

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV TIMOLA NA MOTORIKO TANKEGA  
ČREVESA IN MATERNICE V RAZMERAH *IN VITRO***

**THE INFLUENCE OF THYMOL ON SMALL  
INTESTINAL AND UTERINE MOTILITY UNDER *IN  
VITRO* CONDITIONS**

Luka Prem

Ljubljana, 2017



UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 633.88+547.913:577.353:577.175.8:615.217.3:599.323.45(043.2)

**VPLIV TIMOLA NA MOTORIKO TANKEGA ČREVESA IN  
MATERNICE V RAZMERAH *IN VITRO***

**THE INFLUENCE OF THYMOL ON SMALL INTESTINAL  
AND UTERINE MOTILITY UNDER *IN VITRO* CONDITIONS**

Luka Prem

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Snoja in somentorstvom asist. dr. Blanke Premrov Bajuk na Enoti za farmakologijo in toksikologijo Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2017

## POVZETEK

Ključne besede: timol – farmakologija – terapevtska raba; acetilholin – farmakologija; serotonin – farmakologija; histamin – farmakologija; električna stimulacija; ileum – učinki zdravil; mišična kontrakcija – učinki zdravil; maternica, kontrakcija – učinki zdravil; *in vitro* tehnike; podgane

Timol je monoterpen, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus vulgaris*) in nekaterih drugih rastlin. Vpliv timola na motoriko črevesa in maternice ter mehanizem njegovega delovanja nista dobro poznana, pomembna pa sta s stališča morebitne uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim delovanjem. Namen dela je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na krčenje izoliranega ileuma in maternice, povzročeno z acetilholinom, serotoninom, histaminom oziroma z električno stimulacijo. Raziskavo smo izvajali s pomočjo sistema za delo z izoliranimi organi, pri katerem se izolirani organ nahaja v kivetu s prostornino 20 mL. Krčenje ileuma in maternice podgane smo izmerili po dodanih naraščajočih odmerkih navedenih mediatorjev oziroma po stimulaciji z električnim tokom. Dobljene rezultate smo primerjali s krčenji, ki so nastala ob sočasni prisotnosti timola in posameznih navedenih mediatorjev, oziroma ob stimulaciji z električnim tokom. Rezultati so pokazali, da odmerek 0,06 mg timola ni vplival na krčenje ileuma in maternice, povzročeno z acetilholinom, serotoninom, histaminom ali z električno stimulacijo. Odmerek 0,6 mg timola pa je tako pri ileumu kot pri maternici povzročil statistično značilno zmanjšanje krčenja, povzročeno z acetilholinom in serotoninom. Rezultati prikazujejo vpliv timola na krčenja ileuma in maternice.

## SUMMARY

Key words: thymol – pharmacology – therapeutic use; acetylcholine – pharmacology; serotonin – pharmacology; histamine – pharmacology; electrical stimulation; ileum – drug effects; muscle contraction – drug effects; uterine contraction – drug effects; *in vitro* techniques; rats

Thymol is a monoterpene which is found in essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) and some other plants. The impact of thymol on the intestinal and uterine motility and its mechanism of action are not well known yet, however these properties are important since thymol is a potential drug with spasmolytic activity. The aim of this study was to determine the effects of thymol on the ileal and uteri contractions caused by acetylcholine, serotonin, histamine or by electrical stimulation under *in vitro* conditions. The research was carried out using a system for work with isolated organs, in which the isolated organ is placed in a 20 mL chamber. The contractions were detected in isolated ileum and uterus after the treatment with increasing doses of mentioned mediators or after the stimulation with electric current. The obtained results were compared to the contractions that occurred when isolated organs were simultaneously treated with thymol and mentioned mediators or electric current. The results show that a dose of 0.06 mg of thymol did not affect ileal and uteri contractions caused by acetylcholine, serotonin, histamine or with electrical stimulation. Thymol in a dose of 0.6 mg caused significantly lower acetylcholine and serotonin contractions in both ileum and uterus. The results demonstrate the influence of thymol on the contractions of the isolated ileum and uterus.

## KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED LITERATURE .....	2
2.1 TIMOL .....	2
2.2 STRUKTURA IN DELOVANJE GLADKIH MIŠIČNIH CELIC.....	3
2.2.1 Struktura gladkih mišičnih celic.....	3
2.2.2 Dejavniki, ki povzročijo krčenje gladke mišične celice.....	4
2.2.3 Mehanizem krčenja gladke mišične celice .....	6
2.3 VLOGA ACh PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC .....	6
2.4 VLOGA 5-HT PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC .....	7
2.5 VLOGA HISTAMINA PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC .....	8
2.6 STIMULACIJA KRČENJA GLADKIH MIŠIČNIH CELIC Z ELEKTRIČNIM TOKOM.....	8
3 MATERIAL IN METODE.....	9
3.1 MATERIAL .....	9
3.1.1 Živali in potek izolacije organov .....	9
3.1.2 Priprava raztopin .....	9
3.1.2.1 Priprava Tyrodejeve raztopine .....	9
3.1.2.2 Priprava Jalnove raztopine .....	10
3.1.2.3 Priprava raztopin timola .....	10
3.1.2.4 Priprava raztopin ACh.....	11
3.1.2.5 Priprava raztopin 5-HT.....	11
3.1.2.6 Priprava raztopin histamina.....	12
3.2 METODE .....	12
3.2.1 Sistem za delo z izoliranimi organi .....	12
3.2.2 Poskus na izoliranih organih .....	13
3.2.2.1 Potek poskusa na splošno.....	13
3.2.2.2 Potek poskusa z ACh.....	13
3.2.2.3 Potek poskusa s 5-HT.....	14
3.2.2.4 Potek poskusa s histaminom.....	15
3.2.2.5 Potek poskusa s stimulacijo z električnim tokom.....	15
3.2.3 Statistična analiza.....	16

4 REZULTATI .....	17
4.1 REZULTATI POSKUSOV NA IZOLIRANEM ILEUMU.....	17
4.1.1 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh	17
4.1.2 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) in ACh .	18
4.1.3 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5-HT .....	19
4.1.4 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT	20
4.1.5 Krčenje ileuma, povzročeno s histaminom .....	21
4.1.6 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom .....	21
4.2 REZULTATI POSKUSOV NA IZOLIRANI MATERNICI.....	22
4.2.1 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh .....	22
4.2.2 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) in ACh .....	23
4.2.3 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5- HT .....	24
4.2.4 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT .....	25
4.2.5 Krčenje maternice, povzročeno s histaminom.....	26
4.2.6 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom .....	26
5 RAZPRAVA.....	28
5.1 VPLIV TIMOLA NA KRČENJE ILEUMA.....	28
5.2 VPLIV TIMOLA NA KRČENJE MATERNICE .....	31
6 SKLEPI.....	33
7 ZAHVALA.....	34
8 LITERATURA .....	35

## KAZALO SLIK

Slika 1. Krčenje ileuma (N = 7), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh.....	17
Slika 2. Krčenje ileuma (N = 10), povzročeno z ACh in kombinacijo timola in ACh.....	18
Slika 3. Krčenje ileuma (N = 6), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT.....	19
Slika 4. Krčenje ileuma (N = 9), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT.....	20
Slika 5. Krčenje ileuma (N = 10), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom.....	21
Slika 6. Krčenje maternice (N = 6), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh.....	22
Slika 7. Krčenje maternice (N = 7), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh.....	23
Slika 8. Krčenje maternice (N = 6), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT.....	24
Slika 9. Krčenje maternice (N = 7), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT.....	25
Slika 10. Krčenje maternice (N = 7), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom.....	26



## KAZALO TABEL

Tabela 1. Sestava Tyrodejeve raztopine (povzeto po Kobal in Skubic, 1987).....	10
Tabela 2. Sestava Jalnove raztopine (povzeto po Kobal in Skubic, 1987).....	10
Tabela 3. Priprava raztopin timola .....	11
Tabela 4. Priprava raztopin ACh .....	11
Tabela 5. Priprava raztopin 5-HT .....	12
Tabela 6. Priprava raztopin histamina .....	12
Tabela 7. Potek poskusa z ACh .....	14
Tabela 8. Potek poskusa s 5-HT .....	15
Tabela 9. Potek poskusa s histaminom.....	15
Tabela 10. Potek poskusa s stimulacijo z električnim tokom.....	16

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

5-HT	5-hidroksitriptamin; 5-hydroxytryptamine
ACh	acetilholin; acetylcholine
DAG	diacilglicerol; diacylglycerol
ED <sub>50</sub>	srednji efektivni odmerek; median effective dose
IP3	inozitol 1,4,5-trifosfat; inositol 1,4,5-trisphosphate

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Timol je monociklični monoterpen, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus vulgaris*) in nekaterih drugih rastlin. Zdravilni učinki ekstraktov timijana so najverjetneje povezani prav z delovanjem timola. Tako je opisano protibakterijsko, protiglivično in protiparazitarno delovanje timola, imel naj bi tudi antioksidativne, protivnetne, spazmolitične in še nekatere druge učinke. Učinek timola na motoriko črevesa in maternice ter mehanizem njegovega delovanja nista dobro poznana, pomembna pa sta s stališča morebitne uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim in relaksantnim delovanjem.

### 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen našega dela je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na krčenje izoliranega tankega črevesa (ileuma) in maternice, povzročeno z nekaterimi endogenimi mediatorji: acetilholinom (ACh), serotoninom ali 5-hidroksitriptaminom (5-HT), histaminom oziroma z električno stimulacijo. Raziskavo smo opravili s pomočjo sistema za delo z izoliranimi organi. V ta namen smo v razmerah *in vitro* na izoliranem ileumu in maternici podgan ugotavljali krčenje obeh organov po dodanih naraščajočih odmerkih navedenih endogenih mediatorjev oziroma po stimulaciji z električnim tokom različnih napetosti. Primerjali smo jih s krčenji, ki so nastala ob sočasni prisotnosti timola in posameznih navedenih endogenih mediatorjev, oziroma ob izvajanju stimulacije z električnim tokom. Na ta način smo želeli ugotoviti morebitni vpliv timola na krčenje ileuma in maternice.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pri našem delu smo postavili sledeče hipoteze:

- timol v razmerah *in vitro* zmanjša krčenje ileuma, povzročeno z ACh, 5-HT, histaminom in električno stimulacijo;
- timol v razmerah *in vitro* zmanjša krčenje maternice, povzročeno z ACh; 5-HT, histaminom in električno stimulacijo.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 TIMOL

V številnih rastlinah se kot produkt njihove presnove nahajajo različne bioaktivne snovi, med katerimi so najpogostejše hlapne in nehlapne fenolne spojine. Med nehlapne spojine spadajo fenolne kisline, flavonoidi in tanini, hlapne fenolne spojine pa so različni terpeni, med katere sodita tudi timol in njegov izomer karvakrol (Marchese in sod., 2016).

Terpeni so velika skupina naravnih ogljikovodikov, ki so pogosto prisotni v višjih rastlinah kot sestavni del eteričnih olj. Temeljna gradbena enota terpenov je izoprenska enota (2-metil-1,3-butadien) (Nagle in sod., 2013). Timol spada v skupino monocikličnih monoterpenov (Vogt-Eisele in sod., 2007). Njegova kemijska formula je  $C_{10}H_{14}O$ , po nomenklaturi Mednarodnega združenja za čisto in uporabno kemijo (IUPAC) je poimenovan kot 5-metil-2-(1-metiletil) fenol. Njegova molekulska masa je 150,21. Sestavljen je iz 79,95 % ogljika, 9,39 % vodika in 10,65 % kisika (Nagle in sod., 2013). V čisti obliki je timol v vodi slabo topna kristalinična snov, ostrega in aromatičnega vonja (Sciencelab.com, 2013). V rastlinah je timola največ v ajovanu (*Trachyspermum ammi*) in timijanu (*Thymus vulgaris*). Olje, pridobljeno iz ajovana, ga vsebuje 35-60 %, v olju timijana pa ga je 30-40 %. Prisotnost timola so dokazali tudi v rastlinah *Baccharis grisebachii*, *Centipeda minima*, *Inula cuspidata* in *Arnica montana* (Nagle in sod., 2013).

Timol se po zaužitju hitro absorbira iz prebavnega trakta in se že v 24 urah z urinom izloči iz organizma. Večinoma se izloča v nespremenjeni obliki in v obliki glukuronatov ter sulfatov. Le v majhnih količinah se izloči v obliki hidroksiliranih produktov (Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie, 2010).

