

ALI TIMOL V RAZMERAH IN VITRO ZAVIRA KONTRAKCIJE TANKEGA ČREVEESA, POVZROČENE Z ACETILHOLINOM? PRELIMINARNA RAZISKAVA

Luka Prem¹, Silvestra Kopal¹, Saša Trailović², Tomaž Snoj^{1*}

¹Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija, ²Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

tomaz.snoj@vf.uni-lj.si

Timol (5-metil-2-izopropilfenol) je derivat fenola, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus spp.*) in nekaterih drugih rastlin. V literaturi je poleg številnih drugih učinkov opisano tudi njegovo spazmolitično delovanje. Namen naše preliminarnе raziskave je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa, ki jih povzroča acetilholin. Za delo smo uporabili izolirani ileum dveh podgan pasme Wistar, meritve intenzivnosti kontrakcij ileuma pa smo izvedli s sistemom za delo z izoliranimi organi. Kontraksije ileuma smo povzročili z dodajanjem različnih odmerkov acetilholina in timola v kiveto v neposredno bližino izoliranega ileuma. Rezultati kažejo, da timol znatno zmanjša intenzivnost kontrakcij ileuma, povzročenih z acetilholinom. Za ugotovitev natančnega mehanizma delovanja timola in možnost uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim delovanjem bodo potrebne nadaljnje raziskave.

Ključne besede: timol; acetilholin; kontrakcije; ileum

Uvod

Timol (5-metil-2-izopropilfenol) je monoterpenski derivat fenola, ki se nahaja v eteričnem olju timijana (*Thymus spp.*) in nekaterih drugih rastlin. Terpeni so obsežna skupina naravnih hidrokarbonov. Prisotni so v višjih rastlinah kot produkt njihovega metabolizma in so sestavni del eteričnih olj. Zdravilni učinki ekstraktov timijana so najverjetneje povezani prav z delovanjem timola. V literaturi se nahajajo podatki, da timol poleg številnih drugih učinkov deluje tudi protibakterijsko, protiglivično, protiparazitarno, protivnetno in spazmolitično (1, 2). Kot akaricid se uporablja za zdravljenje varoze pri čebelah. Učinek timola na motoriko črevesa in mehanizem njegovega delovanja nista dobro poznana, pomembna pa sta s stališča morebitne uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim in relaksantnim delovanjem ali kot zdravila za odpravljanje želodčno-črevesnih zajedavcev.

Kontraksijo gladkih mišičnih celic povzročajo številni endogeni mediatorji, kot so acetilholin (ACh), serotonin, histamin ter nekatere snovi zunanjega izvora. ACh kot neurotransmiter parasimpatičnega živčnega sistema povzroči kontrakcijo gladkih mišičnih celic prebavil z vezavo na z G-proteinom sklopljena muskarinska receptorja M2 in M3 (3). Pri tem kot drugi glasnik nastane inositoltrifosfat (IP3), ki povzroči odpiranje kalcijevih kanalčkov in vstop kalcija v celico, kar posledično privede do aktivacije kontraktilnih proteinov in kontrakcij gladkih mišičnih celic (4). Nekatere snovi zunanjega izvora vplivajo na intenzivnost kontrakcij gladkih mišičnih celic s tem, da z vezavo na muskarinske M2 in M3 receptorje onemogočajo vezavo endogenih mediatorjev ter na ta način delujejo kot

antagonisti, ali zaradi interakcije z membranskimi kalcijevimi kanalčki zavirajo vstop kalcija v celico. Namen našega dela je bil ugotoviti, če timol v razmerah *in vitro* vpliva na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa, ki jih povzroča ACh.

