



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
JAVNO ZDRAVLJE

# FARMAKOLOŠKI EFEKTI SIRUPA I TINKTURE TIMIJANA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Aleksandar Rašković

Kandidat: Maja Kvirgić

Novi Sad, 2016

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Maja Kvirgić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Aleksandar Rašković
Naslov rada: NR	Farmakološki efekti sirupa i tinkture timijana
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski /engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina

Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 8, stranica 119, tabela 43, slika 11, grafikona 23, referenci 198
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	timijan; biljni ekstrakti; farmaceutski preparati; antioksidansi; analgetici; farmakokinetika; interakcija biljnih preparata i lekova; miševi; pacovi Wistar soja
UDK	615.212/.217.015.2:612.085 615.322.015.2:633.8
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Novi Sad Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Poslednjih godina je prisutan trend povratka prirodi i upotrebi biljnih lekova, kako u prevenciji tako i u lečenju različitih bolesti. Timijan (<i>Thymus vulgaris</i> L.) se u narodnoj medicini koristio u lečenju respiratornih oboljenja kao što su kašalj, bronhitis i astma. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da timijan poseduje i druga potencijalno korisna farmakološka svojstva (antimikrobna, antiinflamatorna, antioksidativna, spazmolitička, antidijabetesna i anksiolitička).</p> <p>Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispituju farmakodinamske osobine preparata timijana, njihove interakcije sa lekovima koji deluju na centralni nervni sistem, uticaj na funkciju jetre i parametre oksidativnog stresa kod životinja izloženih ugljen-tetrahloridu, kao sadržaj karvakrola i timola u sirupu timijna, pri različitim uslovima čuvanja.</p>

U farmakodinamskim ispitivanjima kao eksperimentalne životinje korišćeni su miševi soja NMRI, a u svim drugim ispitivanjima pacovi soja Wistar. Tinktura timijana je primenjena u dozi od 0,4 ml/kg, a sirup u dozi od 12,08 ml/kg, na miševima. Primenjene doze na pacovima su bile 0,18 ml/kg za tinkturu i 5,6 ml/kg za sirup timijana. Za ispitivanje analgetičkog dejstva korišćeni su metod vrele ploče i test sirćetne kiseline. Za procenu motorne koordinacije korišćen je test rotirajućeg štapa, a za procenu hipnotičkog delovanja mereno je vreme spavanja. Prilikom ispitivanja uticaja preparata timijana na farmakokinetiku paracetamola, određivana je koncentracija ovog leka HPLC metodom, a nakon toga su određeni farmakokinetički parametri paracetamola. Antioksidantna aktivnost preparata timijana određivana je pomoću *in vitro* i *in vivo* testova. Nakon žrtvovanja životinja rađena je histopatološka analiza jetrenog tkiva, a u serumu su određivani biohemijski parametri, kao i pokazatelji bubrežne i jetrene funkcije. Sadržaj timola i karvakrola i sirupu timijana određen je GC/MS metodom.

Sirup i tinktura timijana su pokazali analgetički efekat u testu vrele ploče, kao i smanjenje broja grčeva izazvano primenom sirćetne kiseline. Sedmodnevna primena preparata timijana smanjila je analgetičko dejstvo kodeina, a pojačala analgetički efekat paracetamola. Sirup timijana je potencirao diazepamom izazvan poremećaj motorne koordinacije. Ispitivanjem uticaja preparata timijana na hipnotičko delovanje pentobarbitala, postignuti su različiti rezultati u zavisnosti od dužine trajanja pretremana. Sedmodnevna primena timijana je produžila vreme trajanja spavanja, dok je jednokratna primena timijana skratila vreme trajanja spavanja. Nakon i intravenske i peroralne primene paracetamola, grupe životinja koje su bile pretretirane preparatima timijana imale su kraće poluvreme eliminacije i veću konstantu eliminacije. Upotreba samo preparata timijana nije imala uticaj na biohemijske i histološke promene jetrene funkcije. S druge strane, upotreba tinkture timijana u kombinaciji sa ugljen-tetrahloridom dovela je do porasta vrednosti AST i ALT enzima u serumu, dok je sirup timijana u kombinaciji sa ugljen-tetrahloridom smanjio aktivnost aminotransferaza. Najveće odstupanje u koncentracijama aktivnih

	<p>komponenti timola i karavkrola, pokazali su sirupi čuvani na sobnoj temperaturi (20°C), u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu.</p> <p>Rezultati dobijeni u toku ovog istraživanja ukazuju da preparati timijana utiču na farmakodinamske osobine kodeina, paracetamola, diazepama i pentobarbitala, kao i na farmakokinetiku paracetamola. Upotreba preparata timijana ispoljila je analgetički efekat i umanjila posledice izloženosti oksidativnom stresu. Uslovi čuvanja sirupa timijana uticali su na njegovu stabilnost.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP</p>	<p>29.11.2012.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije:  KO</p>	<p>Predsednik: Prof. dr Momir Mikov, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>Član: Prof. dr Ana Sabo, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>Član: Prof. dr Dragan Milovanović, Medicinski fakultet Kragujevac</p> <p>Član: Doc. dr Olga Horvat, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>Član: Doc. dr Nebojša Stilinović, Medicinski fakultet Novi Sad</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**MEDICAL FACULTY OF NOVI SAD**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Maja Kvirgić
Mentor: MN	Associate Professor Aleksandar Rašković
Title: TI	Pharmacological effects of thyme syrup and tincture
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English /Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina

Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	8 chapters, 119 pages, 43 tables, 11 pictures, 23 graphics, 198 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacology
Subject, Key words SKW	Thymus Plant; Plant Extracts; Pharmaceutical Preparations; Antioxidants; Analgesics; Pharmacokinetics; Herb-Drug Interactions; Mice; Rats, Wistar
UC	615.212/.217.015.2:612.085 615.322.015.2:633.8
Holding data: HD	Library of Medical faculty of Novi Sad 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>In recent years is present trend of return to nature and the use of herbal medicines in prevention and treatment of different diseases. Thyme (<i>Thymus vulgaris</i> L.) was used in folk medicine in the treatment of respiratory diseases such as cough, bronchitis and asthma. The new research results have demonstrated that thyme has many others potentially useful pharmacological properties (antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, antispasmodic, antidiabetic and anxiolytic).</p> <p>The aims of this research were to determine the pharmacodynamic properties of thyme preparations and their interactions with central nervous system drugs, influence on liver function and oxidative stress parameters of animals exposed to carbon tetrachloride, as well as concentration of thymol and carvacrol in</p>

thyme syrup, at different storage conditions.

In pharmacodynamics examination as experimental animals were used NMRI mice, while in all other test were used Wistar rats. Applied dose of thyme tincture was 0.4 ml/kg and of syrup 12.08 ml/kg, for mice. For rats, applied doses of tincture and syrup were 0.18 ml/kg and 5.6 ml/kg, respectively. The analgesic activity was examined by the hot plate test and acetic acid test. The Rotarod test was used to evaluate the motor coordination and to evaluate hypnotic activity sleeping time was measured. In order to examine the influence of thyme preparations on pharmacokinetics of paracetamol, the concentration of this drug was measured by HPLC methods, and after that pharmacokinetic parameters of paracetamol were determined. The antioxidant activity of thyme preparations was determined by using *in vitro* and *in vivo* tests. After animals sacrificing, histopathological analysis of liver tissue were performed, in serum were determined biochemical parameters and renal and hepatic function parameters. Quantification of thymol and carvacrol in syrup was carried out by GC/MS method.

Thyme syrup and thyme tincture exhibited analgesic activity in hot plate test and reduced the number of writhes induced by acetic acid. Seven-day pretreatment with thyme preparations reduced analgesic activity of codeine and increased analgesic effect of paracetamol. Thyme syrup potentiated diazepam induced motor coordination impairment. Examining the impact of thyme preparations on hypnotic effect induced by pentobarbital, different results were achieved depending on the duration of pretreatment. Seven-day pretreatment with thyme had prolonged the sleeping time, while after single dose of thyme the sleeping time was decreased. After intravenous and after oral administration of paracetamol, groups pretreated with thyme preparations had decreased elimination half-life and increased elimination constant rate. Administration of thyme preparations alone did not change biochemical nor histological markers of hepatic function. On the other hand, co-administration of thyme tincture and carbon tetrachloride resulted in exacerbation of AST and ALT values in serum, while thyme syrup in co-administration with carbon tetrachloride managed to



	<p>reduce activities of aminotransferases. The concentration of major active compounds, thymol and carvacrol, was mostly changed when syrups were stored at room temperature (20°C), in secondary containers and in light place.</p> <p>Results obtained in this study demonstrated that thyme preparations do affect pharmacodynamic properties of codeine, paracetamol, diazepam and pentobarbital and pharmacokinetics of paracetamol. Administration of thyme preparations exhibited analgesic activity and reduced the effects of exposure to oxidative stress. Storage conditions of thyme syrup did affect its stability.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>29.11.2012.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>President: Professor Momir Mikov, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad</p> <p>Member: Professor Ana Sabo, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad</p> <p>Member: Professor Dragan Milovanović, MD, PhD, Medical faculty of Kragujevac</p> <p>Member: Assistant Professor, Olga Horvat, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad</p> <p>Member: Assistant Professor, Nebojša Stilinović, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad</p>

# Sadržaj

1	UVOD .....	1
1.1	Upotreba lekovitih biljaka u svetu .....	1
1.2	<i>Thymus vulgaris</i> .....	2
1.2.1	Taksonomija.....	2
1.2.2	Opis biljke.....	3
1.2.3	Geografsko poreklo i rasprostranjenost .....	4
1.3	Hemijski sastav .....	4
1.3.1	Etarsko ulje .....	5
1.3.2	Flavonoidi .....	6
1.3.3	Fenolne kiseline .....	8
1.3.4	Triterpeni.....	9
1.4	Farmakološko dejstvo .....	10
1.4.1	Antimikrobna aktivnost .....	10
1.4.2	Antifungalna aktivnost.....	12
1.4.3	Spazmolitička aktivnost.....	13
1.4.4	Antiinflamatorno dejstvo .....	13
1.4.5	Analgetičko dejstvo .....	14
1.4.6	Anksiolitičko dejstvo .....	14
1.4.7	Antioksidativna i hepatoprotektivna aktivnost .....	15
1.4.8	Farmakokinetika .....	16
1.4.9	Toksičnost.....	17
1.5	Značaj ispitivanja.....	18
2	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	19
3	RADNE HIPOTEZE .....	20
4	MATERIJAL I METODE.....	21
4.1	Eksperimentalne životinje.....	21
4.2	Sirup i tinktura timijana .....	21
4.3	Supstance korišćene u eksperimentima .....	23