Pri ugotavljanju akutne toksičnosti timola po peroralni aplikaciji je srednja letalna doza ( $LD_{50}$ ) za podgano 980 mg/kg, za miš 640 mg/kg in za budro 880 mg/kg. *In vitro* študije na človeških in živalskih celicah kot tudi poskusi na živalih so pokazali, da deluje citotoksično (Marchese in sod., 2016). Ob stiku s kožo ali sluznicami deluje dražilno. Dolgotrajna izpostavljenost povzroči spremembe na sluznicah, jetrih, ledvicah in osrednjem živčevju (Sciencelab.com, 2013).

Timol se uporablja v kozmetičnih pripravkih, kot sestavina dišav ali kot konzervans, kot sestavina zdravil za inhalacijo in pri proizvodnji različnih insekticidnih ter fungicidnih pripravkov (Marchese in sod., 2016; Shakeri in Boskabady, 2015).

Timolu in njegovim derivatom se pripisuje številne farmakološke učinke. Znižuje koncentracijo maščob v krvi, deluje kot antioksidant, ima protivnetno delovanje in znižuje krvni pritisk. Deluje protiglivično, protibakterijsko, protiparazitarno in insekticidno. Baktericidno deluje tudi na bakterije, odporne na antibiotike. Pripisuje se mu tudi spermicidno in abortivno delovanje ter ima negativen vpliv na rast tumorjev. Nevtralizira aflatoksine in ima depigmentacijsko aktivnost (Nagle in sod., 2013). Širi dihalne poti in zmanjšuje motoriko črevesja (Shakeri in Boskabady, 2015). V poskusih *in vitro* je bilo ugotovljeno, da povzroča sproščanje gladke mišičnine dihal in prebavil (Meister in sod., 1999). Babaei in sod. (2008) so s pomočjo izoliranega tankega črevesa morskih prašičkov dokazali vpliv ekstrakta timijana (*Thymus vulgaris*) na zmanjšanje intenzivnosti spontanega krčenja tankega črevesa. Tamura in Iwamoto (2004) sta v poskusu ugotovila, da je timol zmanjšal krčenja izoliranih skeletnih mišičnih vlaken. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Begrow in sod. (2010), ki opisujejo relaksantno delovanje timola na gladke mišične celice.

Mehanizem farmakološkega delovanja timola ni povsem pojasnjen. Beer in sod. (2007) navajajo, da timol kot agonist  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  in  $\beta$  adrenergičnih receptorjev povzroči zmanjšano motoriko želodčne stene. Meister in sod. (1999) pa predvidevajo, da timol deluje na muskarinske receptorje gladkih mišičnih celic in na ta način zmanjša napetost stene tankega črevesa oziroma širi dihalne poti.

## 2.2 STRUKTURA IN DELOVANJE GLADKIH MIŠIČNIH CELIC

### 2.2.1 Struktura gladkih mišičnih celic

Gladka mišičnina je sestavljena iz podolgovatih in vretenastih celic, ki ležijo tesno druga poleg druge. Tkivo je specializirano za krčenje in je prisotno v mišični plasti krvnih in limfnih žil, prebavne cevi, sapnika, sapnic, sečil in spolovil, v kapsuli vranice, v očesu ter v koži. Vretenasta gladka mišična celica vsebuje v svojem razširjenem delu podolgovato jedro. Dolžina posameznih celic variira med 15 in 80  $\mu\text{m}$ , v maternici med gravidnostjo pa znaša tudi do 500  $\mu\text{m}$ . V skrčenem stanju je gladka mišična celica krajša in debelejša, v sproščenem tanjša in daljša. Vsako posamezno celico obdajajo bazalna lamina in retikulinska vlakna. Z

elektronskim mikroskopom se v citoplazmi poleg ostalih organel vidi tudi miofilamente, ki so v glavnem razporejeni z vzdolžno osjo celice. Pri krčenju sodelujeta dva tipa filamentov: tanki in debeli. Ločimo dva tipa gladkih mišičnih celic. Večnotne gladke mišične celice (ang. *multi-unit cells*), ki se nahajajo na primer v šarenici, ležijo tesno druga ob drugi in omogočajo precizne gibe. Visceralne gladke mišične celice so enoenotne (ang. *single-unit cells*) in se nahajajo v steni votlih organov. Celice med seboj povezujejo presledkovni stiki. So manj intenzivno oživčene kot večnotne celice in delujejo kot funkcionalni sincicij. Živčna vlakna s posameznimi gladkimi mišičnimi celicami tvorijo sinapse (Zorc, 2012).

Gladke mišične celice oživčuje avtonomno živčevje. Živčna vlakna se najpogosteje končujejo z razširitvami aksona v vezivu endomizija. V razširitvah so drobni vezikli, v katerih je ACh (parasimpatično živčevje) ali noradrenalin (simpaticično živčevje). Iz njih se dražljaj prenese preko endomizijskega veziva do gladkih mišičnih celic. Pri visceralnih gladkih mišičnih celicah (funkcionalni sincicij) poteka dražljaj iz celice na celico neposredno preko presledkovnih stikov (Zorc, 2012).

Poleg avtonomnega živčevja krčenje gladkih mišic regulirajo tudi nekateri hormoni in parakrini dejavniki, nanje pa vplivajo tudi številne zunanje snovi (Webb, 2003).

Črevesje oživčuje parasimpatično in simpaticično živčevje. Parasimpatično živčevje spodbuja peristaltiko, zavira mišične sfinktre ter sodeluje pri delovanju žlez. Simpaticični živčni sistem peristaltiko zavira in aktivira mišične sfinktre. Poleg zunanjega ima črevo tudi notranje oživčenje. Črevesni živčni sistem tvorita submukozni (Meissnerjev) in mienterični (Auerbachov) živčni pletež. Oba pleteža imata nekaj senzoričnih nevronov, ki sprejemajo informacije iz živčnih končičev. Ti nevroni so lahko kemoreceptorji (sprejemajo informacije o kemični sestavi črevesne vsebine) ali mehanoreceptorji (sprejemajo podatke o stopnji ekspanzije črevesne stene) (Zorc-Pleskovič, 2012).

## **2.2.2 Dejavniki, ki povzročijo krčenje gladke mišične celice**

Za razliko od skeletnih mišičnih celic, pri katerih povzročajo krčenje le motorna živčna vlakna, obstaja pri gladkih mišičnih celicah več vrst dražljajev: avtonomno živčevje, hormoni in druge endogene snovi. Gladke mišične celice imajo v svoji membrani različne receptorje, preko katerih endogeni mediatorji sprožijo proces krčenja. Obstajajo pa tudi receptorji, preko katerih se krčenje zavre (Guyton in Hall, 2006).

Najpomembnejša prenašalca, ki se sintetizirata v avtonomnem živčevju, sta ACh in noradrenalin. ACh deluje na gladke mišične celice v nekaterih organih kot vzburljivi prenašalec, v drugih organih pa kot zaviralni prenašalec. Ko ACh stimulira krčenje mišičnega vlakna, ga noradrenalin zavira in obratno, ko ga noradrenalin stimulira, ga ACh zavre. Oba delujeta tako, da se vežeta na specifične receptorje, ki se nahajajo v membrani mišične celice. Tip receptorja torej določa, ali se bo gladka mišična celica skrčila ali relaksirala (Guyton in Hall, 2006).

Verjetno je polovica vseh krčenj gladkih mišičnih celic pod vplivom stimulirajočih dejavnikov, ki delujejo direktno na kontraktilni sistem mišične celice, brez vpliva živčevja. Poznamo dva tipa takih dejavnikov: lokalne tkivne kemične dejavnike in različne hormone (Guyton in Hall, 2006).

Številni hormoni lahko do neke stopnje povzročijo krčenje gladke mišične celice. Hormon lahko povzroči krčenje, kadar membrana mišične celice vsebuje specifične stimulirajoče, od hormonov odvisne receptorje. Nasprotno pa lahko hormon zavre krčenje, če membrana vsebuje zaviralne receptorje (Guyton in Hall, 2006).

Nekateri hormonski receptorji odprejo natrijeve ali kalcijeve ionske kanalčke v membrani gladkih mišičnih celic, kar privede do depolarizacije membrane, enako kot po stimulaciji mišične celice preko nevrona. Do zaviranja krčenja pa pride, ko hormon zapre natrijeve in kalcijeve kanalčke ter s tem prepreči vstop pozitivnih ionov v celico. To se zgodi tudi, če se običajno zaprti kalijeve kanalčki odprejo in je omogočen transport  $K^+$  iz celice. V obeh primerih naraste negativni naboj znotraj celice, gre za stanje t.i. hiperpolarizacije, ki krčenje močno zavira (Guyton in Hall, 2006).

Hormoni tudi lahko aktivirajo določen membranski receptor, ki povzroči spremembo znotraj celice, na primer, da se sprost  $Ca^{2+}$  iz znotrajceličnega sarkoplazemskega retikuluma. Za inhibicijo krčenja pa so zadolženi drugi receptorski mehanizmi, ki v celični membrani aktivirajo encim adenilat ciklazo ali gvanilat ciklazo. To privede do nastanka sekundarnih glasnikov, cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) ali cikličnega gvanizin monofosfata (cGMP). Oba sprožita vrsto učinkov, med drugim tudi spremenita stopnjo fosforilacije nekaterih encimov, ki posredno zavirajo krčenje. Pri tem se črpalka, ki transportira  $Ca^{2+}$  iz sarkoplazme v sarkoplazemski retikulum aktivira, prav tako se aktivira črpalka v celični

membrani, ki pošilja  $\text{Ca}^{2+}$  iz same celice. To povzroči padec koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v celici in posledično zavre krčenje (Guyton in Hall, 2006).

Gladke mišične celice imajo torej različne mehanizme za nastanek in inhibicijo krčenja, ki ga povzročijo različni hormoni, parakrini dejavniki, nevrottransmitorji in druge snovi. V nekaterih primerih lahko ista substanca povzroči bodisi krčenje bodisi sproščanje, odvisno od lokacije tarčnih celic v organizmu. Noradrenalin, na primer, zavira krčenje gladkih mišičnih celic v črevesju, povzroča pa krčenje stene krvnih žil (Guyton in Hall, 2006).

### **2.2.3 Mehanizem krčenja gladke mišične celice**

Različni agonisti (nevrottransmitorji, hormoni) se vežejo na specifične receptorje v membrani gladke mišične celice, s čimer se začne proces krčenja. Vezava agonista na receptor, ki je sklopljen s proteinom G, povzroči aktivacijo fosfolipaze C, ki s svojim delovanjem na membranski lipid fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat, privede do nastanka dveh sekundarnih glasnikov: diacilglicerola (DAG) in inozitol 1,4,5-trifosfata (IP3). IP3 se veže na specifične receptorje sarkoplazemskega retikuluma in povzroči sprostitvev znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . DAG skupaj s  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira protein kinazo C (PKC), ki fosforilira specifične tarčne proteine.  $\text{Ca}^{2+}$  se veže na kalmodulin, kar privede do aktivacije miozin kinaze, ki fosforilira lahko verigo miozina in v povezavi z aktinom (nastane prečni mostiček) povzroči skrajšanje gladke mišične celice (Webb, 2003).

Sprostitev gladkih mišičnih celic nastopi kot posledica odstranitve dejavnikov, ki povzročajo krčenje, ali kot posledica direktne prisotnosti snovi, ki zavirajo procese krčenja. Pri sproščanju se zniža znotraj celična koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  in poveča aktivnost miozin fosfataze. Sarkoplazemski retikulum in celična membrana vsebujeta Ca,Mg-ATP-aze, ki odstranijo  $\text{Ca}^{2+}$  iz citosola.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjevalci se prav tako nahajajo v plazemski membrani in imajo vlogo pri zmanjševanju koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . Med relaksacijo se napetostno in od liganda odvisni  $\text{Ca}^{2+}$  kanalčki zaprejo, kar zmanjša vstop  $\text{Ca}^{2+}$  v samo celico (Webb, 2003).

## **2.3 VLOGA ACh PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC**

ACh je nevrottransmitor v preganglijskem delu simpatičnega in v celotnem parasimpatičnem živčnem sistemu. Sodeluje pri regulaciji številnih procesov v različnih organskih sistemih (Tobin in sod., 2009). V nevronih se sintetizira s pomočjo encima holin acetiltransferaze iz acetil koencima A in holina. Iz citoplazme nato s pomočjo vezikularnega prenašalca prehaja v



sinaptične vezikle. Po sprostitvi v sinaptično režo se veže na holinergične receptorje postsinaptičnega nevrona. ACh esteraza ga nato hitro razgradi oz. hidrolizira v acetat in holin (Augustine, 2004).