Material in metode

Poskus je potekal na izoliranemu ileumu dveh podgan pasme wistar, starih štiri mesece. Pred odvzemom omenjenega organa smo podgani evtanazirali s ogljikovim dioksidom in ju izkrvaveli. Takoj po evtanaziji smo s škarjami odprli trebušno steno, odvzeli približno 2 cm dolg odsek ileuma in ga preprali s Tyrodejevo raztopino (5). Izolirani del ileuma smo namestili v sistem za delo z izoliranimi organi (Elunit, Srbija). Registracijo kontrakcij smo izvedli z izometričnim pretvornikom, rezultate pa prikazali s pomočjo programske opreme eLabs (Elunit, Srbija). Izolirano črevo je bilo nameščeno v kiveti s kapaciteto 20 ml. Razmere *in vitro* so bile sledeče: Tyrodejeva raztopina, 37°C, ventiliranje z mešanico plinov (95% O₂ in 5% CO₂). Poskus smo izvedli z dodajanjem ACh in timola v kiveto v neposredno bližino izoliranega ileuma po sledečem protokolu: 1.) različni odmerki ACh in registracija intenzivnosti kontrakcije tankega črevesa; 2.) dodatek timola in enakih odmerkov ACh kot v točki 1 ter registracija intenzivnosti kontrakcij ileuma; 3.) ponovitev postopka iz točke 1.

Potek poskusa prikazuje Tabela 1.

Rezultati

Kontrakcije enega od dveh uporabljenih ileumov, ki so bile povzročene z ACh ob odsotnosti in prisotnosti timola, so prikazane na Sliki 1.

Tabela 1: Potek poskusa z acetilholinom in timolom pri ugotavljanju intenzivnosti kontrakcij ileuma v razmerah *in vitro*

Prikazane so koncentracije acetilholina, ki smo jo uporabili za povzročanje kontrakcij. Med posameznimi odmerki smo črevo dvakrat sprali s Tyrodejevo raztopino. Pri ugotavljanju delovanja timola smo timol uporabljali v koncentraciji 0,03 mg/ml.

	ACh 1 (3 x 10 ⁻⁶ mg/ml)	ACh 2 (1 x 10 ⁻⁵ mg/ml)	ACh 3 (3 x 10 ⁻⁵ mg/ml)	ACh 4 (1 x 10 ⁻⁴ mg/ml)	ACh 5 (3 x 10 ⁻⁴ mg/ml)	ACh 6 (1 x 10 ⁻³ mg/ml)	ACh 7 (3 x 10 ⁻³ mg/ml)
1. kontrola	ACh 1	ACh 2	ACh 3	ACh 4	ACh 5	ACh 6	ACh 7
1. delovanje timola	T + ACh 1	T + ACh 2	T + ACh 3	T + ACh 4	T + ACh 5	T + ACh 6	T + ACh 7
1. kontrola	ACh 1	ACh 2	ACh 3	ACh 4	ACh 5	ACh 6	ACh 7