4.4	Tretman i podela eksperimentalnih grupa.....	24
4.5	Farmakodinamska ispitivanja .....	28
4.5.1	Vrela ploča (Hot plate).....	28
4.5.2	Test sirćetne kiseline (Writhing test) .....	29
4.5.3	Metod rotirajućeg štapa (Rotarod method).....	29
4.5.4	Vreme spavanja (Sleeping time).....	30
4.6	Farmakokinetska ispitivanja .....	30
4.6.1	Prikupljanje uzoraka krvi.....	30
4.6.2	HPLC metoda za određivanje koncentracije paracetamola .....	31
4.7	Uticaj sirupa i tinkture timijana na parametre toksičnosti .....	34
4.7.1	Biohemijska ispitivanja.....	34
4.7.2	<i>In vitro</i> ispitivanje antioksidativne aktivnosti tinkture timijana .....	34
4.7.3	<i>In vivo</i> ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	36
4.8	Morfološka ispitivanja .....	37
4.9	Stabilnost sirupa timijana.....	37
4.10	Statistička obrada podataka.....	39
5	REZULTATI.....	41
5.1	Hemijska analiza sirupa i tinkture timijana .....	41
5.2	Farmakodinamska ispitivanja .....	44
5.2.1	Vrela ploča - Analgetički efekat .....	44
5.2.2	Interakcije sa paracetamolom .....	45
5.2.3	Interakcije sa kodeinom .....	49
5.2.4	Test sirćetne kiseline (Writhing test) .....	53
5.2.5	Test rotirajućeg štapa (Rotarod method).....	54
5.2.6	Vreme spavanja (Sleeping time).....	55
5.3	Farmakokinetska ispitivanja .....	57
5.4	Biohemijska i toksikološka ispitivanja .....	62
5.4.1	Lipidni status.....	62
5.4.2	Parametri jetrene funkcije.....	63
5.4.3	Parametri bubrežne funkcije .....	64
5.5	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	65

5.5.1	<i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost.....	65
5.5.2	<i>In vivo</i> antioksidativna aktivnost .....	67
5.6	Morfološka ispitivanja .....	74
5.7	Stabilnost sirupa timijana.....	77
6	DISKUSIJA.....	88
6.1	Hemijska analiza sirupa i tinkture timijana .....	88
6.2	Analgetičko delovanje i interakcije sa paracetamolom i kodeinom .....	88
6.3	Interakcije sa diazepamom i pentobarbitalom .....	92
6.4	Farmakokinetička ispitivanja .....	93
6.5	Uticaj na biokemijske parametre .....	95
6.6	Antioksidativna aktivnost .....	98
6.7	Ispitivanje stabilnosti sirupa timijana .....	102
7	ZAKLJUČCI.....	103
8	LITERATURA.....	104

# 1 UVOD

## 1.1 Upotreba lekovitih biljaka u svetu

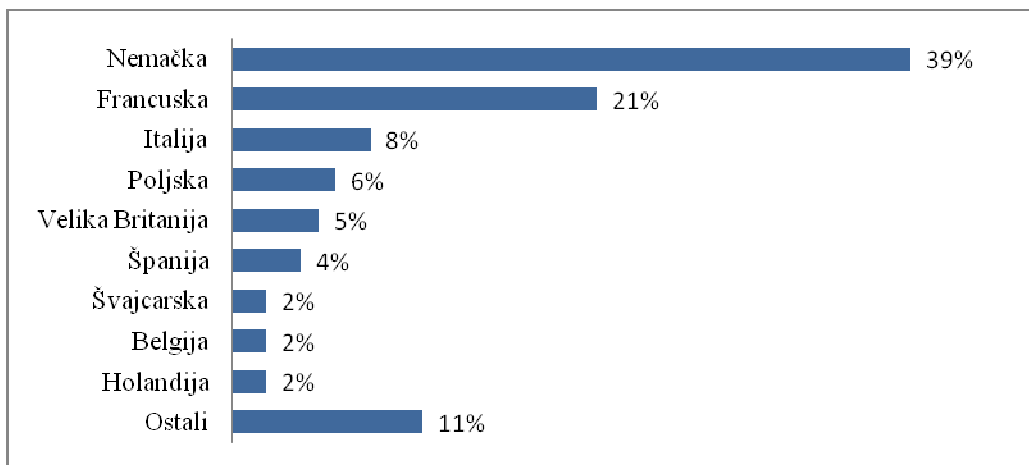
Upotreba biljaka u ishrani i lečenju stara je koliko i samo čovečanstvo. Prvi pisani dokumenti o upotrebi biljaka u lečenju zabeleženi su 3000. godine p.n.e. i potiču iz Kine. Takođe, podaci i mnogih drugih naroda, kao što su Indusi, Egipćani, Grci, Sumeri, stari Rimljani, govore o korišćenju biljaka u terapijske svrhe (Tucakov J, 1997). Veština lečenja biljem razvijala se kod svih naroda i sačuvala se, više ili manje, kao tradicionalna ili narodna medicina sve do danas. Mnoge biljke koje su se vekovima upotrebljavale u tradicionalnoj medicini, prihvaćene su i danas, i predstavljaju važne lekovite sirovine u savremenoj medicini (Lukić P, 1993).

Fitoterapija predstavlja kombinaciju znanja tradicionalne i konvencionalne medicine. Kao terapijski agensi koriste se biljne droge, odnosno preparati biljnih droga. Racionalna fitoterapija predstavlja najsavremeniji oblik fitoterapije. Zasnovana je na dokazima i podrazumeva lečenje, ublažavanje i prevenciju bolesti primenom biljnih lekova čija je terapijska efikasnost dokazana kliničkim ispitivanjima. Ovi preparati podležu svim zahtevima za farmaceutski kvalitet lekova (Kovačević N, 2002; Petrović S, 2012).

Poslednjih godina, kako u svetu tako i u našoj zemlji, značajan je trend povratka prirodi i upotreba biljnih lekova je sve više zastupljena, kako u prevenciji tako i u lečenju različitih bolesti. Razlozi popularizacije biljnih lekova su moguća neželjena dejstva hemijskih lekova, nedostatak adekvatne terapije za pojedine hronične bolesti, antimikrobna rezistencija, kao i dugotrajna i skupa istraživanja i razvoj u fazi otkrića lekova (eng. *Pharmaceutical Research and development*) (Pan S, 2010). Regulatorna tela postavljaju sve veće zahteve u pogledu podataka o efikasnosti i neželjenim efektima lekova, tako da je od 1950. godine odobreno samo 1.200 novih lekova od strane američke Agencija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*) (Munos B, 2009).

Za veliki deo svetske populacije, proizvodi na bazi biljaka predstavljaju prvi izbor u samolečenju manjih zdravstvenih problema. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), u većini zemalja u razvoju, preparate na bazi lekovitog bilja koristi 70-95% stanovništva. Takođe, u industrijski razvijenim zemljama kao što su Kanada, Nemačka, Italija i Francuska,

upotreba biljnih lekova je značajna, jer između 70% i 90% stanovnika koristi ove lekove (WHO, 2011). Usled porasta potražnje za biljnim lekovima, raste njihova proizvodnja i prodaja, a ispitivanja tržišta pokazuju da je godišnja stopa rasta prodaje biljnih lekova na globalnom nivou između 5-18% (Calixto JB, 2000). Vrednost prodaje biljnih lekova u Evropi 2003. godine, iznosila je 4,96 milijarde američkih dolara (USD). Vodeća zemlja u proizvodnji i potrošnji je Nemačka, a odmah posle nje slede Francuska i Italija (Slika 1) (Smet P, 2005).



**Slika 1.** Zastupljenost prodaje biljnih lekova u Evropi, 2003.

Postojanje velikog broja različitih biljnih vrsta i njihova nedovoljna ispitanost, su i dalje interesantni naučno-istraživačkim timovima širom sveta. Veliki broj studija koje imaju za cilj da ispituju bezbednost i terapijsku efikasnost biljaka su od velikog naučnog i praktičnog značaja, jer vode ka novim naučnim saznanjima o dejstvu njihovih aktivnih principa.

## 1.2 *Thymus vulgaris*

### 1.2.1 Taksonomija

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) pripada porodici *Lamiaceae* i rodu *Thymus*. U okviru familije *Lamiaceae* (Usnatice) nalazi se oko 240 rodova i preko 7.200 vrsta (Braüchler C, 2010). Rod *Thymus* jedan je od najznačajnijih rodova u okviru familije *Lamiaceae*. U zavisnosti od literaturnih izvora, broj vrsta unutar ovog roda varira od 215 do 350 (Cronquist A, 1988; Zaidi MA, 2005).

Taksonomija biljke timijan (*Thymus vulgaris* L.) data je u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Taksonomija biljke timijan (*Thymus vulgaris* L.)

<i>Regnum</i> (carstvo)	<i>Plantae</i>
<i>Divisio</i> (razdeo)	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clasis</i> (klasa)	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i> (red)	<i>Lamiales</i>
<i>Familia</i> (porodica)	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genus</i> (rod)	<i>Thymus</i>
<i>Species</i> (vrsta)	<i>Thymus vulgaris</i>

### 1.2.2 Opis biljke

Timijan (Slika 2) je višegodišnja polužbunasta, zeljasta biljka. Odlikuje se jakim i razgranatim korenovim sistemom. Iz korena se razvijaju uglavnom uspravne stabljike visine od 25–50 cm. Stabljike su uspravne i u donjem delu odrvenele. Listovi su sitni i naspramno raspoređeni. Dugi su 5-10 mm, a široki 2-3 mm. List timijana je tamno zelene boje na licu, a svetlije na naličju. Listovi koji se nalaze na sredini i u gornjem delu cvetnih grana su na licu goli, a na naličju dlakavi. Cvetovi su sitni, beloružičasti do ljubičasti, razvijaju se u pazuhu listova čineći rastresitu cvast. Cvasti su izdužene, a čašica i krunica su pokrivene žlezdama koje luče etarsko ulje. Seme je sitno, od 0,5 do 1 mm, a sazreva u periodu od jula do septembra (Kovačević N, 2002; Gorunović M, 2001; Stepanović B, 2011).



**Slika 2.** *Thymus vulgaris* L.

O poreklu imena *Thymus* postoji nekoliko pretpostavki. Neki autori smatraju da je latinski naziv *Thymus* izveden iz grčke reči *thyo* (miris), dok drugi smatraju da potiče od grčke reč *thymos* što znači snaga, hrabrost. Prvobitno se reč “thymus” koristila za aromatične biljke sa sličnim karakteristikama, koje su se upotrebljavale za stimulaciju vitalnih funkcija (Stahl-Biskup E, 2002). U narodu, timijan je poznat i kao pitoma nana, gajena nana, manja mažurana, majčina dušica, manji sanseg, timljan, timas (Tucakov J, 1997).

### **1.2.3 Geografsko poreklo i rasprostranjenost**

Predstavnici familije *Lamiaceae* široko su rasprostranjeni na Zemljinoj kugli i mogu se naći na svim kontinentima osim Arktika (Braüchler C, 2010). Timijan vodi poreklo sa zapadnog Mediterana (severna Italija, južna Francuska, istočna Španija) (Morales R, 1997). Pored toga, u mnogim zemljama u Evropi, Aziji, Africi i Severnoj Americi, gaji se kao lekovita i začinska biljka. Kod nas, timijan se gaji uglavnom u Vojvodini. Timijan dosta dobro podnosi visoke letnje temperature, a relativno je otporan i na mrazeve u toku zime. Najviše mu odgovaraju suvi, osunčani i od vetra zaštićeni tereni (Stepanović B, 2011).