ACh učinkuje na dve vrsti receptorjev, na nikotinske in muskarinske. Nikotinski receptorji delujejo kot ionski kanalčki, muskarinski pa so z G proteinom sklopljeni receptorji (Augustine, 2004).

Poznamo pet različnih podtipov muskarinskih receptorjev ( $M_1$ - $M_5$ ), od teh sta v prebavnem sistemu pri ljudeh funkcionalno najpomembnejša  $M_2$  in  $M_3$ . Razmerje med receptorji  $M_2$  in  $M_3$  je 4:1. Raziskave na glodavcih in psih so pokazale, da imajo receptorji  $M_3$  prevladujočo vlogo pri holinergični stimulaciji želodčno-črevesne gibljivosti (Abrams in sod., 2006).

ACh povzroči krčenje gladkih mišičnih celic želodca in črevesja preko muskarinskih receptorjev. Muskarinski receptorji  $M_3$  imajo pri prenosu te aktivnosti glavno vlogo. V gladkih mišičnih celicah prebavil se nahajajo tudi receptorji  $M_2$ , ki so na splošno bolj številčni od receptorjev  $M_3$ , imajo pa pri stimulaciji krčenja funkcionalno manjšo vlogo (Unno in sod., 2005).

V gladkih mišičnih celicah ileuma podgane se nahajajo receptorji  $M_2$  in  $M_3$ , prvi pa predstavlja 80 % skupnega števila receptorjev (Griffin in Ehlert, 1992).

V gladkih mišičnih celicah maternice podgane so prav tako prisotni receptorji  $M_2$  in  $M_3$ , vendar imajo le slednji vlogo pri nastanku krčenja (Munns in Pennefather, 1998).

#### 2.4 VLOGA 5-HT PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC

5-HT je monoaminski nevrottransmitor, ki nastaja v osrednjem živčevju, poleg tega pa tudi v prebavnem traktu, trombocitih in mastocitih. Kot nevrottransmitor igra pomembno vlogo v mehanizmih, povezanih s počutjem (Oh in sod., 2014).

5-HT se sintetizira iz esencialne aminokislina triptofana. Sinteza poteka v dveh korakih, pri njej sodelujeta encima triptofan hidroksilaza in dekarboksilaza (Augustine, 2004).

Približno 90 % celotnega 5-HT v organizmu nastane v enterokromafinih celicah črevesja, kjer ima pomembno vlogo pri regulaciji motorike prebavil. Receptorji 5-HT so razdeljeni v sedem osnovnih podtipov, od teh jih je pet prisotnih v živčnem sistemu črevesja, enterokromafinih celicah in gladki muskulaturi prebavil. To so: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> in 5-HT<sub>7</sub> (Oh,

2014). Vsi, razen receptorja 5-HT<sub>3</sub>, ki je od liganda odvisen ionski kanalček, so receptorji sklopljeni s proteinom G (Hoyer in sod., 2002). V prebavnem sistemu 5-HT z vezavo na specifične receptorje sodeluje pri regulaciji motorike prebavil in sekrecije žlez (Oh in sod., 2014).

5-HT povzroči krčenje gladkih mišičnih celic maternice preko receptorjev 5-HT<sub>2</sub>. Krčenje maternice podgan je odvisno od faze spolnega ciklusa, verjetno zaradi estrogensko-odvisnega mehanizma (Killam in Cohen, 1994). Krčenje je večje med fazo estrusa (Ichida in sod., 1984).

## 2.5 VLOGA HISTAMINA PRI KRČENJU GLADKIH MIŠIČNIH CELIC

Histamin je pomemben kratko delujoči endogeni amin, ki je vpleten v številne fiziološke in patofiziološke mehanizme. Prisoten je v skoraj vseh telesnih organih, nastaja iz histidina s pomočjo encima histidin dekarboksilaza. Shranjen je v granulah mastocitov in bazofilnih levkocitov, ki predstavljajo glavni rezervoar histamina. Enterokromafine celice, histaminergični nevroni, limfociti, monociti, trombociti in nevtrofilni granulociti prav tako vsebujejo histidin dekarboksilazo in so sposobni histamin tvoriti, ne pa ga tudi shranjevati. Histamin se veže in aktivira štiri različne histaminske receptorje, ki so označeni kot H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub> (Deiteren in sod., 2015).

Na gladkih mišičnih celicah črevesja se nahajajo receptorji H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub>. Aktivacija receptorjev H<sub>1</sub> povzroča krčenje, aktivacija receptorjev H<sub>2</sub> pa relaksacijo. Zaradi prevladujočega vpliva receptorjev H<sub>1</sub> je končni učinek delovanja histamina na črevesje krčenje (Hansen, 2003). Po poročanju nekaterih avtorjev histamin pri podganah minimalno stimulira motoriko prebavil (Sakai in sod., 1979; Aguilar in sod., 1986).

## 2.6 STIMULACIJA KRČENJA GLADKIH MIŠIČNIH CELIC Z ELEKTRIČNIM TOKOM

V eksperimentalnih pogojih lahko na izoliranem organu krčenje povzročimo z električnim tokom. Ob tem pride do sproščanja ACh iz živčnih končičev holineričnih nevronov. ACh nato preko aktivacije muskarinskih receptorjev povzroči krčenje gladke mišične celice. Aktivacija receptorjev sproži znotrajcelične mehanizme, ki vodijo do povečanja koncentracije Ca<sup>2+</sup> v citosolu, kar nato posledično povzroči nastanek krčenja gladke mišične celice (Unno in sod., 2006).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Živali in potek izolacije organov

Poskus je potekal na izoliranih ileumih in maternicah štiri do šest mesecev starih podganjih samic pasme Wistar. Uporabili smo organe sedemnajstih živali. Podgane so bile kupljene pri odobrenem dobavitelju laboratorijskih živali Harlan Laboratories (San Pietro Al Natisone, Italija). Nastanjene so bile v polipropilenskih kletkah (dimenzije 66 x 40 x 20 cm), po pet do osem živali na kletko. Izpostavljene so bile dnevno-nočnemu režimu svetlobe in teme (12/12 ur), krmljenje so bile *ad libitum* s komercialno krmo v obliki briketov, prav tako so imele prost dostop do vode. Podgane so bile prvotno kupljene z namenom, da se uporabijo za izvajanje študijskega programa na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Kot je navedeno v dovoljenju za izvajanje poskusov na živalih št. U34401-31/2014/4 je bilo potrebno živali po izvedbi študijskega programa evtanazirati. Vsi, v naši raziskavi uporabljeni organi, so bili odvzeti podganam, ki so bile po zaključku izvajanja študijskega programa namenjene evtanaziji. V času izvajanja študijskega programa živali niso prejemale zdravil, niti niso imele spremenjenega režima oskrbe in nastanitve. Neposredno po evtanaziji z ogljikovim dioksidom in izkrvavitvijo smo s škarjami prerezali trebušno steno, odvzeli 4 cm dolg odsek ileuma in ga preprali s Tyrodejevo raztopino. Nato smo odvzeli še 2 cm dolg odsek vsakega roga maternice in ga do začetka poskusa shranili v Jalnovi raztopini.

##### 3.1.2 Priprava raztopin

###### 3.1.2.1 Priprava Tyrodejeve raztopine

Za pripravo Tyrodejeve raztopine smo uporabili NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), CaCl<sub>2</sub> (Fluka Chemie Ag, Buchs, Švica), MgCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), NaHCO<sub>3</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in glukozo (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Navedene snovi smo s tehtnico Exacta 1200 EB (Alba, Vojnik, Slovenija) natehtali v količinah, kot je navedeno v Tabeli 1. Natehtanim snovem smo do enega litra dodali dvakrat destilirano vodo, ki smo jo pripravili z destilatorjem BDV-4 (Kambič, Semič, Slovenija). Po dodajanju vode smo raztopino 20 minut (na 600 obratih) mešali s pomočjo magnetnega mešalca Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Tabela 1. Sestava Tyrodejeve raztopine (povzeto po Kobal in Skubic, 1987)

*Table 1. Composition of Tyrode's solution (adapted from Kobal and Skubic, 1987)*

Kemikalija	Koncentracija (g/L)
NaCl	8,00
CaCl <sub>2</sub>	0,20
MgCl <sub>2</sub>	0,10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05
NaHCO <sub>3</sub>	1,00
KCl	0,20
glukoza	1,00

### 3.1.2.2 Priprava Jalnove raztopine

Za pripravo Jalnove raztopine smo uporabili NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA), NaHCO<sub>3</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), CaCl<sub>2</sub> (Fluka Chemie Ag, Buchs, Švica) in glukozo (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Navedene snovi smo s tehtnico Exacta 1200 EB (Alba, Vojnik, Slovenija) natehtali v količinah, kot je navedeno v Tabeli 2. Natehtanim snovem smo do enega litra dodali dvakrat destilirano vodo, ki smo jo pripravili z destilatorjem BDV-4 (Kambič, Semič, Slovenija). Po dodajanju vode, smo raztopino 20 minut (na 600 obratih) mešali s pomočjo magnetnega mešalca Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Tabela 2. Sestava Jalnove raztopine (povzeto po Kobal in Skubic, 1987)

*Table 2. Composition of Jalen's solution (adapted from Kobal and Skubic, 1987)*

Kemikalija	Koncentracija (g/L)
NaCl	8,00
KCl	0,20
NaHCO <sub>3</sub>	1,00
CaCl <sub>2</sub>	0,20
glukoza	1,00

### 3.1.2.3 Priprava raztopin timola

Z elektronsko tehtnico ER-182A (A&D Company, Tokio, Japonska) smo natehtali 0,500 g timola (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). V nadaljevanju smo timol raztopili v 10 mL etanola (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo označili kot Timol RAZTOPINA 50,0 mg/mL.

Tabela 3. Priprava raztopin timola

*Table 3. Preparation of thymol solutions*

Priprava raztopin	Delovno ime raztopine	Koncentracija timola v pripravljeni raztopini
1 mL Timol RAZTOPINA + Jalnova raztopina do 50 mL	Timol II	1,0 mg/mL
2 mL Timol II + Jalnova raztopina do 20 mL	Timol I	0,1 mg/mL

#### 3.1.2.4 Priprava raztopin ACh

Uporabili smo ACh v obliki jodida (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Za tehtanje učinkovine smo uporabili elektronsko tehtnico ER-182A (A&D Company, Tokio, Japonska).

Tabela 4. Priprava raztopin ACh

*Table 4. Preparation of ACh solutions*

Mešanje raztopin	Delovno ime raztopine	Koncentracija ACh v pripravljeni raztopini
0,050 g ACh + Jalnova raztopina do 50 mL	ACh IV	1,0 mg/mL
2 ml ACh IV + Jalnova raztopina do 20 mL	ACh III	0,1 mg/mL
2 ml ACh III + Jalnova raztopina do 20 mL	ACh II	0,01 mg/mL
2 ml ACh II + Jalnova raztopina do 20 mL	ACh I	0,001 mg/mL

Legenda: ACh - acetilholin      *Legend: ACh - acetylcholine*

#### 3.1.2.5 Priprava raztopin 5-HT

Uporabili smo 5-HT v obliki kreatinin sulfat monohidrata (Acros Organics, New Jersey, ZDA). Za tehtanje učinkovine smo uporabili elektronsko tehtnico ER-182A (A&D Company, Tokio, Japonska).

Tabela 5. Priprava raztopin 5-HT

*Table 5. Preparation of 5-HT solutions*

Priprava raztopin	Delovno ime raztopine	Koncentracija 5-HT v pripravljeni raztopini
0,025 g 5-HT + Jalnova raztopina do 25 mL	5-HT IV	1,0 mg/mL
2 mL 5-HT IV + Jalnova raztopina do 20 mL	5-HT III	0,1 mg/mL
2 mL 5-HT III + Jalnova raztopina do 20 mL	5-HT II	0,01 mg/mL
2 mL 5-HT II + Jalnova raztopina do 20 mL	5-HT I	0,001 mg/mL

Legenda: 5-HT - 5-hidroksitriptamin      *Legend: 5-HT - 5-hydroxytryptamine*

### 3.1.2.6 Priprava raztopin histamina

Z elektronsko tehtnico ER-182A (A&D Company, Tokio, Japonska) smo natehtali histamin (H) (Serva, Heidelberg, Nemčija).

