Potpisana Vesna M. Davidović

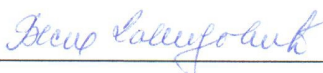
Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ SASTOJAKA KUKUREKA (*HELLEBORUS ODORUS* WALDST. ET KIT.)
NA HEMATOLOŠKE PARAMETRE, PROTEINE AKUTNE FAZE I FUNKCIJE
NEUTROFILNIH GRANULOCITA PACOVA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

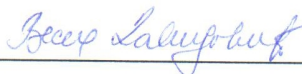
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 16.05. 2013. godine



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.