### **1.3 Hemijski sastav**

Hemijski sastav biljaka je složen i kod mnogih je još uvek nedovoljno istražen. Biljke sintetišu i luče različita jedinjenja, poznata po nazivu biljni metaboliti. Biljni metaboliti mogu se podeliti u dve grupe: na primarne i sekundarne. Primarni metaboliti omogućuju osnovne funkcije u ćeliji i esencijalni su za rast i razvoj. U primarne metabolite spadaju ugljeni hidrati, masti, proteini i nukleinske kiseline. Ranije se smatralo da sekundarni metaboliti nisu bitni za rast i razvoj biljaka, međutim novija istraživanja potvrđuju njihovu ulogu u razvoju biljaka, posebno u prilagođavanju i preživljavanju u nepovoljnim uslovima (Kliebenstei DJ, 2012). Većina farmakološki aktivnih sastojaka biljaka pripada sekundarnim metabolitima. Sekundarni metaboliti se još nazivaju i fitohemikalije, odbrambeni metaboliti i bioaktivne komponente (Kabera JN, 2014; Kliebenstei DJ, 2012). Sekundarne metabolite karakteriše velika strukturna raznovrsnost. Do sada je otkriveno preko 150.000 različitih sekundarnih metabolita, a taj broj se stalno povećava (Wink M, 2003).



### 1.3.1 Etarsko ulje

Etarska ulja, odnosno eterična ili esencijalna ulja, su lipofilni, isparljivi i najčešće tečni produkti biljnog tkiva. Predstavljaju smeše različitih isparljivih monoterpena, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja (Kovačević N, 2002). Sinteza i sekrecija etarskog ulja odvija se u posebnim biljnim strukturama koje se mogu podeliti na spoljne i unutrašnje sekretorne strukture. Spoljne sekretorne strukture su žlezdane dlake i osmofore, a unutrašnje sekretorne strukture su uljane ćelije, sekretorne šupljine i sekretorni kanali. Kod predstavnika porodice *Lamiaceae* sinteza etarskog ulja odvija se u žlezdanim dlakama (Kostić I, 2012). Biljke koje sadrže etarska ulja nazivaju se aromatične biljke. Najpoznatije aromatične biljke pripadaju porodicama: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Laureaceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Rutaceae* i *Zingiberaceae*.

U pogledu hemijskog sastava etarskog ulja jedne iste biljne vrste mogu se javiti velike varijacije. Ovakva varijabilnost omogućava pojavu različitih hemijskih rasa, odnosno hemotipova. Najznačajniji faktori koji utiču na količinu i sastav etarskog ulja neke biljne vrste su genotip, faza ontogenetskog razvoja, faktori sredine (stanište, klima), vreme berbe i način obrade biljne sirovine (Kovačević N, 2002; Peter KV, 2012). Hemijskim ispitivanjem vrste *Thymus vulgaris* utvrđeno je postojanje 6 hemotipova, koji su dobili naziv po najzastupljenijoj komponenti etarskog ulja: timol, karvakrol, geraniol, linalool,  $\alpha$ -terpinol i tujanol-4. Timol i karvakrol su fenolni hemotipovi i zastupljeni su u toplim i suvim staništima, dok su nefenolni hemotipovi (geraniol, linalool,  $\alpha$ -terpinol i tujanol-4) prisutni na staništima sa hladnijom i vlažnijom klimom, uglavnom iznad 400 m nadmorske visine (Thompson JD, 2003; Passet J, 1971).

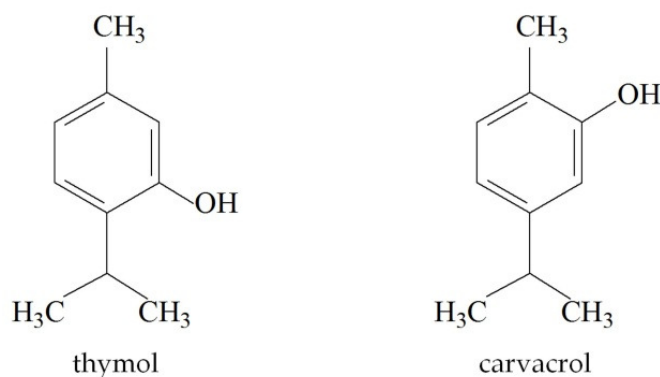
Etarsko ulje timijana, *Thymi aetheroleum*, dobija se iz svežih listova i herbe timijana, destilacijom vodenom parom. To je lako pokretljiva žuto-crvena tečnost, ljutog ukusa i specifičnog, aromatičnog fenolnog mirisa (Kovačević N, 2002).

Sadržaj etarskog ulja *T. vulgaris* kreće se u rasponu od 0,32% do 4,9% (Carlen C, 2010). Glavni sastojci etarskog ulja timijana su monoterpenski fenoli timol i karvakrol, a u većim koncentracijama zastupljeni su i borneol, p-cimen, linalool,  $\gamma$ -terpinen,  $\beta$ -mircen i terpinen-4-ol (EMA 2009; EMA 2013; Czygan FC, 2004).

**Timol** je 2-izopropil-5-metilfenol (Slika 3). Predstavlja bezbojne kristale. Teško se rastvara u vodi, a dobro se rastvara u etanolu, etil-eteru i sirćetnoj kiselini (PubChem, 2014). Timol je fenolni derivat cimena i izomer karvakrola. Koristi se kao antiseptik u medicini,

kozmetici i prehrambenoj industriji (Nabavi SM, 2015; Szentandrásy N, 2003; Aeschbach R, 1994). Timol poseduje antimutageno, antikancerogeno, antioksidanto, antiinflamatorno i anksiolitičko dejstvo (Deb D, 2011; Bhalla Y, 2013; Lee SJ, 2005; Braga PC, 2006; Bhandari SS, 2014). Takođe, istraživanja su pokazala da timol ima i snažno baktericidno i fungicidno dejstvo (Gehan IK, 2012; Ogaard B, 1997; Twetman S, 1995; Xu J, 2008). Prisutan je kod većine predstavnika familije *Lamiaceae*.

**Karvakrol** je 5-izopropil-2-metilfenol (Slika 3). To je bezbojna do žućkasta viskozna tečnost. Teško se rastvara u vodi, a dobro u etanolu, etil-etru, bazama i acetonu (PubChem, 2014). Ispitivanja pokazuju da karvakrol poseduje antibakterijsku, antifungicidnu, anksiolitičku, antioksidantnu i antikancerogenu aktivnost (Ultee A, 2002; Chami N, 2004; Koparal AT, 2003; Xu J, 2008; Yanishlieva NV, 1999; Sousa JP, 2012; Aristatile B, 2009; Melo FH, 2010). Takođe, karvakrol deluje hepatoprotektivno i antiinflamatorno (Baser KH, 2008; Hajhashemi V, 2002; Hotta M, 2010). Zastupljen je kod predstavnika familije *Lamiaceae* koji pripadaju rodovima *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* i *Cardiothymus* (Koparal AT, 2005).

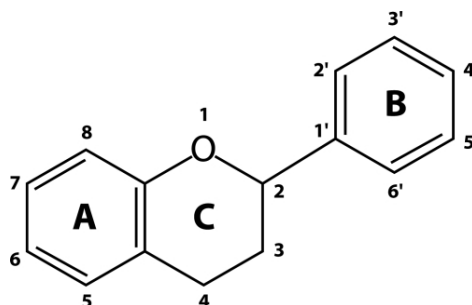


**Slika 3.** Strukturne formule timola i karvakrola

### 1.3.2 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu fenolnih jedinjenja. Osnovnu strukturu flavonoida čini 15 atoma ugljenika u osnovnoj C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturi. Devet ugljenikovih atoma pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), dok ostalih šest čini benzenski prsten B (Slika 4). Flavonoide karakteriše raznovrsnost i veliki

broj struktura usled brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura, kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i glikolizacija hidroksilnih grupa ili flavonoidnog jezgra. Do danas je identifikovano više od 8.000 flavonoida (Kuntić V, 2014). U zavisnosti od stepena oksidacije centralnog piranovog prstena, podeljeni su u nekoliko grupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanoli i antocijani (Anand P, 2013).

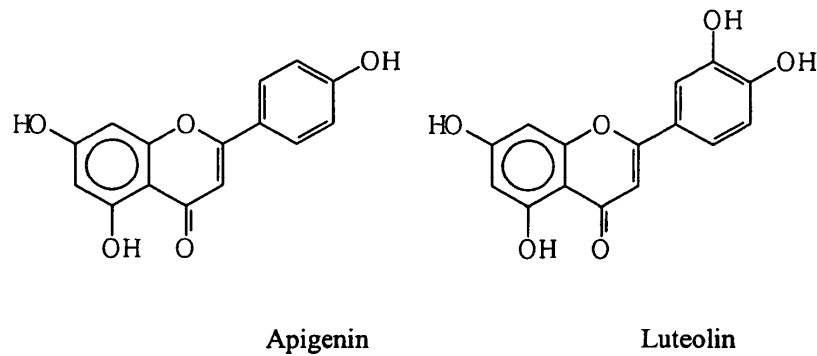


**Slika 4.** Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi imaju različita biološka i farmakološka dejstva. Utvrđeno je da poseduju antiinflamatornu, antivirusnu, antioksidantnu i antialergijsku aktivnost. Antioksidantno delovanje prvenstveno ostvaruju otpuštanjem vodonika i “hvatanjem” slobodnih radikala. Na antioksidativno delovanje flavonoida utiču njihove strukturne karakteristike (Rice-Evans CA, 1996; Heim KE, 2002; Silva M, 2002; Kazazić PD, 2004):

- ✓ *orto*-dihidroksilna (kateholna) grupa u B prstenu daje stabilnost radikalima i omogućuje delokalizaciju elektrona;
- ✓ dvostruka veza između C2 i C3 ugljenikovog atoma i prisustvo 4-keto grupe u C prstenu omogućuju delokalizaciju elektrona iz B prstena;
- ✓ hidroksilne grupe na položaju C3 i C5 i 4-keto grupe u A prstenu i C prstenu obezbeđuju maksimalni efekat “hvatanja” slobodnih radikala.

U timijanu je identifikovano 25 različitih flavonoida, od kojih su najzastupljeniji luteolin, apigenin i 6-hidroksiluteolin (EMA 2013; Czygan FC, 2004; Vila R, 2002). Luteolin i apigenin poseduju antiinflamatorno dejstvo (Lee JH 2007; Funakoshi-Tago M, 2011), kao i antioksidantno i antikancerogeno delovanje (Shukla S, 2010; Lopez-Lazaro M, 2009).



**Slika 5.** Strukturne formule apigenina i luteolina

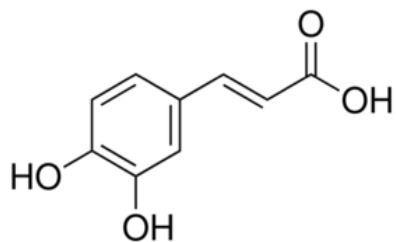
### 1.3.3 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline (fenolkarbonske kiseline) čine sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Nastaju iz acetata, biosintetskim putem preko šikiminske kiseline. Fenolne kiseline se dele na dve osnovne grupe: na derivate benzojeve kiseline (C6-C1) i derivate cimetne kiseline (C6-C3). Sve više pažnje se poklanja proučavanju hemijske strukture i farmakološkog delovanja fenolnih kiselina i njihovih glikozida (Kovačević N, 2002). Fenolne kiseline imaju antimikrobnu, antiinflamatornu, antikancerogenu i antioksidantnu aktivnost (Gulcin I, 2006; Boonyarikpunchai W, 2014; Guo X, 2013; Stojković D, 2013).