Tabela 6. Priprava raztopin histamina

*Table 6. Preparation of histamine solutions*

Priprava raztopin	Delovno ime raztopine	Koncentracija H v pripravljeni raztopini
0,050 g H + Jalnova raztopina do 50 mL	H IV	1,0 mg/mL
2 mL H IV + Jalnova raztopina do 20 mL	H III	0,1 mg/mL
2 mL H III + Jalnova raztopina do 20 mL	H II	0,01 mg/mL
2 mL H II + Jalnova raztopina do 20 mL	H I	0,001 mg/mL

Legenda: H - histamin      *Legend: H - histamine*

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Sistem za delo z izoliranimi organi

Poskus na organih je potekal na dvokanalnem programsko reguliranem sistemu za delo z izoliranimi organi (Elunit, Beograd, Srbija). Sistem sestavlja vodna kopel s prostornino 20 litrov, v katero sta nameščena grelnik in termostat, ki omogočata ohranjanje konstantne temperature, v našem primeru 37 °C. V kopel sta vstavljeni tudi dve kivetki s prostornino 20 mL, ki imata preko sistema cevi urejen dotok in odtok tekočin ter dotok plinov. Dotok in odtok se regulirata z računalniško vodenimi ventili. V vsako kiveto se namesti izolirani organ,

ki se ga poveže z mehansko električnim pretvornikom. V kivetu se nahajata tudi elektrodi, ki omogočata stimulacijo organa z električnim tokom. Mehansko-električni pretvornik analogni signal pretvori v digitalnega. Signal se ojača na dvokanalnem ojačevalcu. Z računalniškim programom eLabs (Elunit, Beograd, Srbija) se krmili potek poskusa, poleg tega pa omogoča tudi prikaz in analizo rezultatov.

### **3.2.2 Poskus na izoliranih organih**

#### **3.2.2.1 Potek poskusa na splošno**

Izolirani ileum dolžine 2 cm smo namestili v kiveto sistema za delo z izoliranimi organi. Organ je bil v kivetu potopljen v Tyrodejevo raztopino s temperaturo 37 °C, ki je bila oskrbovana z mešanico plinov (95 % O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub>). Poskus z izolirano maternico je potekal v enakih pogojih, le da smo namesto Tyrodejeve uporabili Jalnovo raztopino. Poskus smo izvedli z dodajanjem učinkovin, ki povzročijo krčenje gladke mišičnine (ACh, 5-HT, histamin) in z električno stimulacijo. Vpliv timola na kontrakcijo ileuma in maternice smo proučevali tako, da smo ga k izoliranemu organu v kivetu dodali pol minute pred učinkovinami, ki povzročijo krčenje gladkih mišičnih celic. Poskusi so potekali po sledečem protokolu:

- posamično dodajanje čedalje večjih odmerkov učinkovine, ki povzroči krčenje gladkih mišičnih celic (*dose-response*) in registracija krčenja (dvakratno izpiranje izoliranega organa med posameznimi dodajANJI);
- dodatek timola in enakih odmerkov učinkovin, ki povzročijo krčenje, kot je opisano v prvi alineji (spiranje izoliranega organa med posameznimi dodajANJI učinkovin);
- ponovitev postopka iz prve alineje.

#### **3.2.2.2 Potek poskusa z ACh**

Potek poskusa z ACh in timolom je prikazan v Tabeli 7. Poskus smo začeli z dodajanjem nizkih odmerkov ACh v neposredno bližino izoliranega organa in ob tem registrirali nastalo kontrakcijo. To smo z naraščajočimi odmerki ACh izvedli še petkrat. V naslednjem koraku smo v kiveto najprej dodali 0,6 mg (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 1,0 mg/mL) timola, 30 sekund za tem pa še enake odmerke ACh, kot smo jo uporabili pri kontroli. Začeli smo z najnižjim odmerkom ACh in nato odmerke postopno povečevali. Nato smo z namenom kontrole meritev ponovno izvedli meritve krčenj, povzročenih z ACh (brez prisotnosti

timola). Med vsakim dodajanjem ACh oz. timola + ACh smo organ dvakrat sprali s Tyrodejevo oz. Jalnovo raztopino. Poskus, ko smo v kiveto s kapaciteto 20 mL k izoliranemu organu dodajali timol v odmerku 0,6 mg (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 1,0 mg/mL), smo izvedli pri desetih izoliranih delih ileuma (šestih podgan) in sedmih izoliranih delih maternice (sedmih podgan). Na enak način smo delovanje timola v odmerku 0,06 mg (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 0,1 mg/mL) izvedli pri sedmih izoliranih delih ileuma (štirih podgan) in šestih izoliranih delih maternice (petih podgan).

Tabela 7. Potek poskusa z ACh

Table 7. Procedure of the experiment with ACh

	Dodana količina ACh (mg)					
1. Kontrola	0,0002	0,0006	0,002	0,006	0,02	0,06
2. Delovanje timola	T + 0,0002	T + 0,0006	T + 0,002	T + 0,006	T + 0,02	T + 0,06
3. Kontrola	0,0002	0,0006	0,002	0,006	0,02	0,06

Legenda: T – timol      Legend: T – thymol

Opomba: Izvedena sta bila posamična poskusa, pri katerih se je timol uporabil v odmerku 0,06 in 0,6 mg.

### 3.2.2.3 Potek poskusa s 5-HT

Potek poskusa s 5-HT in timolom je prikazan v Tabeli 8. Najprej smo v kiveto v neposredno bližino izoliranega organa dodali najnižji odmerek 5-HT in registrirali stopnjo krčenja. To smo z naraščajočimi koncentracijami 5-HT izvedli še petkrat. V naslednjem koraku smo v kiveto najprej dodali 0,6 mg (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 1,0 mg/mL) timola, 30 sekund za tem pa še enako količino oz. koncentracijo 5-HT, kot smo jo uporabili pri kontroli. Začeli smo z najmanjšim odmerkom 5-HT in nato ponavljali z naraščajočimi koncentracijami 5-HT. V zadnjem koraku smo tako kot na začetku dodajali v kiveto samo 5-HT. Med vsakim dodajanjem 5-HT oz. timola + 5-HT smo organ dvakrat sprali s Tyrodejevo oz. Jalnovo raztopino. Poskus, ko smo v kiveto s kapaciteto 20 mL k izoliranemu organu dodajali timol v odmerku 0,6 mg (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 1,0 mg/mL), smo izvedli pri devetih izoliranih delih ileuma (šestih podgan) in sedmih izoliranih delih maternice (šestih podgan). Na enak način smo delovanje timola v odmerku 0,06 mg (0,6 mL raztopine timola s



koncentracijo 0,1 mg/mL) izvedli pri šestih izoliranih delih ileuma (treh podgan) in šestih izoliranih delih maternice (petih podgan)

Tabela 8. Potek poskusa s 5-HT

*Table 8. Procedure of the experiment with 5-HT*

	Dodana količina 5-HT (mg)					
1. Kontrola	0,0002	0,0006	0,002	0,006	0,02	0,06
2. Delovanje timola	T + 0,0002	T + 0,0006	T + 0,002	T + 0,006	T + 0,02	T + 0,06
3. Kontrola	0,0002	0,0006	0,002	0,006	0,02	0,06

Legenda: T – timol      *Legend: T – thymol*

Opomba: Izvedena sta bila posamična poskusa, pri katerih se je timol uporabil v odmerku 0,06 in 0,6 mg.

#### 3.2.2.4 Potek poskusa s histaminom

Potek poskusa s histaminom je prikazan v Tabeli 9. Najprej smo v kiveto v neposredno bližino izoliranega organa dodali najnižji odmerek histamina in registrirali stopnjo krčenja. To smo z naraščajočimi koncentracijami histamina izvedli še petkrat. Med vsakim dodajanjem histamina smo organ dvakrat sprali s Tyrodejevo oz. Jalново raztopino. Ker histamin pri nobenem odmerku (tudi najvišjem) ni povzročil zaznavnega krčenja ileuma oz. maternice, smo na tem mestu poskus prekinili. Uporabili smo osem izoliranih delov ileuma štirih podgan in dva izolirana dela maternice ene podgane. Pri vseh je bil rezultat enak.

Tabela 9. Potek poskusa s histaminom

*Table 9. Procedure of the experiment with histamine*

	Dodana količina histamina (mg)					
1. Kontrola	0,0002	0,0006	0,002	0,006	0,02	0,06
2. Prekinitev poskusa						

#### 3.2.2.5 Potek poskusa s stimulacijo z električnim tokom

Potek poskusa stimulacije z električnim tokom in timolom je prikazan v Tabeli 10. Krčenje izoliranega ileuma oziroma maternice smo povzročili z električnim tokom z napetostjo šest do devet voltov (V). Ne glede na različne napetosti je bil čas trajanja impulza pet sekund (s),

frekvenca pa 20 Herzov (Hz). Omenjene meritve so nam predstavljale osnovne (kontrolne) vrednosti.

V naslednjem koraku smo v kiveto najprej dodali 0,6 mg timola (0,6 mL raztopine timola s koncentracijo 1,0 mg/mL), takoj za tem pa izvedli meritve krčenja izoliranega ileuma oziroma maternice na enak način kot pri kontrolnih meritvah, kar je opisano v prejšnjem odstavku. Po vsaki izvedeni meritvi smo pred dodajanjem timola v primeru poskusa na ileumu organ dvakrat sprali s Tyrodejevo, v primeru poskusa na maternici pa z Jalново raztopino.

Kot je prikazano v Tabeli 10 smo nato še enkrat, na enak način kot na začetku poskusa, izvedli kontrolne meritve krčenja ileuma oziroma maternice. Za izvedbo meritev krčenja smo uporabili deset izoliranih delov ileuma šestih podgan in sedem izoliranih delov materničnega roga petih podgan.

Tabela 10. Potek poskusa s stimulacijo z električnim tokom

*Table 10. Procedure of the experiment with electrical stimulation*

	Stimulacija z napetostjo (V)			
1. Kontrola	6	7	8	9
2. Delovanje timola	T + 6	T + 7	T + 8	T + 9
3. Kontrola	6	7	8	9

Legenda: T – timol      *Legend: T - thymol*

Opomba: Stimulacija z električnim tokom ob vsaki navedeni napetosti je trajala 5 s, frekvenca električnega toka pa je bila 20 Hz.

### 3.2.3 Statistična analiza

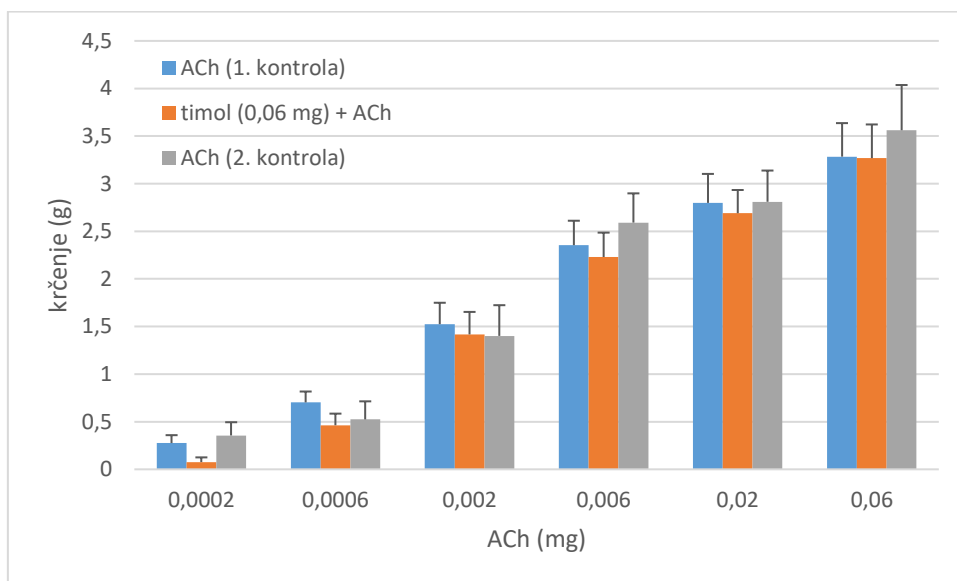
Statistično vrednotenje rezultatov smo izvedli s programsko opremo SPSS ver. 21 (IBM, Chicago, ZDA). Porazdelitev podatkov smo ocenili s testom po Shapiru in Wilku. Zaradi normalnosti porazdelitve podatkov smo statistično značilnost med vrednostmi, ki prikazujejo vpliv timola, in kontrolnimi vrednostmi ocenili z metodo Repeated Measures ANOVA in uporabo *post-hoc* testa po Bonferroniju. Kot statistično značilno smo privzeli vrednost  $P < 0,05$ . Rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$  standardna napaka (SE).