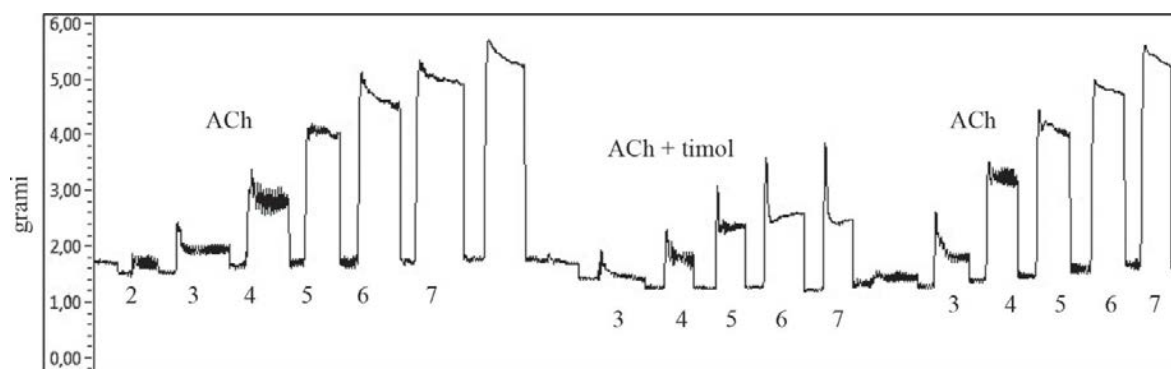
Razprava

Preliminarna raziskava o vplivu timola na intenzivnost kontrakcij ileuma, povzročenih z ACh, kaže, da so enaki odmerki ACh ob prisotnosti timola povzročili znatno šibkejšo kontrakcije, kot smo jih izmerili, če timola nismo uporabili. Naše rezultate lahko primerjamo z rezultati objavljene raziskave (2), pri kateri je bil, prav tako v razmerah *in vitro*, ugotovljen spazmolitični učinek timola. Poskus smo opravili na ileumih dveh različnih podgan in v obeh primerih dobili enak odziv izoliranega organa, zaradi česar sklepamo, da je prisotnost

timola v razmerah *in vitro* predstavlja dejavnik, ki je vplival na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa. Iz te preliminarne raziskave ni razviden natančen mehanizem delovanja timola. Njegov učinek na intenzivnost kontrakcij tankega črevesa bi lahko bil posledica interakcije z receptorji M2 in M3, oziroma z membranskimi kalcijevimi kanalčki kot tudi z adrenergičnimi receptorji (1, 2). Ta vprašanja so predmet nadaljnjih raziskav. Dosedanji rezultati pa kažejo na potencialno možnost uporabe timola kot zdravila s spazmolitičnim delovanjem. Pred dejansko uporabo timola kot zdravila je še dolga pot, saj je potrebno poleg določitve natančnega mehanizma delovanja izvesti tudi klinično preizkušanje na laboratorijskih in ciljnih živalskih vrstah ter ugotoviti njegove morebitne stranske, neželene in toksične učinke na organizem.

Reference

1. Nagle PS, Pawar YA, Sonawane AE, et al. Thymol: synthesis, reactions & its spectrum of pharmacological and chemical applications. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 3: 7549-61.
2. Beer AM, Lukanov J, Sagorchev P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 2007; 14: 65-9.
3. Abraham G. The importance of muscarinic receptors in domestic animal diseases and therapy: Current and future perspectives. *The Veterinary Journal* 2016; 208: 13-21.
4. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education* 2003; 27: 201-6.
5. Kobal S, Skubic V. *Praktikum iz farmakodinamike in farmakokinetike*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, 1987.



Koncentracija ACh:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1: 3×10^{-6} mg/ml | 5: 3×10^{-4} mg/ml |
| 2: 1×10^{-5} mg/ml | 6: 1×10^{-3} mg/ml |
| 3: 3×10^{-5} mg/ml | 7: 3×10^{-3} mg/ml |
| 4: 1×10^{-4} mg/ml | |

Koncentracija timola: 0,03 mg/ml

Slika 1: Prikaz intenzivnosti kontrakcij ileuma v odvisnosti od koncentracije ACh (mg/ml) in vpliv timola na kontrakcije izzvane z ACh (izpis iz eLabs)

Does thymol under *in vitro* conditions act as a suppressor of small intestine contractions caused by acetylcholine? Preliminary study

Thymol (5-methyl-2-isopropylphenol) is a phenol derivate which is found in essential oil of thyme (*Thymus spp.*) and some other plants. Beside several other effects spasmolytic activity of thymol was described. Therefore, the aim of our preliminary study was to determine the impact of thymol on the intensity of small intestine contractions caused by acetylcholine under *in vitro* conditions. In this study ileums of two Wistar rats were used and the intensity of ileum contraction was measured with the system for work on isolated organs. Different amounts of acetylcholine and thymol were added into the chamber with isolated ileum to exhibit ileum contractions. Results show that thymol suppresses intensity of ileum contractions caused by acetylcholine. In order to determine the exact mechanism of thymol action and to estimate the possible use of thymol as a drug with spasmolytic activity further studies should be performed.

Key words: thymol; acetylcholine; contractions; ileum