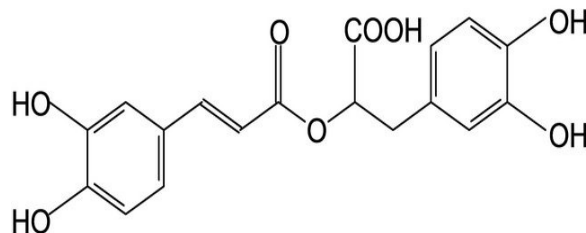
Antioksidantna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa. Uvođenje druge hidroksilne grupe u *ortho*- ili *para*- položaj, kao i uvođenje jedne ili dve metoksi grupe u *ortho*- položaj, u odnosu na hidroksilnu grupu, znatno povećava antioksidantni potencijal (Fukumoto LR, 2000; Silva FA, 2000). Takođe, na antioksidantnu aktivnost fenolnih kiselina utiče i položaj karboksilne grupe. Ova grupa ima negativan uticaj na donorske sposobnosti hidroksibenzojeve kiseline i njenih derivata. Usled konjugacije aromatičnog prstena sa propanskim bočnim nizom, kod derivata cimetne kiseline, nastaju stabilniji slobodnoradikaliski intermedijeri. Iz ovog razloga, derivatima cimetne kiseline se pripisuje jače antioksidantno delovanje u odnosu na derivate benzojeve kiseline (Siquet C, 2006).

Od fenolnih kiselina u timijanu su prisutne kafena kiselina i rozmarinska kiselina (EMA 2013; Czygan FC, 2004). Kafena kiselina (Slika 6) je 3,4-dihidroksi cimetna kiselina i

najzastupljeniji je derivat cimetine kiseline u biljnom svetu (Dai J, 2010). Rozmarinska kiselina je ester kafeine kiseline i 3,4-dihidroksifenil mlačne kiseline (Slika 7).



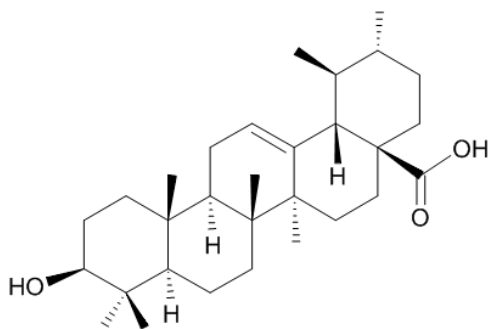
**Slika 6.** Kafena kiselina



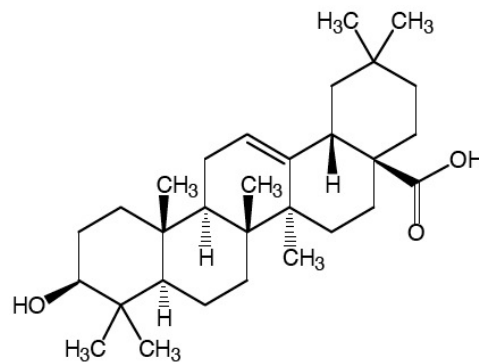
**Slika 7.** Rozmarinska kiselina

### 1.3.4 Triterpeni

Do sada je izolovano preko 4.000 triterpenskih jedinjenja iz biljaka. Javljaju se kao slobodna lipofilna jedinjenja, kao sapogenini ili kao sastojci smola (Kovačević N, 2002). Triterpeni koji se mogu naći u sastavu timijana su ursolna kiselina (1,9%) i oleanolna kiselina (0,6%) (PDR 2007; EMA 2013; Czygan FC, 2004).



**Slika 8.** Oleanolna kiselina



**Slika 9.** Ursolna kiselina

## 1.4 Farmakološko dejstvo

Medicinski značaj timijana poznat je od davnina. Prvi pisani podaci o upotrebi timijana u medicinske svrhe datiraju još iz 1589. godine (*Dispensatorium Noricum*, citirano u Gildemeister, 1961). Timijan se u narodnoj medicini koristio u lečenju respiratornih oboljenja kao što su kašalj, bronhitis i astma. Takođe, koristio se kao antiseptik, analgetik i kao karminativ, jer sprečava fermentaciju i oslobađanje gasova, a istovremeno poboljšava varenje (PDR, 2007). Prvi preparat, koji kao aktivnu supstancu sadrži samo etarsko ulje timijana, pojavio se u Nemačkoj 1976. godine. S obzirom da se timijan više od 30 godina koristi u medicinske svrhe i da postoji dovoljno podataka o tradicionalnoj upotrebi, može se smatrati tradicionalnim biljnim lekom (EMA, 2009).

U mnogim zemljama primena timijana kao zvanične droge u terapiji različitih oboljenja odobrena je od strane nacionalnih komisija za registraciju biljnih preparata. Nemačka komisija E, telo obrazovano od strane Ministarstva zdravlja sa ciljem da ispita opravdanost upotrebe tradicionalnih biljnih lekova, odobrila je timijan za upotrebu u terapiji kašlja i bronhitisa (PDR, 2007). Evropska medicinska agencija (*European Medicines Agency*, EMA) navodi da se timijan, kao tradicionalni biljni lek, koristi kao ekspektorans kod kašlja praćenog prehaldom. S obzirom da nema pouzdanih podataka o upotrebi timijana u periodu trudnoće i dojenja, ne preporučuje se njegova primena (EMA, 2013).

Rezultati novijih istraživanja pokazuju da timijan poseduje antimikrobno, antifungalno, antiinflamatorno, antioksidativno, spazmolitičko, antidijabetesno i anksiolitičko dejstvo (Ultee A, 2002; Bakkali F, 2008; Aristatile B, 2009; Braga PC, 2007; Guimaraes AG, 2012; Hotta M, 2010; Boskabady MH, 2006; Ozkol, 2013; Melo FH, 2010). Pored upotrebe u farmaceutskoj industriji, timijan se koristi i u prehrambenoj, kao začim, i kozmetičkoj industriji, jer ulazi u sastav parfema, sapuna i pasti za zube.

### 1.4.1 Antimikrobna aktivnost

Poslednjih godina bakterijske infekcije su sve učestalije usled porasta rezistencije mikroorganizama na sintetičke antibiotike. Upravo zato raste interesovanje za prirodnim antimikrobnim agensima. Posebno velika pažnja pridaje se aromatičnim biljkama, s obzirom da se zna da etarska ulja imaju snažno antimikrobno delovanje (Bakkali F, 2008).

Tačan mehanizam delovanja etarskih ulja na mikroorganizme još uvek nije poznat. S obzirom da se etarska ulja sastoje od više različitih hemijskih komponenti, pretpostavlja se da se njihova aktivnost ne zasniva samo na jednom specifičnom mehanizmu. Zahvaljujući svojoj hidrofilnoj prirodi, etarska ulja se rastvaraju u dvoslojnoj lipidnoj membrani bakterija i povećavaju njenu permeabilnost. Kao rezultat, dolazi do izlaska jona, lize i smrti ćelije. Smatra se da su za oštećenje ćelijske membrane odgovorna fenolna jedinjenja sa hidroksilnom grupom, kao što su karvakrol i timol (Ultee A, 2002; Bakkali F, 2008). Rezultati istraživanja su pokazali da etarska ulja mogu i na druge načine ostvariti svoje anitmikrobno dejstvo, delovanjem na enzime i genetski materijal mikroorganizama (Bakkali F, 2008).

U mnogim publikovanim radovima etarska ulja timijana su pokazala dobra antimikrobna svojstva. Antibakterijsko dejstvo timijana dokazano je na sledeće rodove: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled podataka u literaturi o antimikrobnoj aktivnosti timijana

Vrsta bakterije	Referenca
<i>Bacillus cereus</i>	Ultee A, 2002; Stanković N, 2011; Tohidpour A, 2010;
<i>Bacillus subtilis</i>	Dorman HJD, 2000;
<i>Escherichia coli</i>	Inouye S, 2001; Jugl-Chizzola M, 2005; Xu J, 2008; Dorman HJD, 2000; Stanković N, 2011; Tohidpour A, 2010; Abu-Darwish MS, 2012;
<i>Helicobacter pylori</i>	Esmaeli D, 2013;
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dorman HJD, 2000; Tohidpour A, 2010;
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oliviera MMM, 2013;
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abu-Ghazaleh BM, 2010; Stanković N, 2011; Abu-Darwish MS, 2012;
<i>Streptococcus aureus</i>	Inouye S, 2001; Dorman HJD, 2000; Stanković N, 2011; Tohidpour A, 2010; Abu-Darwish MS, 2012;
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Inouye S, 2001;
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Inouye S, 2001; Sfeir J, 2013;

### 1.4.2 Antifungalna aktivnost

Veliki broj sintetičkih fungicida je zabranjen u mnogim zemljama zbog njihove toksičnosti, dugog perioda degradacije i neselektivnog delovanja. Upravo zato, ispitivanje antifungalnog dejstva biljnih ekstrakata i etarskih ulja sve više dobija na značaju.

Za etarsko ulje timijana pokazano je da ostvaruje i značajnu antifungalnu aktivnost. Za antifungalnu aktivnost timijana najznačajnija su fenolna jedinjenja, timol i karvakrol. Dokazano je da timijan deluje na *Candidu albicans* tako što timol sprečava stvaranje hifa. Takođe je utvrđeno da timol i eugenol deluju sinergistički u inhibiciji rasta *C.albicans* (Braga PC, 2007). Kombinacija etarskog ulja timijana i amofotericina B deluje antagonistički, tako da autori ove studije savetuju oprez pri upotrebi ove kombinacije u terapiji kandidate (Vuuren SF, 2009).

Pored *C.albicans*, antifungalna aktivnost timijana dokazana je i na: *Aspergillus flavus*, *Aspergillu niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Penecillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton tonsurans* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Pregled podataka u literaturi o antifungalnoj aktivnosti timijana

Vrsta gljivice	Referenca
<i>Aspergillus flavus</i>	Centeno S, 2010; Khan MS, 2014; Šegvić Klarić M, 2007;
<i>Aspergillu niger</i>	Khan MS, 2014; Šegvić Klarić M, 2007; Gehan IK, 2012;
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Centeno S, 2010; Soliman KM, 2002;
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Soliman KM, 2002;
<i>Candida albicans</i>	Braga PC, 2007; Chami N, 2004; Tullio, 2012;
<i>Fusarium moniliforme</i>	Soliman KM, 2002;
<i>Fusarium oxysporum</i>	Gehan IK, 2012;
<i>Penecillium digitatum</i>	Gehan IK, 2012;
<i>Rhizoctonia solani</i>	Gehan IK, 2012;
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Soković M, 2008;
<i>Trichophyton rubrum</i>	Soković M, 2008; Khan MS, 2014;
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Soković M, 2008;



### 1.4.3 Spazmolitička aktivnost

Primena timijana u lečenju bolesti respiratornog trakta ima dugogodišnju tradiciju. Timijan poseduje bronholitički, sekretomotorni i spazmolitički efekat, tako da se koristi u terapiji bronhitisa, kod inflamacije respiratornog trakta i u terapiji kašlja (EMA, 2013).