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI POSKUSOV NA IZOLIRANEM ILEUMU

#### 4.1.1 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh

Na Sliki 1 je prikazano krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh, in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



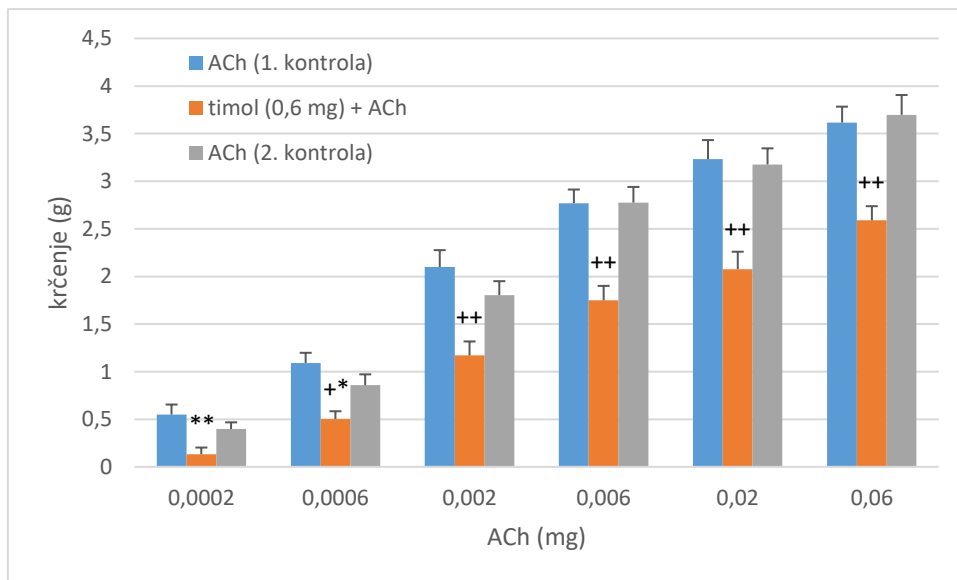
Slika 1. Krčenje ileuma ( $N = 7$ ), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh

*Figure 1. Ileal contractions ( $N = 7$ ) caused by ACh and by combination of thymol and ACh*

Statistično značilnih razlik pri krčenju ileuma ob uporabi kombinacije timola in ACh v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh) nismo zaznali pri nobenem od uporabljenih odmerkov ACh. Tudi med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem odmerku ACh ugotovili statistično značilnih razlik.

#### 4.1.2 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) in ACh

Na Sliki 2 je prikazano krčenje ileuma (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) in ACh. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 2. Krčenje ileuma (N = 10), povzročeno z ACh in kombinacijo timola in ACh

Figure 2. Ileal contractions (N = 10) caused by ACh and by combination of thymol and ACh

Legenda:

\*\* vrednost se statistično razlikuje ( $P < 0,05$ ) od vrednosti prve in druge kontrole

+\* vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve ( $P < 0,01$ ) in druge ( $P < 0,05$ ) kontrole

++ vrednost se statistično razlikuje ( $P < 0,01$ ) od vrednosti prve in druge kontrole

Legend:

\*\* the value significantly differs ( $P < 0.05$ ) from the values of the first and second control

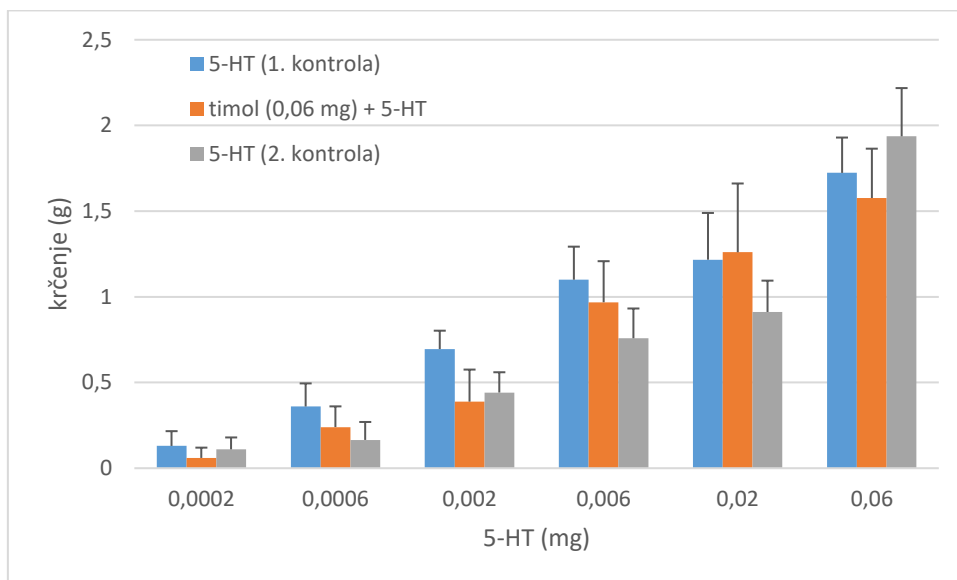
+\* the value significantly differs from the values of the first ( $P < 0.01$ ) and second ( $P < 0.05$ ) control

++ the value significantly differs ( $P < 0.01$ ) from the values of the first and second control

Kot prikazuje Slika 2, smo statistično značilno manjše krčenje ileuma ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ) zaznali pri uporabi kombinacije timola in ACh v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh). Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem od uporabljenih odmerkov ACh ugotovili statistično značilnih razlik.

#### 4.1.3 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5-HT

Na Sliki 3 je prikazano krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5-HT. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



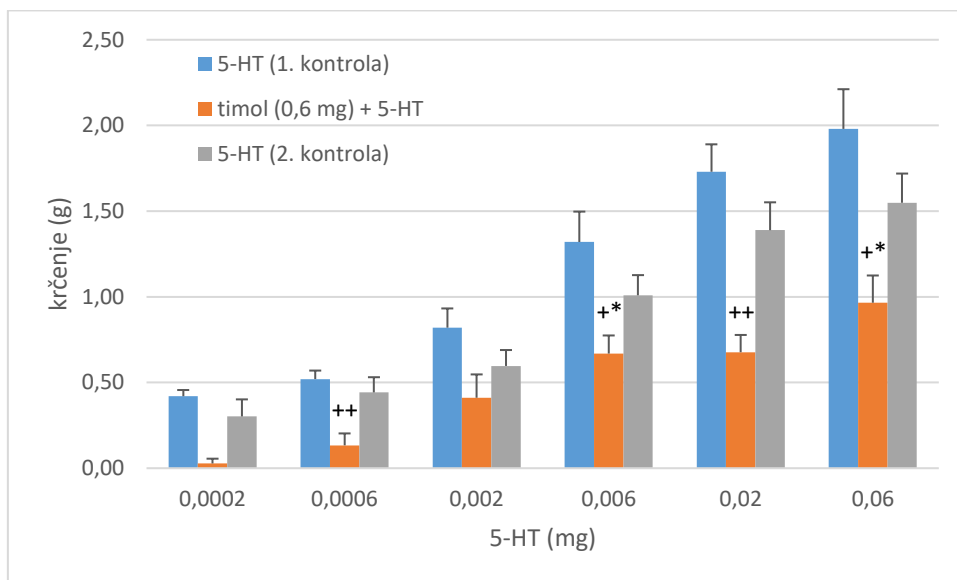
Slika 3. Krčenje ileuma ( $N = 6$ ), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT

*Figure 3. Ileal contractions ( $N = 6$ ) caused by 5-HT and by combination of thymol and 5-HT*

Krčenje ileuma, povzročeno s kombinacijo timola in 5-HT, se statistično ni razlikovalo od krčenja, povzročenega samo s 5-HT. Prav tako nismo pri nobenem od uporabljenih odmerkov 5-HT ugotovili statistično značilnih razlik med prvo in drugo kontrolno meritvijo.

#### 4.1.4 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT

Na Sliki 4 je prikazano krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s 5-HT, in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 4. Krčenje ileuma (N = 9), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT

Figure 4. Ileal contractions (N = 9) caused by 5-HT and by combination of thymol and 5-HT

Legenda:

+\* vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve ( $P < 0,01$ ) in druge ( $P < 0,05$ ) kontrole

++ vrednost se statistično razlikuje ( $P < 0,01$ ) od vrednosti prve in druge kontrole

Legend:

+\* the value significantly differs from the values of the first ( $P < 0.01$ ) and second ( $P < 0.05$ ) control

++ the value significantly differs ( $P < 0.01$ ) from the values of the first and second control

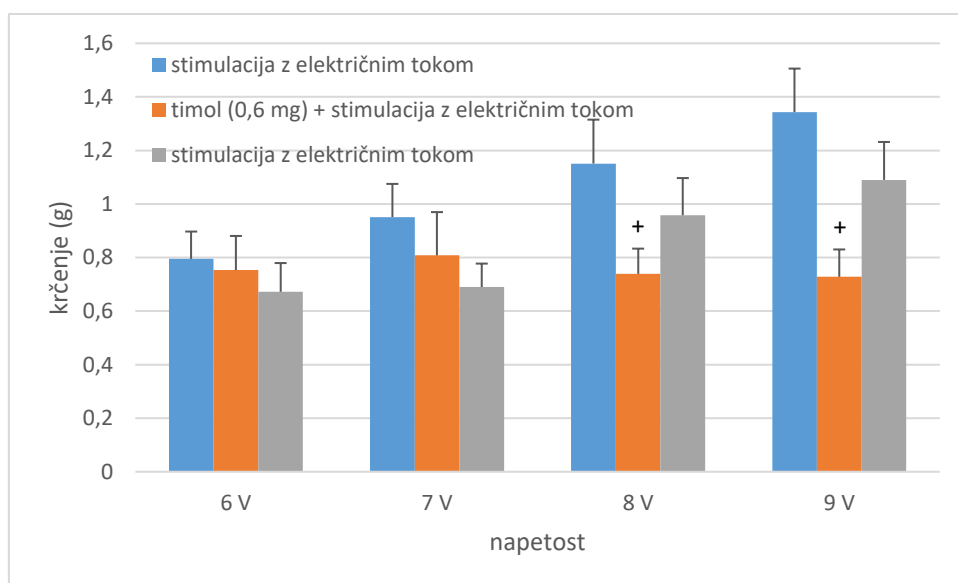
Iz Slike 4 je razvidno, da smo statistično značilno nižje krčenje ileuma, povzročeno s kombinacijo timola in 5-HT, v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo 5-HT) zaznali pri odmerkih 0,0006 mg, 0,006 mg, 0,02 mg in 0,06 mg 5-HT. Pri odmerkih 0,0002 mg in 0,002 mg 5-HT je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in 5-HT, v primerjavi s kontrolo, prav tako manjša, vendar ni bila statistično značilna. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem odmerku 5-HT ugotovili statistično značilnih razlik.

#### 4.1.5 Krčenje ileuma, povzročeno s histaminom

Histamin pri prvi kontroli pri nobeni koncentraciji (tudi najvišji) ni povzročil zaznavnega krčenja ileuma, zato smo na tem mestu poskus prekinili.

#### 4.1.6 Krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom

Na Sliki 5 je prikazano krčenje ileuma (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 5. Krčenje ileuma (N = 10), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom

*Figure 5. Ileal contractions (N = 10) caused by electrical stimulation and by combination of thymol and electrical stimulation*

Legenda:

+ vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve kontrole ( $P < 0,05$ )

Legend:

+ the value significantly differs from the value of the first control ( $P < 0.05$ )

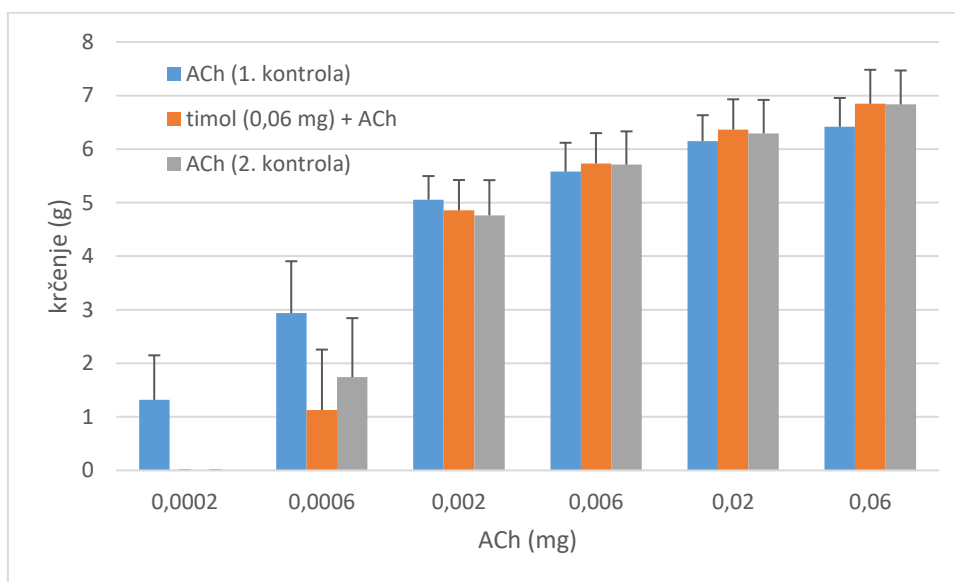
Statistično značilnih manjših vrednosti krčenja ileuma pri uporabi kombinacije timola in stimulacije z električnim tokom, v primerjavi z obema kontrolama (povzročitev krčenja zgolj s stimulacijo z električnim tokom), nismo zaznali. Pri povzročitvi krčenja ileuma z napetostjo 8 V in 9 V je bila vrednost krčenja v primerjavi s prvo kontrolo pri uporabi timola in

stimulacije z električnim tokom statistično značilno nižja ( $P < 0,05$ ), statistično značilne razlike z drugo kontrolo nismo ugotovili. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

## 4.2 REZULTATI POSKUSOV NA IZOLIRANI MATERNICI

### 4.2.1 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh

Na Sliki 6 je prikazano krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,06 mg) in ACh. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 6. Krčenje maternice ( $N = 6$ ), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh

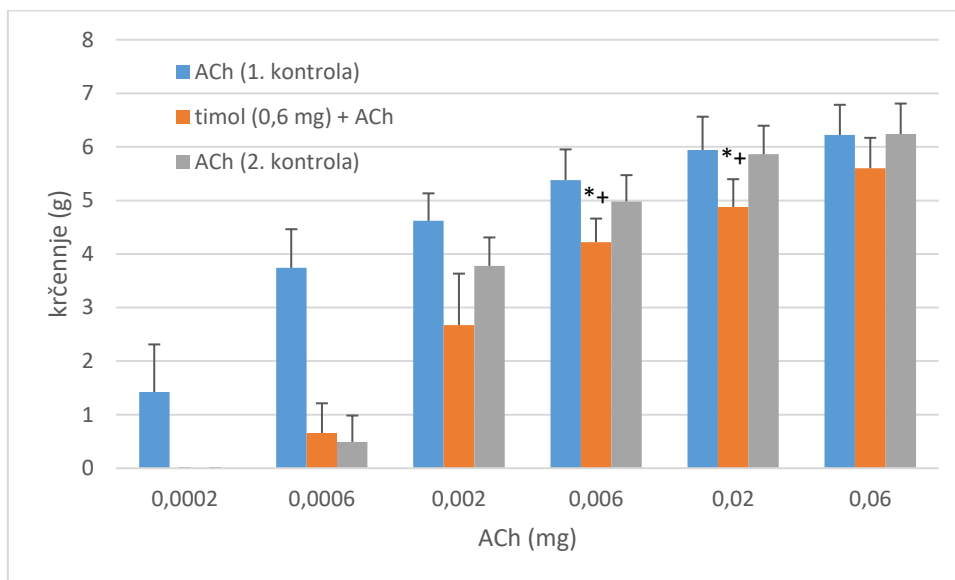
*Figure 6. Uterine contractions ( $N = 6$ ) caused by ACh and by combination of thymol and ACh*

Statistično značilnih manjših vrednosti krčenja maternice pri uporabi kombinacije timola in ACh, v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh) nismo zaznali pri nobenem odmerku ACh. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem odmerku ACh ugotovili statistično značilnih razlik.



#### 4.2.2 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) in ACh

Na Sliki 7 je prikazano krčenje maternice (v gramih), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola (0,6 mg) ter ACh. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 7. Krčenje maternice (N = 7), povzročeno z ACh in s kombinacijo timola in ACh

Figure 7. Uterine contractions (N = 7) caused by ACh and by combination of thymol and ACh

Legenda:

\*+ vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve ( $P < 0,05$ ) in druge ( $P < 0,01$ ) kontrole

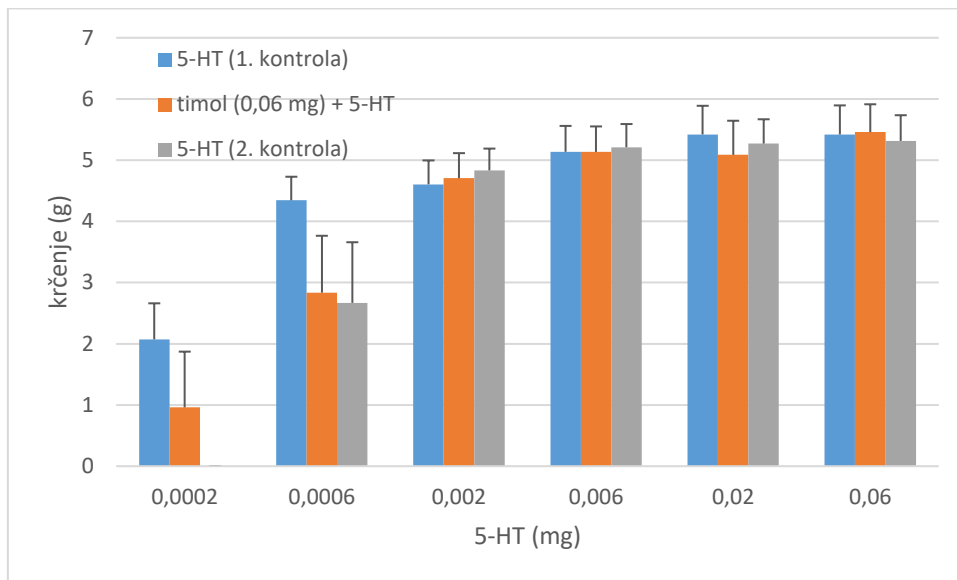
Legend:

\*+ the value significantly differs from the values of the first ( $P < 0.05$ ) and second ( $P < 0.01$ ) control

Statistično značilno manjše krčenje maternice ( $P < 0,05$ ) pri uporabi kombinacije timola in ACh, v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh) smo zaznali pri odmerkih 0,006 mg in 0,02 mg ACh. Pri odmerkih 0,002 mg in 0,06 mg ACh je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in ACh v primerjavi s kontrolo prav tako manjša, vendar ni bila statistično značilna. Pri odmerkih 0,0002 mg in 0,0006 mg ACh je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in ACh manjša od vrednosti prve kontrole, a večja oziroma enaka drugi kontrolni meritvi. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo smo pri odmerku 0,0006 mg ACh ugotovili statistično značilno razliko.

#### 4.2.3 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5-HT

Na Sliki 8 je prikazano krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,06 mg) in 5-HT. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



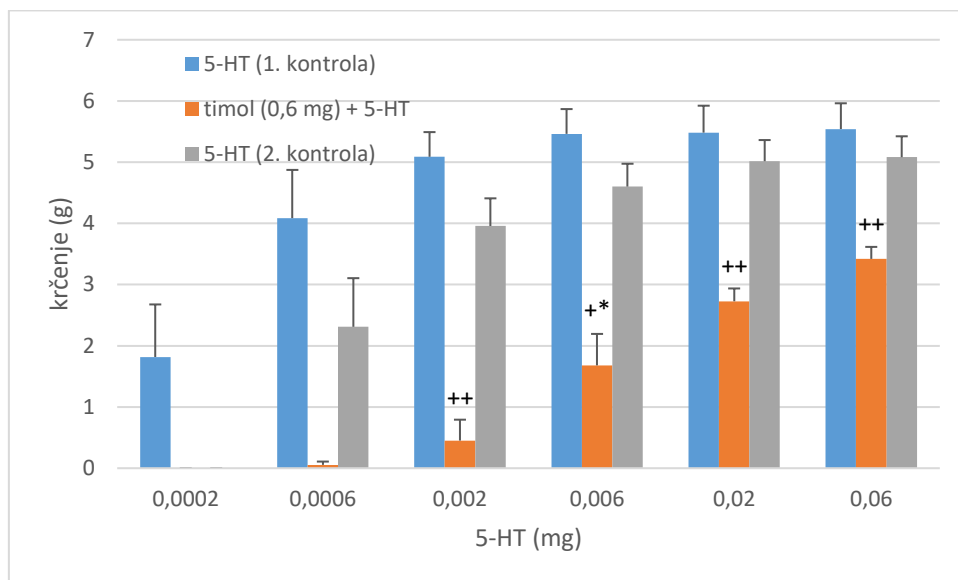
Slika 8. Krčenje maternice (N = 6), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT

*Figure 8. Uterine contractions (N = 6) caused by 5-HT and by combination of thymol and 5-HT*

Statistično značilnih manjših vrednosti krčenja maternice pri uporabi kombinacije timola in 5-HT, v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo 5-HT) nismo zaznali. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem odmerku 5-HT ugotovili statistično značilnih razlik.

#### 4.2.4 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT

Na Sliki 9 je prikazano krčenje maternice (v gramih), povzročeno s 5-HT, in s kombinacijo timola (0,6 mg) in 5-HT. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 9. Krčenje maternice (N = 7), povzročeno s 5-HT in s kombinacijo timola in 5-HT

Figure 9. Intensity of uterine contractions (N = 7) caused by 5-HT and by combination of thymol and 5-HT

Legenda:

+\* vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve ( $P < 0,01$ ) in druge ( $P < 0,05$ ) kontrole

++ vrednost se statistično razlikuje ( $P < 0,01$ ) od vrednosti prve in druge kontrole

Legend:

+\* the value significantly differs from the values of the first ( $P < 0.01$ ) and second ( $P < 0.05$ ) control

++ the value significantly differs ( $P < 0.01$ ) from the values of the first and second control

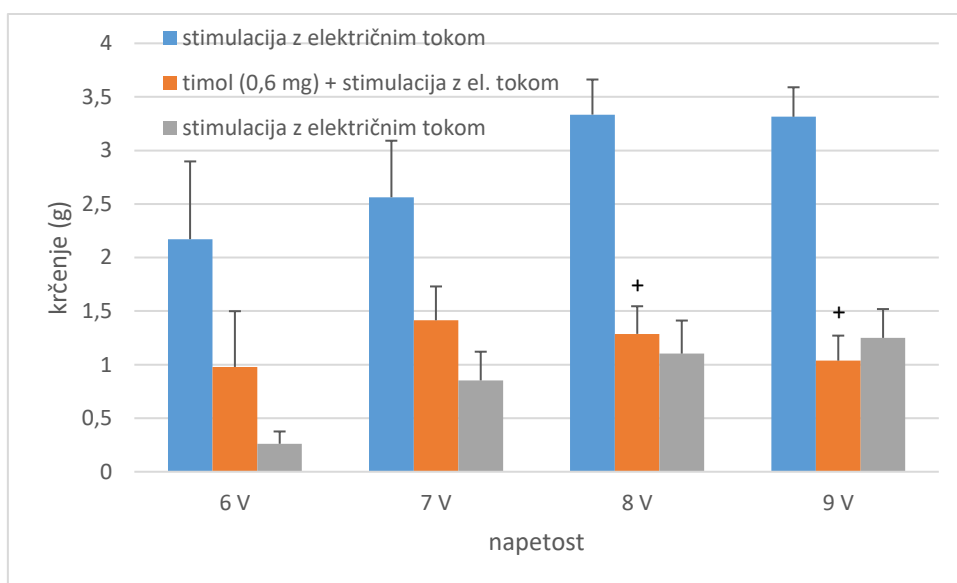
Statistično značilno manjše vrednosti krčenja maternice pri uporabi kombinacije timola in 5-HT v primerjavi s kontrolo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo 5-HT) smo zaznali pri odmerkih 0,002 mg, 0,006 mg, 0,02 mg in 0,06 mg 5-HT ( $P < 0,01$ ). Pri odmerku 0,0006 mg 5-HT je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in 5-HT, v primerjavi s kontrolo, prav tako manjša, vendar ni bila statistično značilna. Pri odmerku 0,0002 mg 5-HT je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in 5-HT manjša od vrednosti prve kontrole, a enaka drugi kontrolni meritvi. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo nismo pri nobenem odmerku 5-HT ugotovili statistično značilnih razlik.