Spazmolitička aktivnost timijana proučavana je *in vitro* na modelu glatkih mišića izolovanog svinjskog ileuma i traheje pacova. Dokazano je da je ekstrakt timijana nekompetitivni antagonist specifičnih agonista (acetilholina, histamina, noradrenalina) i nespecifičnih agonista, kao što je barijum-hlorid (Broucke, 1983). Ispitivanjem vodenog ekstrakta timijana pokazano je da relaksira kontrakcije traheje izazvane kalijum-hloridom. Ovaj ekstrakt izazvao je dozno-zavisno relaksantno delovanje (Boskabady MH, 2006). Ispitivanja metanolnog ekstrakta timijana, takođe su pokazala dozno-zavisni spazmolitički efekat (Babaei M, 2008).

### 1.4.4 Antiinflamatorno dejstvo

Timijanu se pripisuje i antiinflamatorno delovanje. U mnogim studijama uočeno je da je za antiinflamatorno dejstvo odgovoran karvakrol, ali tačan mehanizam delovanja još uvek nije utvrđen (Botelho MA, 2009; Guimaraes AG, 2012; Hotta M, 2010; Fachini-Queiroz, 2012).

Hotta i saradnici su ispitivali antiinflamatorno delovanje timijana i uočili da je karvakrol zaslužan za to dejstvo. Karvakrol aktivira peroksizomalni proliferišući aktivirani receptor (eng. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*, PPAR), odnosno PPAR- $\alpha$  i PPAR- $\gamma$ . Ovi receptori pripadaju nuklearnim receptorima i učestvuju u metabolizmu lipida i ugljenih hidrata, u proliferaciji ćelija, kao i u inflamaciji. Pored toga, karvakrol dovodi do supresije enzima ciklooksigenaza-2 (COX-2), enzima koji učestvuje u biosintezi prostaglandina i enzima koji se indukuje u inflamatornim ćelijama pod dejstvom inflamatornog stimulusa (Hotta M, 2010).

Timijan dobijen ekstrakcijom superkričnim ugljen-dioksidom (CO<sub>2</sub>), takođe je pokazao antiinflamatorno dejstvo. Ekstrakt timijana smanjio je produkciju i gensku ekspresiju proinflamatornih citokina: faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i interleukina-6 (IL-6), dok je sekrecija antiinflamatornog citokina interleukina-10 (IL-10) bila povećana (Ocana A, 2012).

#### 1.4.5 Analgetičko dejstvo

Taherian i saradnici ispitivali su potencijalno analgetičko dejstvo timijana. Prilikom ispitivanja koristili su vodeno-alkoholni ekstrakt timijana. Rezultati istraživanja pokazali su da je timijan efikasan u suzbijanju bola, kako hroničnog tako i akutnog, ali se ne navodi mehanizam njegovog analgetičkog delovanja (Taherian AA, 2009).

Prilikom ispitivanja farmakološke aktivnosti karvakrola utvrđeno je da se nakon njegove intraperitonealne primene postiže analgetičko dejstvo. Karvakrol je inhibisao bol izazvan kapsaicinom kod ispitivanih životinja (Guimaraes AG, 2010). Takođe, u jednoj drugoj studiji, karvakrol je i nakon peroralne primene u dozama iznad 50 mg/kg pokazao značajno analgetičko dejstvo (Melo FH, 2012).

U pojedinim istraživanjima utvrđeno je i da (-)-linalool, monoterpenški alkohol, poseduje analgetičko dejstvo. Potvrđeno je da deluje na nekoliko receptora: na opioidne receptore, adozin A1 i A2 receptore, kao i na holinergičke M2 receptore (Pena AT, 2006; Sousa DP, 2011).

#### 1.4.6 Anksiolitičko dejstvo

*In vivo* ispitivanja pokazala su da karvakrol poseduje i anksiolitičko dejstvo. Melo i saradnici sprovedi su istraživanje na miševima. Karvakrol je primenjen *per os* u tri različite doze (12,5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg), a kao standardi za upoređivanje efekta korišćeni su diazepam (1 mg/kg, 2 mg/kg) i flumazenil (2,5 mg/kg). Rezultati studije pokazali su da karvakrol poseduje anksiolitičko dejstvo, bez uticaja na san i bez miorelaksantnog delovanja (Melo FH, 2010).

Rezultati novijih istraživanja pokazali su da i timol poseduje anksiolitički efekat. Nakon intraperitonealne primene timola u dozi od 20 mg/kg, kod ispitivanih životinja postignut je anksiolitički efekat. Kao mogući mehanizmi anksiolitičkog dejstva navode se modulacija GABA (gama-aminobuterna kiselina) i/ili NO-cGMP (azot oksid-ciklični guanozin monofosfat) i/ili 5-HT (hidroksitriptamin) puteva (Bhandari SS, 2014).

#### 1.4.7 Antioksidativna i hepatoprotektivna aktivnost

Antioksidansi se definišu kao supstance koje, prisutne u malim količinama, u odnosu na supstrat podložan oksidaciji (dezoksiribonukleinska kiselina (DNK), lipidi, proteini, ugljeni hidrati) usporavaju ili inhibiraju oksidativna oštećenja ciljanih molekula (Halliwell B, 1995). Oksidativni stres je ćelijsko oštećenje koje nastaje kada postoji višak reaktivnih oblika kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i/ili je smanjen antioksidativni nivo, odnosno kada se naruši ravnoteža između prooksidativnih i antioksidativnih faktora (Marnett LJ, 2000; Ramchoun M, 2009). Brojna istraživanja su pokazala da antioksidansi biljnog porekla mogu imati veliki značaj u prevenciji i terapiji različitih bolesti izazvanih usled oksidativnog stresa (Ramchoun M, 2009).

Smatra se da su za antioksidantnu aktivnost uglavnom odgovorni monoterpenski fenoli, timol i karvakrol. Međutim, u skorijim istraživanjima je pokazano i da fenolna kiselina (rozmarinska kiselina) i flavonoidi (kvercetin, eriocitrin luteolin, apigenin) poseduju značajan antioksidantni efekat, u ispitivanim vodenim i etanolnim ekstraktima (Mihailović-Stanojević N, 2013).

Antioksidantna aktivnost timijana potvrđena je u različitim *in vitro* ispitivanjima (Youdim KA, 1999; Dorman HJD, 2000; Kulišić T, 2007; Aristatile B, 2009). Etarska ulja, koja u svom sastavu sadrže veću količinu monoterpenskih fenola, timola i/ili karvakola, pokazuju bolju antioksidantnu aktivnost (Jukić M, 2005; Chizzola R, 2008). Redukujuća svojstva fenolnih komponenti omogućavaju adsorpciju i neutralizaciju slobodnih radikala (Čančarević A, 2013).

Leo i saradnici su ispitivali antioksidantno dejstvo ekstrakta timijana u odnosu na sintetske antioksidanse, butilhidroksitoluen (BHT) i  $\alpha$ -tokoferol. Kao glavne komponente timijana identifikovani su: timol (8,55 mg/g), karvakrol (0,681 mg/g), linalool (0,471 mg/g),  $\alpha$ -terpineol (0,291 mg/g) i 1,8-cineol (0,245 mg/g). Rezultati ove studije su pokazali da timijan poseduje jaču antioksidantnu aktivnost u poređenju sa ispitivanim sintetskim antioksidansima (Lee SJ, 2005).

Kada je u pitanju dejstvo timijana i njegovih aktivnih komponenti na jetru, u naučnoj literaturi se mogu naći oprečna mišljenja. Iako timijan poseduje takozvani GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*) za upotrebu u ishrani, što znači da se smatra bezbednim, postoje podaci koji ukazuju da dugotrajna primena ili visoke doze preparata timijana kao što su tinkture i etarska ulja, a koja sadrže timol i karvakrol u velikim koncentracijama, mogu biti hepatotoksični

(Kraft K, 2004). Upotreba ovih preparata može da pogorša već postojeća oštećenja jetre kod ljudi (Posadzki P, 2013).

S druge strane, hepatoprotektivni efekat timijana je dokazan na brojnim eksperimentalnim modelima oštećene jetre u različitim istraživanjima. Etanolni i metanolni ekstrakti timijana su se pokazali kao efikasni u oksidativnim oštećenjima jetre indukovanim aflatoksinom i N-nitrozodietilaminom (NDEA) (Abdel-Aziem SH, 2014; Rana P, 2008). Ekstrakt timijana kao i etarsko ulje poboljšali su stanje oštećene jetre pacova izazvano primenom ugljen-tetrahlorida (Al-Badr NA, 2011). Takođe, hepatoprotektivno dejstvo timijana je pokazano nakon primene vodenog ekstrakta timijana (El-Kader MAA, 2012), kao i etarskog ulja timijana (Grespan R, 2014) na eksperimentalnim modelima oštećene jetre, gde je oštećenje bilo izazvano primenom paracetamola.

Aristatila i saradnici su ispitivali hepatoprotektivna i antioksidantna svojstva karvakrola kod hepatotoksičnih oštećenja kod pacova izazvanih primenom D-galaktozamina. U studiji su praćeni biohemijski parametri: enzimi (aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, alkalna fosfataza, gama-glutamil transpeptidaza) kao i lipidni peroksidativni markeri (tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance, lipidni hidroperoksidi). Nakon izlaganja miševa D-galaktozaminom, nivo biohemijskih parametara je značajno povećan, a aktivnost enzimskih antioksidanasa (superoksid dizmutaza, katalaza, peroksidaza i glutation) kao i neenzimskih antioksidanasa (vitamin C i E, redukovani glutation) se takođe smanjio u plazmi, eritrocitima, jetri i bubrezima. Posle 21-og dana peroralne primene karvakrola, nivo svih biohemijskih parametara i antioksidanasa bio je normalan. Biohemijska zapažanja su potvrđena histološkim analizama tkiva jetre i bubrega pacova. Ovi rezultati ukazuju da karvakrol ima značajan hepatoprotektivni i antioksidativni efekat (Aristatile B, 2009).

#### **1.4.8 Farmakokinetika**

S obzirom da se metabolizam lekova u reakcijama I faze odvija prvenstveno posredstvom citohrom P450 (CYP) sistema, Dong i saradnici su ispitivali uticaj različitih izoformi ovog enzima na metabolizam timola i karvakrola. Rezultati su pokazali da je CYP2A6 glavni enzim koji je uključen u metabolizam timola i karvakrola. Prilikom upotrebe timola i karvakrola sa

supstancama čiji se metabolizam odvija posredstvom enzima CYP2A6 potreban je oprez zbog mogućih interakcija (Dong RH, 2012).