#### 4.2.5 Krčenje maternice, povzročeno s histaminom

Histamin pri prvi kontroli pri nobeni koncentraciji (tudi najvišji) ni povzročil zaznavnega krčenja maternice, zato smo na tem mestu poskus prekinili.

#### 4.2.6 Krčenje maternice (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom

Na Sliki 10 je prikazano krčenje maternice (v gramih), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola (0,6 mg) in stimulacije z električnim tokom. Rezultati so prikazani kot povprečje s standardno napako (SE).



Slika 10. Krčenje maternice ( $N = 7$ ), povzročeno s stimulacijo z električnim tokom in s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom

*Figure 10. Intensity of uterine contractions ( $N = 7$ ) caused by electrical stimulation and by combination of thymol and electrical stimulation*

Legenda:

+ vrednost se statistično razlikuje od vrednosti prve kontrole ( $P < 0,05$ )

Legend:

+ the value significantly differs from the value of the first control ( $P < 0.05$ )

Statistično značilnih razlik krčenja maternice ( $P < 0,05$ ), povzročene s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom, v primerjavi z obema kontrolama (povzročitev krčenja zgolj s stimulacijo z električnim tokom) nismo zaznali. Pri povzročitvi krčenja maternice z napetostjo 8 V in 9 V je bila vrednost krčenja v primerjavi s prvo kontrolo pri uporabi timola

in stimulacije z električnim tokom statistično manjša ( $P < 0,05$ ), statistično značilne razlike v primerjavi z drugo kontrolno meritvijo pa nismo ugotovili. Med prvo in drugo kontrolno meritvijo smo pri napetosti 7 V, 8 V in 9 V ugotovili statistično značilno razliko.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 VPLIV TIMOLA NA KRČENJE ILEUMA

Po predvidevanjih in navedbah nekaterih avtorjev naj bi bilo farmakološko delovanje timola povezano z zmanjševanjem motorične aktivnosti nekaterih votlih organov. Delovanje timola se izraža z neposrednim vplivom na mišično plast votlih organov, torej na celice gladke mišičnine, pri katerih njegova prisotnost zmanjša sposobnost krčenja (Meister in sod., 1999; Beer in sod., 2007; Babaei in sod., 2008; Tamura in Iwamoto, 2004; Begrow in sod., 2009). S poskusom, pri katerem smo v razmerah *in vitro* ugotavljali vpliv timola na motoriko izoliranega ileuma podgane, smo želeli ugotoviti, če timol vpliva na krčenje tega organa. Samo krčenje smo izzvali z dodajanjem endogenih mediatorjev, za katere je poznano, da regulirajo motoriko črevesja. Tako smo ugotavljali vpliv timola na krčenje ileuma, povzročeno z ACh, 5-HT, histaminom in z električnim tokom. Iz Slike 1 je razvidno, da pri odmerku timola 0,06 mg, ki smo ga dodali k izoliranemu ileumu v kivetu s prostornino 20 mL, pri krčenju ileuma, povzročinem z ACh, nismo ugotovili statistično značilnih razlik. To pomeni, da navedeni odmerek ni vplival na krčenje ileuma, saj se ugotovljene vrednosti niso razlikovale od kontrolnih meritev, torej vrednosti, ki smo jih izmerili pri krčenju ileuma, povzročinem z ACh. Pri uporabi višjega odmerka timola (0,6 mg), kar prikazuje Slika 2, pa smo ugotovili statistično značilen vpliv timola na krčenje ileuma, ki smo ga povzročili z ACh. Iz Slike 2 je razvidno, da je bilo v primerjavi s kontrolno meritvijo (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh) krčenje ileuma, povzročeno z ACh ob prisotnosti timola, statistično značilno manjše. Statistično značilno razliko smo ugotovili pri vseh uporabljenih odmerkih ACh. Rezultati našega poskusa torej kažejo, da je timol v odmerku 0,6 mg vplival na sposobnost krčenja ileuma, ki smo ga povzročili z ACh.

Podobno kot v poskusu, pri katerem smo krčenje ileuma povzročili z ACh, je timol v enakem odmerku vplival tudi na krčenje, povzročeno s 5-HT. Slika 3 prikazuje, da timol v odmerku 0,06 mg ni vplival na krčenje ileuma, ki smo ga povzročili z naraščajočimi odmerki 5-HT, saj se krčenje v prisotnosti timola ni statistično razlikovalo od kontrolnih vrednosti, torej vrednosti krčenj, ki smo jih izmerili zgolj z uporabo 5-HT. Rezultat kaže, da uporabljena količina timola ni imela vpliva na krčenje. Ko pa smo uporabili višji odmerek timola (0,6 mg), kar nam prikazuje Slika 4, je bilo večina krčenj ileuma, ki smo jih povzročili s 5-HT, statistično značilna nižja kot pri kontrolnih meritvah, ko smo krčenje povzročili zgolj z uporabo 5-HT. Statistično značilne razlike smo zaznali pri odmerkih 0,0006 mg, 0,006 mg,

0,02 mg in 0,06 mg 5-HT. Pri odmerkih 0,0002 mg in 0,002 mg 5-HT je bila vrednost krčenj pri uporabi kombinacije timola in 5-HT v primerjavi s kontrolo prav tako manjša, vendar se statistično ni razlikovala. Naši rezultati dokazujejo, da je dodatek 0,6 mg timola imel vpliv na krčenje ileuma, povzročeno s 5-HT.

Naši rezultati se ujemajo z deli drugih avtorjev, ki so ugotovili, da timol v razmerah *in vitro* zavira nastanek spontanih krčenj gladkih mišic (Beer in sod., 2007) oziroma da zmanjša intenzivnost z ACh in 5-HT povzročenih krčenj gladkih mišičnih celic v dihalih (Begrow in sod., 2010). Ker tako podatki iz literature in naši rezultati kažejo, da timol zavira krčenje gladkih mišic, ki jih povzročata ACh in 5-HT, predvidevamo, da timol deluje kot antagonist muskarinskih in serotoninskih receptorjev, za katere je poznano, da se nahajajo v membrani gladkih mišičnih celic in preko katerih se sprožijo procesi krčenja (Augustine, 2004). Glede na naše rezultate bi lahko sklepali, da timol ni specifičen antagonist, saj ima najverjetneje afiniteto tako do muskarinskih kot do serotoninskih receptorjev. Zaradi zaviranja krčenj, povzročenih tako z ACh kot tudi s 5-HT, z našo raziskavo nismo mogli ugotoviti točnega mehanizma delovanja. V prihodnjih raziskavah na izoliranih organih bi bilo potrebno ugotavljati afiniteto timola za posamezen tip muskarinskih oziroma serotoninskih receptorjev, kar bi lahko izvedli z uporabo specifičnih in dobro poznanih antagonistov, s pomočjo katerih bi lahko ugotovili njegovo afiniteto do posameznega tipa receptorja. Poleg tega bi lahko mehanizem delovanja ugotavljali tudi na celičnem nivoju z uporabo konfokalne mikroskopije, ki omogoča vrednotenje vdora  $Ca^{2+}$  ob prisotnosti preiskovane snovi.

Nasprotno od ACh in 5-HT histamin v nobenem odmerku (od 0,0002 do 0,06 mg) ni povzročil zaznavnega krčenja ileuma. Zaradi tega poskusa nismo mogli izvesti po protokolu, kot smo ga uporabljali za ACh in 5-HT. Kot poročajo Sakai in sod. (1979) ter Aguilar in sod. (1986), histamin pri podganah minimalno stimulira motoriko prebavil. Pri uporabi histamina za stimulacijo krčenja ileuma v našem poskusu nismo zaznali nikakršnega odziva, zato planiranega poskusa nismo izvedli. Predvidevamo, da bi morali za ugotavljanje vpliva timola na krčenje ileuma, ki ga povzroča histamin, uporabiti organ kakšne druge živalske vrste.

Z namenom ugotavljanja afinitete timola do muskarinskih receptorjev smo izvedli tudi poskus, ko smo krčenje ileuma povzročili s stimulacijo z električnim tokom. Električni tok povzroči sproščanje ACh iz živčnega tkiva v črevesu, sproščeni ACh pa prek muskarinskih receptorjev sproži krčenje gladkih mišičnih celic. Po naših predvidevanjih naj bi prisotnost timola kot morebitnega antagonistu muskarinskih receptorjev povzročila zmanjšano krčenje

ileuma, povzročenih z električnim tokom (Babaei in sod., 2008). Slika 5 prikazuje, da pri odmerku 0,6 mg timola nismo ugotovili statistično značilnih razlik v krčenju ileuma. Krčenja ileuma, ki ga je ob prisotnosti 0,6 mg timola povzročil električni tok z napetostjo 8 V in 9 V je bilo v primerjavi s prvo kontrolno meritvijo sicer statistično značilno manjše, vendar statistično značilne razlike z drugo kontrolno meritvijo nismo ugotovili. Po preučitvi Slike 5 sklepamo, da je tekom samega poskusa prišlo do izčrpanja zalog endogenega ACh v izoliranem organu, zaradi česar se ileum ob drugi kontrolni meritvi ni odzival s takšno intenzivnostjo kot ob prvi. Predvidevamo, da je tudi statistično značilno nižja vrednost krčenja, povzročena z električnim tokom ob dodatku timola, lahko posledica porabljenih zalog ACh in ne neposrednega delovanja timola kot antagonist muskarinskih receptorjev. Z rezultati naše preiskave ne moremo potrditi vpliva timola na krčenje ileuma, povzročena z električnim tokom. Po drugi strani pa naši rezultati prinašajo natančen opis stimulacije z električnim tokom, ki bo dobrodošel v prihodnjih tovrstnih raziskavah. V prihodnjih raziskavah bi lahko opravili meritve krčenja ileuma po opisanem protokolu le z napetostjo 8 V in 9 V in bi se na ta način izognili večkratnim krčenjem izoliranega organa in s tem porabljanju zalog ACh. S tem bi ohranili aktivnost izoliranega organa, kar bi omogočilo opravljanje verodostojnih meritev.

V zaključku bi poudarili, da ima dodatek 0,6 mg timola statistično značilen vpliv na zmanjšanje krčenja ileuma, povzročena z ACh ali 5-HT. Možni mehanizem tega delovanja je, da timol deluje kot antagonist muskarinskih receptorjev, kot predvidevajo Meister in sod. (1999). Glede vpliva timola na krčenje ileuma, povzročena s 5-HT, lahko predvidevamo, da timol deluje kot antagonist receptorjev 5-HT. Drug možni mehanizem je, da deluje kot agonist  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  in  $\beta$  adrenergičnih receptorjev in s tem povzroči zmanjšano motoriko želodčne stene (Beer in sod., 2007). Za določitev točnega mehanizma bi bile potrebne receptorske študije na subcelularnem ali celičnem nivoju, s katerimi bi lahko natančneje določili, če timol deluje kot antagonist muskarinskih in 5-HT receptorjev oz. agonist adrenergičnih receptorjev.



## 5.2 VPLIV TIMOLA NA KRČENJE MATERNICE

Ugotavljali smo tudi vpliv timola na krčenje maternice, povzročeno z ACh, 5-HT, histaminom in električnim tokom. Rezultati so podobni kot pri ileumu. Iz Slike 6 je razvidno, da pri odmerku 0,06 mg timola, ki smo ga dodali k izolirani maternici, nismo ugotovili statistično značilnih razlik v krčenju, povzročenem z ACh. Navedeni odmerek torej ni vplival na krčenje maternice, saj se ugotovljene vrednosti niso razlikovale od kontrolnih meritev. Pri uporabi višjega odmerka timola (0,6 mg), kar prikazuje Slika 7, pa smo pri dveh odmerkih ACh ugotovili statistično značilen vpliv timola na krčenje maternice, povzročeno z ACh. Iz Slike 7 je razvidno, da je bilo v primerjavi s kontrolnima meritvama (povzročitev krčenja zgolj z uporabo ACh) krčenje maternice, povzročeno z ACh ob prisotnosti timola, statistično značilno manjše pri odmerkih 0,006 mg in 0,02 mg ACh. Pri odmerkih 0,002 mg in 0,06 mg ACh je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in ACh v primerjavi s kontrolo prav tako manjša, vendar ni bila statistično značilna. Pri odmerkih 0,0002 mg in 0,0006 mg ACh je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in ACh manjša od vrednosti prve kontrole, a večja oziroma enaka drugi kontrolni meritvi. Glede na rezultate našega poskusa lahko trdimo, da timol v odmerku 0,6 mg vpliva na sposobnost krčenja maternice, ki nastane z ACh, je pa ta vpliv manj očitni kot pri ileumu.

Podobno kot v poskusu, pri katerem smo krčenje maternice povzročili z ACh, je timol v enakem odmerku vplival tudi na krčenje, povzročeno s 5-HT. Slika 8 prikazuje, da timol v odmerku 0,06 mg ni vplival na krčenje maternice, ki smo ga povzročili z naraščajočimi odmerki 5-HT, saj se krčenje, povzročeno s 5-HT, v prisotnosti timola ni statistično razlikovalo od kontrolnih vrednosti, torej vrednosti krčenj, ki smo jih izmerili zgolj z uporabo 5-HT. Rezultat kaže, da uporabljena količina timola ni imela vpliva na krčenje. Ko pa smo uporabili višji odmerek timola (0,6 mg), kar nam prikazuje Slika 9, je bilo pri večini krčenj maternice, ki smo jih povzročili s 5-HT, ugotovljeno statistično značilno manjše krčenje kot pri kontrolnih meritvah, ko smo krčenje povzročili zgolj z uporabo 5-HT. Statistično značilne razlike smo zaznali pri odmerkih 0,002 mg, 0,006 mg, 0,02 mg in 0,06 mg 5-HT. Pri odmerku 0,0006 mg 5-HT je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in 5-HT v primerjavi s kontrolo prav tako manjša, vendar ni bila statistično značilna. Pri odmerku 0,0002 mg 5-HT je bila vrednost krčenja pri uporabi kombinacije timola in 5-HT manjša od vrednosti prve kontrole, a enaka drugi kontrolni meritvi. Naši rezultati dokazujejo, da je dodatek 0,6 mg timola zmanjšal krčenja maternice, povzročene s 5-HT.

Podobno kot pri ileumu histamin v nobenem odmerku (od 0,0002 do 0,06 mg) ni povzročil zaznavnega krčenja maternice. Kot poročajo Szelag in sod. (2002) in Cortijo in sod. (1984) je pri podgani prevladujoči odgovor maternice na histamin relaksacija (prek aktivacije H<sub>2</sub> receptorjev). Ugotavljajo, da naj bi bil zaviralni učinek histamina na maternico podgane povezan s sprostitvijo kateholaminov in direktno stimulacijo receptorjev H<sub>2</sub>. Za ugotavljanje vpliva timola na krčenje maternice, ki ga povzroča histamin, bi tako morali uporabiti organ kakšne druge živalske vrste.

Krčenje maternice smo povzročili tudi s stimulacijo z električnim tokom. Slika 10 prikazuje, da pri poskusu s kombinacijo timola in stimulacije z električnim tokom nismo zaznali razlik z obema kontrolama (povzročitev krčenja samo z električnim tokom). Pri povzročitvi krčenja maternice z napetostjo 8 V in 9 V je bila vrednost krčenja v primerjavi s prvo kontrolo pri uporabi timola in stimulacije z električnim tokom statistično značilno manjša, statistične razlike z drugo kontrolo pa ni bilo. Predvidevamo, da je podobno kot pri ileumu tekom samega poskusa prišlo do izčrpanja zaloga ACh v izoliranem organu, zaradi česar se maternica ob drugi kontrolni meritvi ni odzvala s takšno intenzivnostjo kot ob prvi. V literaturi nismo našli konkretnih podatkov o vplivu timola na krčenja maternice niti o mehanizmi delovanja timola na gladko mišične celice maternice. Nagle in sod. (2013) omenjajo abortivno delovanje timola, sam mehanizem abortivnega delovanja pa v članku ni pojasnjen. Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri poskusu z ileumom, in ki so primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri maternici, lahko sklepamo, da je mehanizem delovanja timola podoben pri obeh organih. Sicer pa, vsaj kot nam je poznano, vpliv timola na motoriko maternice do sedaj še ni bil opisan, zato menimo, da je ta naloga prva raziskava, ki se je dotaknila te teme.

Z našo raziskavo smo torej ugotovili, da tako kot pri ileumu, timol v odmerku 0,6 mg statistično značilno zmanjšuje krčenje maternice, ki ga povzročata ACh ali 5-HT.

V poskusu smo uporabili dva odmerka timola, od katerih pri nižjem odmerku ni bilo učinka, pri višjem odmerku pa se je učinek pojavil. Le dva odmerka smo uporabili, ker je bil namen našega dela ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na krčenje ileuma in maternice. V prihodnjih raziskavah bi bilo priporočljivo uporabiti več odmerkov timola, saj bi to omogočilo, da bi lahko na podlagi dobljenih rezultatov določili srednji učinkoviti odmerek (ED<sub>50</sub>).

## 6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov naše raziskovalne naloge smo prišli do sledečih sklepov:

- timol v odmerku 0,06 mg, ki smo ga dodali v kiveto s prostornino 20 mL, kjer sta bila nameščena ileumu ali maternica, ne vpliva na krčenje navedenih organov, povzročeno z ACh, 5-HT ali z električnim tokom;
- timol v odmerku 0,6 mg, ki smo ga dodali v kiveto s prostornino 20 mL, kjer sta bila nameščena ileumu ali maternica, zmanjšuje krčenje navedenih organov, povzročeno z ACh in 5-HT;
- histamin v odmerkih od 0,0002 do 0,06 mg, ki smo jih dodajali v kiveto s prostornino 20 mL, v kateri sta bila nameščena ileumu ali maternica podgane, ne povzroča krčenja navedenih organov;
- timol v odmerku 0,6 mg, ki smo ga dodali v kiveto s prostornino 20 mL, v kateri sta bila nameščena izolirani ileumu ali maternica, ne vpliva na z električnim tokom povzročeno krčenje navedenih organov;
- v prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno z dodatnimi metodami ugotoviti afiniteto timola za specifične membranske receptorje in izvesti raziskavo z več različnimi odmerki timola, na podlagi katerih bi lahko določili ED<sub>50</sub>.

## **7 ZAHVALA**

V prvi vrsti gre največja zahvala mentorju doc. dr. Tomažu Snoju, ki mi je skozi celotno raziskovalno delo stal ob strani, mi z svojim obširnim znanjem in izkušnjami ogromno pomagal in me usmerjal na poti do končnega izdelka. Hvala predvsem za veliko potrpežljivosti, požrtvovalnosti in razumevanja. Hvala tudi somentorici asist. dr. Blanki Premrov Bajuk in prof. dr. Silvestri Kobal.

Za vso tehnično pomoč, prijaznost, nasvete in ustrežljivost se najlepše zahvaljujem Katarini Babnik in Boštjanu Drolcu.

Hvala mag. Giti Grecs-Smole za hiter pregled literature.

Na koncu se zahvaljujem še družini in prijateljem za vse spodbudne besede in izkazano podporo.

## 8 LITERATURA

Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder.

Br J Pharmacol 2006; 148(5): 565–78.

Aguilar MJ, Morales-Olivas FJ, Rubio E. Pharmacological investigation into the effects of histamine and histamine analogues on guinea-pig and rat colon *in vitro*.

Br J Pharmacol 1986; 88(3): 501–6.

Augustine GJ. Neurotransmitters and their receptors. In: Purves D, eds. Neuroscience. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004: 129–63.

Babaei M, Abarghoei ME, Ansari R, et al. Antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris* on the guinea-pig ileum. Nat Prod Res 2008; 22(13): 1143–50.

Beer AM, Lukanov J, Sagorchev P. Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. Phytomedicine 2007; 14(1): 65–9.

Begrow F, Engelbertz J, Feistel B, Lehnfeld R, Bauer K, Verspohl EJ. Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance.

Planta Med 2010; 76(4): 311–8.

Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie. Nr. 259 Thymol 06/00. In: Toxikologische Bewertungen. Heidelberg, 2010. [https://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL\\_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE\\_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew259-L.pdf](https://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew259-L.pdf) (20. maj 2017)

Cortijo J, Esplugues J, Morales-Olivas FJ, Rubio E. The inhibitory effect of histamine on the motility of rat uterus *in vivo*. Eur J Pharmacol 1984; 97(1/2): 7–12.

Deiteren A, De Man JG, Pelckmans PA, De Winter BY. Histamine H<sub>4</sub> receptors in the gastrointestinal tract. Br J Pharmacol 2015; 172(5): 1165–78.

Griffin MT, Ehlert FJ. Specific inhibition of isoproterenol-stimulated cyclic AMP accumulation by M<sub>2</sub> muscarinic receptors in rat intestinal smooth muscle.

J Pharmacol Exp Ther 1992; 263(1): 221–5.

Guyton A, Hall J. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006: 92–100.

Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003; 52(1): 1–30.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71(4): 533–54.

Ichida S, Oda Y, Tokunaga H, Hayashi T, Murakami T, Kita T. Mechanisms of specific change by estradiol in sensitivity of rat uterus to serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229(1): 244–9.

Killam AL, Cohen ML. Serotonin and smooth muscle. In: Szekeres L, Papp J, eds. *Pharmacology of smooth muscle*. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 301–28.

Kobal S, Skubic V. *Praktikum iz farmakodinamike in farmakokinetike*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, 1987.

Marchese A, Orhan IE, Daglia M, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chem* 2016; 210: 402–14.

Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med* 1999; 65(6): 512–6.

Munns M, Pennefather JN. Pharmacological characterization of muscarinic receptors in the uterus of oestrogen-primed and pregnant rats. *Br J Pharmacol* 1998; 123(8): 1639–44.

Nagle PS, Pawar YA, Sonawane AE, Nikum AP, Patil UD, More DH. Thymol: synthesis, reactions & its spectrum of pharmacological and chemical applications. *Indo Am J Pharm Res* 2013; 3(9): 7549–61.

Oh KH, Nam Y, Jeong JH, Kim IK, Sohn UD. The effect of DA-9701 on 5-hydroxytryptamine-induced contraction of feline esophageal smooth muscle cells. *Molecules* 2014; 19(4): 5135–49.

Sakai K, Shiraki Y, Tatsumi T, Tsuji K. The actions of 5-hydroxytryptamine and histamine on the isolated ileum of the tree shrew (*Tupaia glis*). *Br J Pharmacol* 1979; 66(3): 405–8.

Sciencelab.com. Thymol MSDS. In: Material Safety Data Sheet. Houston, 2013.  
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927623> (20. maj 2017)

Shakeri F, Boskabady MH. A review of the relaxant effect of various medicinal plants on tracheal smooth muscle, their possible mechanism(s) and potency.  
*J Ethnopharmacol* 2015; 175: 528–48.

Szelag A, Merwid-Lad A, Trocha M. Histamine receptors in the female reproductive system. Part II. The role of histamine in the placenta, histamine receptors and the uterus contractility.  
*Ginekol Pol* 2002; 73(7): 636–44.

Tamura T, Iwamoto H. Thymol: a classical small-molecule compound that has a dual effect (potentiating and inhibitory) on myosin.  
*Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318(3): 786–91.

Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract.  
*J Physiol Pharmacol* 2009; 60(1): 3–21.

Unno T, Matsuyama H, Izumi Y, Yamada M, Wess J, Komori S. Roles of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2006; 149(8): 1022–30.

Unno T, Matsuyama H, Sakamoto T, et al. M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2005; 146(1): 98–108.

Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3.  
*Br J Pharmacol* 2007; 151(4): 530–40.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation.  
*Adv Physiol Educ* 2003; 27(1/4): 201–6.

Zorc M. Mišičnina. In: Petrovič D, Zorc M, eds. *Histologija: učbenik*. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, 2012: 43–9.

Zorc-Pleskovič R. Prebavila – aboralni del. In: Petrovič D, Zorc M, eds. *Histologija: učbenik*. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, 2012: 173–85.