U reakcijama II faze metabolizma lekova nastaje konjugat koji je uglavnom farmakološki neaktivan. Grupe koje su uključene u formiranje konjugata su: glukuronil, sulfatna, metil, acetil, glicil i glutationska, a glavni enzim koji učestvuju u ovim reakcijama je uridin difosfat (UDP) glukuronil transferaza (Rang HP, 2005). Ispitivanjem uticaja karvakrola na enzim UDP glukuronil transferazu (UGT), pokazalo se da on prvenstveno inhibira aktivnost UGT1A9 enzima, a u manjoj meri utiče na druge UGT izoforme (Dong RH, 2012).

Kako bi se ispitala sistemska raspoloživost i farmakokinetika nakon peroralne primene timola, izvršena je klinička studija na 12 zdravih dobrovoljaca. Svaki dobrovoljac je dobio po jednu dozu Bronchipret TP® tablete, što je ekvivalentno 1,08 mg timola. Nakon *per os* primene Bronchipret TP® tablete, timol nije mogao da se detektuje u plazmi i urinu. Međutim, metaboliti timola, timol-sulfat i timol-glukuronid su nađeni u urinu. Uzorci plazme i urina su analizirani nakon enzimske hidrolize metabolita. Timol-sulfat se mogao detektovati u plazmi, dok timol-glukuronid nije. Pik koncentracije u plazmi postignut je nakon  $2 \pm 0,8$  sati. Srednja vrednost poluvremena eliminacija iznosila je 10,2 sata. Timol se mogao detektovati do 41 sat nakon primene. Izlučena količina timol-sulfata i timol-glukuronida tokom 24 sata iznosila je  $16,2 \pm 4,5\%$  (Kohlert C, 2002).

#### 1.4.9 Toksičnost

Koncentrovani ekstrakt timijana smanjio je lokomotornu aktivnost i usporio disanje kod ispitivanih životinja u testu akutne toksičnosti. Ekstrakt je primenjen *per os* u dozi od 0,5 - 3,0 g ekstrakta/kg telesne mase, što odgovara 4,3 - 26 g suvog biljnog materijala (Qureshi S, 1991).

Tokom 6 meseci primene lišća timijana u ishrani pacova, nisu primećeni nikakvi toksični efekti (Haroun EM, 2002).

Tokom 14 dana *per os* primene metanolnog ekstrakta timijana u dozi od 100 i 200 mg/kg, kod ispitivanih životinja nisu uočena nikakva oštećenja jetre i bubrega (Oyewole OI, 2010).

Azirak i saradnici ispitivali su *in vivo* genotoksičnost karvakrola i timola na ćelijama koštane srži pacova. Karvakrol (10, 30, 50 i 70 mg/kg) i timol (40, 60, 80 i 100 mg/kg),

primenjeni intraperitonealno, indukovali su strukturne i ukupne hromozomske abnormalnosti u ćelijama koštane srži (Azirak S, 2008).

### **1.5 Značaj ispitivanja**

Biljni svet predstavlja nedovoljno ispitan izvor potencijalno farmakološki aktivnih jedinjenja. Pregledom literature utvrđeno je da upotreba biljaka, uključujući i timijan, ima veliki značaj kako u prevenciji tako i lečenju različitih bolesti.

Zbog mogućnosti primene timijana u prevenciji, odnosno lečenju različitih oboljenja, samostalno ili u kombinaciji sa drugim lekovima i/ili biljnim proizvodima, važno je ispitati farmakodinamske i farmakokinetičke parametre kako bi se obezbedila efikasna i bezbedna primena. Takođe, ispitivanja su značajna kako bi se proširila postojeća saznanja, a samim tim i indikacije za njegovu primenu.

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio da se primenom odgovarajućih metoda ispita:

1. Uticaj sirupa i tinkture timijana na farmakodinamske osobine lekova koji deluju na centralni nervni sistem (paracetamol, kodein, diazepam i pentobarbital) eksperimentalnih životinja.
2. Uticaj sirupa i tinkture timijana na biološku raspoloživost paracetamola kod ispitivanih životinja.
3. Uticaj sirupa i tinkture timijana na biohemijske parametre, pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu eksperimentalnih životinja.
4. Uticaj sirupa i tinkture timijana na vrednosti parametara oksidativnog stresa u homogenatu jetre eksperimentalnih životinja izloženih oksidativnom stresu.
5. Stabilnost sirupa timijana nakon prvog otvaranja, pri čuvanju na temperaturi od 20°C, na svetlosti, u primarnoj i sekundarnoj ambalaži.

### **3 RADNE HIPOTEZE**

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Primena sirupa i tinkture timijana ispoljava uticaj na farmakodinamske osobine lekova koji deluju na centralni nervni sistem (paracetamol, kodein, diazepam i pentobarbital).
2. Sirup i tinktura timijana utiču na biološku raspoloživost paracetamola kod ispitivanih životinja.
3. Sirup i tinktura timijana ne utiču na vrednosti biohemijskih parametara, pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu eksperimentalnih životinja.
4. Primena sirupa i tinkture timijana ispoljava protektivno delovanje na životinje izložene oksidativnom stresu.
5. Ambalaža i uslovi čuvanja utiču na stabilnost sirupa timijana.



## 4 MATERIJAL I METODE

### 4.1 Eksperimentalne životinje

Farmakodinamska ispitivanja su izvedena na polno zrelim laboratorijskim miševima, oba pola, soja NMRI-Haan, telesne mase 20-35 g. U farmakokinetičkim ispitivanjima, kao i za biohemijske i toksikološke analize, korišćeni su zdravi beli laboratorijski pacovi, oba pola, soja Wistar, telesne mase 150-300 g. Životinje se odabrane metodom slučajnog izbora iz okota Vojnotehničkog instituta u Beogradu.

Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima namenjenim za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, u Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Čuvanje životinja je bilo pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od 20-25°C, održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12 h) i kontrola relativne vlažnosti vazduha. Životinje su bile smeštene u specijalnim kavezima sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo i imale su slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija). Svi eksperimenti su izvođeni u isto doba dana (od 8 do 17 h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevijoralnim testovima.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim principima rada sa laboratorijskim životinjama. Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu, broj odobrenja II-2012-01.

### 4.2 Sirup i tinktura timijana

Tokom ogleda korišćeni su sirup i tinktura timijana, koji su dostupni na tržištu Srbije. Tinktura timijana, *Thymi tincture*, dobijena je od nadzemnih delova biljke, *Thymi herba*. Kao rastvarač korišćen je 70% etanol, a odnos droge i rastvarača je 1:5. Sirup timijana (*Thymi sirupus*) oficinalan je po Jugoslovenskoj farmakopeji (Ph.Jug IV) i u svom sastavu sadrži:

tinkтуру timijana, prečišćenu vodu, običan sirup (*Sirup simplex*), kalijum-bromid, i kao konzervanse metilhidroksibenzoat i propilhidroksibenzoat.

Identifikacija i kvantitativna analiza timola i karvakrola, kao glavnih monoterpenskih komponenti sirupa i tinkture timijana, izvršeni su primenom metode gasna hromatografija - masena spektrometrija (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, GC-MS).

Uzorci za analizu su pripremani tako što je odmereno 2 ml sirupa ili tinkture timijana i preneto u odgovarajuću vijalu, zapremine 20 ml. Nakon toga je kao interni standard dodat mentol ( $c = 1\mu\text{g/ml}$ ). Zatim je dodato 10 ml kisele demineralizovane vode. Demineralizovana voda se zakiselila tako što je na 100 ml demineralizovane vode dodato 1 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline, u cilju sprečavanja jonizacije. U pripremljenu smešu dodat je i 1 g natrijum-hlorida, nakon čega je smeša promućkana i ekstrahovana toluenom. Ekstrakcija se izvodila 3 puta sa po 1 ml toluena, pri čemu je svaki put odpipetirano po 800  $\mu\text{l}$  rastvora i sve 3 porcije su spojene u suhu epruvetu, u koju je prethodno dodat anhidrovani natrijum-sulfat. Nakon toga je smeša promućkana i odpipetiran je odgovarajući alikvot u vijal, a nakon toga se pristupilo analizi.

GC-MS analiza izvršena je na gasnom hromatografu 7890A (*Agilent Technologies*, SAD). Kapilarna kolona DB-5MS, dimenzija 60 m x 0,25 mm, i debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$  (*Agilent J&W Scientific*, SAD), korišćena je za ovu analizu. Temperaturni program bio je podešen na sledeći način: inicijalna temperatura je bila 70°C tokom 2 minuta, zatim se povećavala brzinom od 20°C u minutu do postizanja temperature od 150°C, nakon toga 4 minuta na 150°C, a zatim se povećavala brzinom od 10°C u minutu do postizanja temperature od 280°C i održavana je na 280°C tokom 15 minuta. Gasni hromatograf je bio direktno povezan sa masenim detektorom (5975C *Agilent*, SAD). Vreme trajanja analize je bilo 38 minuta. Helijum je korišćen kao noseći gas, a brzina protoka je bila podešena na 1 ml/min. Maseni spektri su snimani pri energiji jonizacije od 70 eV. Identifikacija monoterpenskih komponenti, timola i karvakrola, izvršena je upotrebom njihovih masenih i retencionih vremena pod datim uslovima, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST08, Wiley7).

Sirup i tinktura timijana davani su životinjama *per os* pomoću odgovarajuće gastrične sonde u obliku suspenzije, odnosno rastvora. Kao solvens korišćen je fiziološki rastvor. Doze sirupa i tinkture timijana upotrebljene u ovom ogledu, izračunate su prema Clark-ovoj formuli, uzimajući u obzir terapijske doze za čoveka.

Clark–ova formula:

$$D_z = \frac{D_c \cdot \sqrt[3]{TM_c}}{\sqrt[3]{TM_z}}$$

$D_z$  – doza za životinju izražena po kilogramu telesne mase

$D_c$  – doza za čoveka izražena po kilogramu telesne mase

$TM_c$  – telesna masa čoveka u kilogramima

$TM_z$  – telesna masa životinje u kilogramima

### 4.3 Supstance korišćene u eksperimentima

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

- paracetamol (*Acetaminophen*, Sigma-Aldrich, Nemačka)
- kodein (*Codeine*, raw powder 99,96%, Lewis Chemicals Ltd., Turska)
- diazepam (*Bensedin*® 10 mg/2 ml Galenika, Srbija)
- pentobarbital (*Pentobarbital sodium*, Sigma-Aldrich, Nemačka)
- fiziološki rastvor (*Natrii chloridi infundibile 0,9%* 500 ml, Hemofarm, Srbija)
- sirćetna kiselina (*Acidum Aceticum 99%*, J.T. Baker, SAD)
  
- ugljen tetrahlorid (*Carbon tetrachloride 99,9%* , Sigma-Aldrich, Nemačka)
- maslinovo ulje (*Oleum olivae*, Sinefarm, Beograd, Srbija)
- uretan (*Urethan*, Sigma Chemicals Co, St Louis, SAD)
  
- acetonitril (*Acetonitrile*, J.T. Baker, SAD)
- voda (*Water*, J.T. Baker, SAD)
- metanol (*Methanol*, J.T. Baker, SAD)
- trietilamin (*Triethylamine* – TEA, J.T. Baker, SAD)
  
- natrijum-karbonat, anhidrovani, min 99,5% (*Sodium carbonate*, Sinex laboratory, Beograd, Srbija)
- Folin Ciocalteu fenolni reagens (Fluka Biochemika, Buhs, Švajcarska)
- galna kiselina (*Galic acid*, Alfa Aesar Lancaster Synthesis, SAD)
- askorbinska kiselina (*Ascorbic acid*, Sigma-Aldrich, Nemačka)

- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, Nemačka)
- hlorovodonična kiselina, koncentrovana (*Hydrochloric acid*, J.T. Baker, SAD)
- natrijum-hlorid (*Sodium chloride*, Centrohem, Srbija)
- toluen (*Toluene*, Fluka Biochemika, Buhs, Švajcarska)
- natrijum-sulfat, anhidrovani (*Sodium sulfate*, Centrohem, Srbija)
- timol (*Thymol*, Sigma, SAD)
- karvakrol (*Carvacrol*, Sigma, SAD).

#### 4.4 Tretman i podela eksperimentalnih grupa

Životinje su podeljene u grupe metodom slučajnog izbora, neposredno pre odgovarajućeg eksperimenta. U svakoj grupi je bilo po šest životinja. Za svaki eksperiment postojala je kontrolna grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje, odnosno suspendovanje ispitivanih supstanci. Svaka životinja korišćena je u eksperimentu samo jednom. Nakon formiranja eksperimentalnih i kontrolnih grupa, izmerena je telesna masna svih životinja na laboratorijskoj vagi i životinje su obeležene rastvorom pikrinske kiseline, koja ostavlja vidljiv trag na belom krznu nekoliko dana.

Farmakodinamska ispitivanja su vršena na miševima. Bez obzira na dozu koju je životinja primila, injicirani volumen je bio isti, odnosno sve doze ispitivanih supstanci za miša rastvorene su u volumenu od 10 ml vode ili fiziološkog rastvora.

Doze primenjenih lekova u pretremanu bile su:

- ✓ fiziološki rastvor 10 ml/kg, per os;
- ✓ tinktura timijana 0,4 ml/kg, per os;
- ✓ sirup timijana 12,08 ml/kg, per os.

Doze lekova korišćenih u farmakodinamskim ispitivanjima bile su:

- ✓ paracetamol 60 mg/kg, intraperitonealno;
- ✓ kodein 30 mg/kg, intraperitonealno;
- ✓ sirćetna kiselina 1% u zapremini od 10 ml/kg, intraperitonealno;

- ✓ diazepam 3 mg/kg, intramuskularno;
- ✓ pentobarbital 40 mg/kg, intraperitonealno.

Eksperimentalne životinje su podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom (**Con**);
2. Kontrolna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan (**Tin1**);
3. Kontrolna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana (**Tin7**);
4. Kontrolna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan (**Syr1**);
5. Kontrolna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana (**Syr7**);
6. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i paracetamolom (**Con1Par**);
7. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim paracetamolom (**Con7Par**);
8. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i kodeinom (**Con1Cod**);
9. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim kodeinom (**Con7Cod**);
10. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i sirćetnom kiselinom (**Con1Ace**);
11. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim sirćetnom kiselinom (**Con7Ace**);
12. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i diazepamom (**Con1Dia**);
13. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim diazepamom (**Con7Dia**);
14. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i pentobarbitalom (**Con1Pen**);
15. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim pentobarbitalom (**Con7Pen**);
16. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan i paracetamolom (**Tin1Par**);
17. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom (**Tin7Par**);
18. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan i paracetamolom (**Syr1Par**);
19. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom (**Syr7Par**);
20. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan i kodeinom (**Tin1Cod**);
21. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim kodeinom (**Tin7Cod**);

22. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan i kodeinom (**Syr1Cod**);
23. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim kodeinom (**Syr7Cod**);
24. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan i sirćetnom kiselinom (**Tin1Ace**);
25. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim sirćetnom kiselinom (**Tin7Ace**);
26. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan i sirćetnom kiselinom (**Syr1Ace**);
27. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim sirćetnom kiselinom (**Syr7Ace**);
28. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan i diazepamom (**Tin1Dia**);
29. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim diazepamom (**Tin7Dia**);
30. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan i diazepamom (**Syr1Dia**);
31. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim diazepamom (**Syr7Dia**);
32. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 1 dan i pentobarbitalom (**Tin1Pen**);
33. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim pentobarbitalom (**Tin7Pen**);
34. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 1 dan i pentobarbitalom (**Syr1Pen**);
35. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim pentobarbitalom (**Syr7Pen**).

Farmakokinetika, toksikološka, biohemijska i morfološka ispitivanja su vršena na pacovima. Kako bi injicirani volumen bio isti, sve doze ispitivanih supstanci za pacova su rastvorene, odnosno suspendovane u volumenu od 1 ml odgovarajućeg rastvarača.

Doze primenjenih lekova u pretremanu bile su:

- ✓ fiziološki rastvor 1 ml/kg, per os;
- ✓ tinktura timijana 0,18 ml/kg, per os;
- ✓ sirup timijana 5,6 ml/kg, per os.

Doze primenjenih supstanci u farmakokinetским ispitivanjima bile su:

- ✓ paracetamol 20 mg/kg, intravenski i per os;
- ✓ uretan 25% rastvor, 5 ml/kg, intraperitonealno;
- ✓ ugljen-tetrahlorid 25% rastvor u maslinovom ulju, intraperitonealno.

Eksperimentalne životinje u farmakokinetским ispitivanjima podeljene su u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom tokom 7 dana, a zatim paracetamolom per os (**Con7Par<sub>p.o.</sub>**);
2. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, a zatim paracetamolom intravenski (**Con7Par<sub>i.v.</sub>**);
3. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom per os (**Tin7Par<sub>p.o.</sub>**);
4. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom intravenski (**Tin7Par<sub>i.v.</sub>**);
5. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom per os (**Syr7Par<sub>p.o.</sub>**);
6. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim paracetamolom intravenski (**Syr7Par<sub>i.v.</sub>**).

Eksperimentalne životinje u toksikološkim i biohemijским ispitivanjima podeljene su u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom tokom 7 dana (**Con7**);
2. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom tokom 7 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom (**Con7CCl<sub>4</sub>**);
3. Kontrolna grupa tretirana tinkturom timijana tokom 7 dana (**Tin7**);
4. Kontrolna grupa tretirana sirupom tokom 7 dana (**Syr7**);
5. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom (**Tin7CCl<sub>4</sub>**);
6. Eksperimentalna grupa tretirana sirupom timijana 7 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom (**Syr7CCl<sub>4</sub>**).

Eksperimentalne životinje u morfološkim ispitivanjima podeljene su u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom tokom 7 dana (**Con7**);
2. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom tokom 7 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom (**Con7CCl<sub>4</sub>**);
3. Kontrolna grupa tretirana tinkturom timijana tokom 7 dana (**Tin7**);
4. Eksperimentalna grupa tretirana tinkturom timijana 7 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom (**Tin7CCl<sub>4</sub>**).

#### **4.5 Farmakodinamska ispitivanja**

U ispitivanju potencijalnog analgetičkog dejstva timijana korišćena su dva farmakodinamska testa: test vrele ploče i test sirćetne kiseline. Test vrele ploče je analgezimetrijska metoda za jake analgetike, dok je test sirćetne kiseline analgezimetrijska metoda za slabe analgetike. Procena mišićne koordinacije nakon primene diazepama vršena je metodom rotirajućeg štapa, dok je uticaj timijana na hipnotičko delovanje pentobarbitala ispitan merenjem dužine vremena spavanja.

##### **4.5.1 Vrela ploča (Hot plate)**

U ovom testu kao izvor bolne draži služi toplota. Miševi su stavljeni na vrelu ploču zagrejanu na temperaturi od 52,5°C. Kako bi se omogućilo nesmetano posmatranje životinja, ploča je poklopljena sa providnim poklopcem. Ovim testom se meri reakciono vreme, odnosno vreme od momenta stavljanja životinje na vrelu ploču do momenta kada životinja lizne ili otrese zadnju šapu. Lizanje ili otresanje zadnje šape kontrolišu više moždane hemisfere, čija funkcija je neophodna pri proceni analgetičkog efekta lekova koji deluju preko opijatnih receptora (Jakovljević V, 2006).

Reakciona vremena su merena nakon 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 i 60 minuta posle intraperitonealne primene kodeina u dozi od 30 mg/kg ili intraperitonealne primene paracetamola u dozi od 60 mg/kg, 30 minuta nakon poslednje doze primenjenih preparata timijana. Pre primene ispitivanih lekova, određena su i kontrolna reakciona vremena.



Analgetički efekat izračunat je prema sledećoj formuli:

$$E (\%) = \frac{A - B}{B} \cdot 100$$

E – analgetički efekat

A – reakciono vreme u sekundama

B – kontrolno reakciono vreme u sekundama

#### 4.5.2 Test sirćetne kiseline (Writhing test)

U testu sirćetne kiseline bolna draž izazvana je 1% sirćetnom kiselinom, koja je injicirana u peritoneum životinje u zapremini od 10 ml/kg. Sirćetna kiselina izaziva bolno ponašanje i vidu grčeva koji se manifestuju tako što životinja ispruži sve četiri nožice i vuče abdomen po dnu kaveza. Sirćetne kiseline se daje 10 minuta nakon poslednje doze preparata timijana, a 5 minuta kasnije počinje se sa brojanjem grčeva. Grčevi su brojani u dva perioda. Prvi period je bio od 5-og do 25-og minuta od momenta injiciranja sirćetne kiseline, a drugi period je bio od 25-og do 45-og minuta od momenta injiciranja sirćetne kiseline. Supstanca koja dovede do značajnog smanjenja broja grčeva, smatra se da je ostvarila analgetičko dejstvo. S obzirom da je test osetljiv na spoljašnje uslove, uvek se izvodio pri istim uslovima: ista temperatura, osvetljenje i u tišini.

Analgetičko dejstvo izraženo kao procenat inhibicije broja grčeva izračunato je prema formuli:

$$\text{Analgetički efekat (\%)} = 100 - \frac{\text{Broj grčeva u ogleđnoj grupi}}{\text{Broj grčeva u kontrolnoj grupi}} \cdot 100$$

#### 4.5.3 Metod rotirajućeg štapa (Rotarod method)

Procena mišićne koordinacije vrši se metodom rotirajućeg štapa. U ogled se uključuju miševi koji su u stanju da se održe bez pada na rotirajućem štapu 5 minuta, odnosno 300 sekundi. Nakon ove preliminarne procene, miševima se 30 minuta posle primene timijana, injicira diazepam u dozi od 3 mg/kg, intramuskularno. Vreme održavanja miševa na rotirajućem štapu mereno je u sekundama, po šemi: 10 minuta štap i 10 minuta odmor, sve dok se vreme

spособnosti miševa da se održe na rotirajućem štapu ponovo ne približi vrednosti od 300 sekundi (Jakovljević V, 2006).

Depresija sposobnosti miševa da se održe na rotirajućem štapu u procentima (%) izračunata je prema formuli:

$$\text{Depresija (\%)} = 100 - \frac{A \cdot 100}{300} \quad A - \text{vreme održavanja}$$

#### **4.5.4 Vreme spavanja (Sleeping time)**

Hipnotičko dejstvo je ispitivano merenjem vremena spavanja miševa nakon primene pentobarbitala. Pentobarbital je primenjen intraperitonealno u dozi od 40 mg/kg, nakon čega je mereno indukciono vreme, period nakon ubrizgavanja pentobarbitala do gubitka refleksa stajanja, i vreme trajanja spavanja, period nakon gubitka refleksa stajanja do njegovog ponovnog uspostavljanja.

### **4.6 Farmakokinetiska ispitivanja**

#### **4.6.1 Prikupljanje uzoraka krvi**

Krv je uzorkovana iz repne vene pacova u adekvatno obeležene mikroeprovete. Nulti uzorci krvi su bez prisustva leka i uzorkovani su pre primene paracetamola. Ukupno je uzeto deset uzoraka krvi po životinji. Uzorci su uzeti u sledećim vremenskim intervalima: 0 (nulti uzorak), 5, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 i 300 minuta nakon primene paracetamola. Kako bi tokom uzorkovanja krvi pacovi ostali mirni, izvršena je imobilizacija. Imobilizacioni kavezi su bili dovoljno veliki kako bi životinje mogle nesmetano da dišu, ali nisu bili preveliki kako se životinje ne bi okrenule i uvukle rep. Imobilizacioni kavezi su bili perforirani i imali su otvor kroz koji se izvadi rep pacova. Kako bi se izazvala hiperemija, rep pacova je potapan u posudu sa toplom vodom, mazan vazelinom i masiran. Nakon toga je 1 cm od vrha repa napravljena perforacija kože pomoću lancete i uzorkovano je iz repne vene oko 200 µl krvi. Zatim su uzorci centrifugirani tokom 10 minuta, brzinom od 6.000 obrtaja/min. Nakon centrifugiranja, pipetira se

supernatant i prenosi u novu adekvatno obeleženu mikroeprevetu. Uzorci seruma se poređaju na stalak i zamrzavaju i čuvaju na temperaturi od -20°C, do analize.

#### **4.6.2 HPLC metoda za određivanje koncentracije paracetamola**

Određivanje koncentracije paracetamola izvedeno je korišćenjem visoko efikasne tečne hromatografije (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na Dionex HPLC uređaju sa UV detektorom.

Za HPLC analizu korišćena je kolona ODS *Hypersil* (*Agilent*, 100 mm x 2,1 mm, 5 µm, 120 Å) sa ODS predkolonom (*Agilent*, 20 mm x 2,1 mm, 5 µm). Kolona je ispirana mobilnom fazom 30 minuta pre početka rada, do stabilizacije bazne linije uz postepeno povećavanje protoka od 0,1 do 0,8 ml/min. Nakon završene analize, kolona je ispirana sa smešom metanola i destilovane vode u odnosu 50:50 (v/v), u slučaju da se kolona nije koristila u periodu dužem od sedam dana, ispiranje je vršeno smešom acetonitrila i destilovane vode u odnosu 80:20 (v/v). Mobilna faza se sastojala od acetatnog pufera (10 mM, pH 5 podešeno sirćetnom kiselinom) i acetonitrila, u odnosu 96:4 v/v, uz dodatak trietilamina (TEA) 0,2%. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,8 ml/min, a talasna dužina detekcije 254 nm. Radna temperatura je bila 25°C.

#### Kalibracija HPLC uređaja za određivanje koncentracije paracetamola u serumu

Osnovni standardni rastvor paracetamola pripremljen je rastvaranjem paracetamola u vodi u koncentraciji od 5 mg/ml. Od osnovnog rastvora pravljen su polazne tačke za kalibraciju.

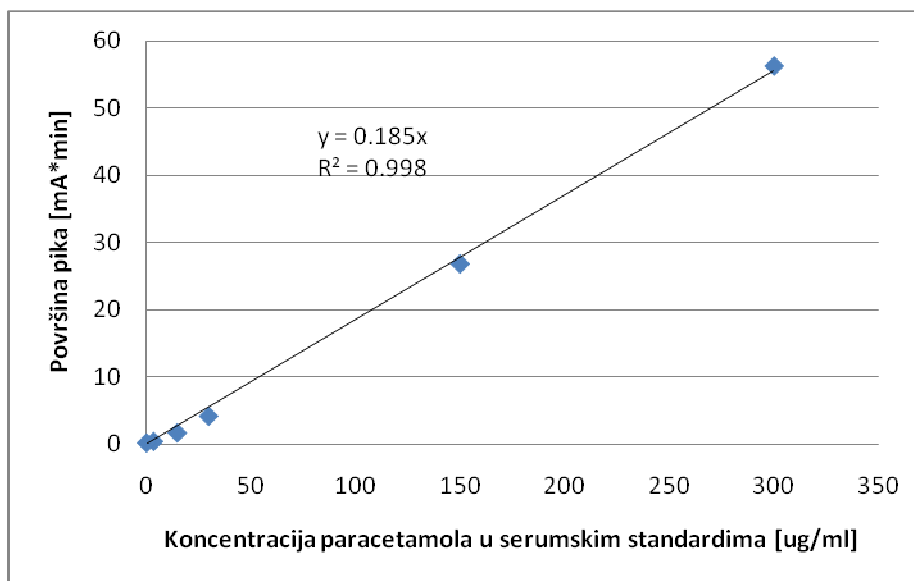
Kalibracione tačke su rađene u rasponu koncentracije od 0,375 do 300 µg/ml.

Uzorci seruma za kalibraciju su napravljeni tako što se kretalo od tačke 300 µg/ml, a ostale tačke su dobijene razblaživanjem kao što je prikazano u Tabeli 4. Početna tačka kalibracije je rađena odmeravanjem 60 µl osnovnog vodenog standarda i dodavanjem 940 µl seruma. Ukupno je napravljeno šest kalibracionih tačaka (0,375; 3,75; 15; 30; 150; 300). Kontrolni uzorci su napravljeni u metanolu na isti način kao i uzorci seruma.

**Tabela 4.** Uzorci seruma i kontrolni uzorci za kalibraciju

Kalibracione tačke [µg/ml]	Standard (ST)	Serum [µl]	Metanol [µl]
300	60 µl ST 5 mg/ml vodeni	940	940
150	300 µl ST 300 µg/ml	700	700
30	200 µl ST 150 µg/ml	800	800
15	500 µl ST 30 µg/ml	500	500
3,75	250 µl ST 15 µg/ml	750	750
0,375	100 µl ST 3,75 µg/ml	900	900

Kontrolni uzorci i uzorci seruma su dalje pripremani tako što je odmeravano 50 µl uzorka u mikroepruvetu i dodavano je 100 µl acetonitrila. Smeša je vorteksovana 30 sekundi, a potom centrifugirana 5 minuta na 3.500 obrtaja. Supernatant je odvajan i 10 µl je injektovano u HPLC. U ispitanom opsegu kalibracije metod je linearan ( $R^2 = 0,9983$ , Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Zavisnosti površine pika od koncentracije paracetamola [µg/ml] u serumu

Pri navedenim uslovima retenciono vreme paracetamola je iznosilo 4,3 minuta. Poređenjem spajkovanih uzoraka seruma i blank uzoraka pokazano je da je metod i specifičan.

*Recovery* je rađen poređenjem površine pika kalibracionih uzoraka sa površinama pikova kontrolnih uzoraka iste koncentracije tretiranih na isti način. Dobijen *recovery* iznosio je  $94,15 \pm 6,38\%$ .

Limit detekcije (*Limit of Detection*, LOD) iznosio je  $0,03 \mu\text{g/ml}$ , a limit kvantifikacije (*Limit of Quantitation*, LOQ)  $0,0015 \mu\text{g/ml}$ .

Tačnost metode je određena injektovanjem tri nivoa koncentracije:  $30 \mu\text{g/ml}$ ,  $7,5 \mu\text{g/ml}$  i  $3,5 \mu\text{g/ml}$ , tri puta zaredom. Tačnost predstavlja bliskost između izmerene i stvarne vrednosti koncentracije koja je trebala biti postignuta. Za svaki nivo koncentracije pripremana su po tri odvojena uzorka. Priprema uzoraka na isti način je rađena tri dana. Praćeno je variranje tačnosti unutar dana i između dana (Tabela 5). Tačnost je računata pomoću sledeće formule:

$$\text{ACC (\%)} = \frac{100 \cdot (C_{\text{srednje}} - C_{\text{izmereno}})}{C_{\text{izmereno}}}$$

U gore navedenoj formuli ACC (*Accuracy*) predstavlja vrednost tačnosti,  $C_{\text{srednje}}$  je srednja vrednost tri merenja za svaki nivo koncentracije ( $\mu\text{g/ml}$ ) i  $C_{\text{izmereno}}$  je izmerena pojedinačna koncentracija za svaki nivo koncentracije ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Preciznost je rađena za koncentraciju  $7,5 \mu\text{g/ml}$ , koja je injektovana 10 puta iz istog uzorka (Tabela 5). Praćenje preciznosti je rađeno tri dana. Mereno je variranje preciznosti unutar dana (ponavljanjem injektovanja iste koncentracije 10 puta i tako tri puta) i variranje preciznosti između dana. Preciznost je računata kao procenat relativne standardne devijacije (RSD%). Za račun je korišćena sledeća formula:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{100 \cdot \text{SD}}{x}$$

gde je RSD relativna standardna devijacija, SD je standardna devijacija i x je srednja vrednost ponovljenih deset merenja za ovaj nivo koncentracije.

**Tabela 5.** Rezultati kalibracije HPLC metode

Koncentracije u uzorcima seruma [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Tačnost ACC (%)		Preciznost RSD (%)	
	Unutar dana	Između dana	Unutar dana	Između dana
30	3,12 - 7,11	4,22 - 10,05	/	/
7,5	2,44 – 3,66	3,12 - 5,14	0,7 - 1,13	1,14 - 2,14
3,5	10,02 - 18,23	12,08 - 16,08	/	/

#### 4.7 Uticaj sirupa i tinkture timijana na parametre toksičnosti

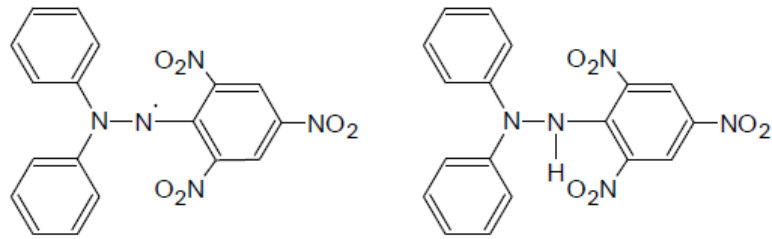
##### 4.7.1 Biohemijska ispitivanja

Od biohemijskih parametara u serumu su određeni: koncentracija lipida, enzimska aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), enzimska aktivnost alanin aminotransferaze (ALT), ukupni i direktni bilirubin, koncentracija uree i kreatinina. Sve navedene analize su urađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka).

##### 4.7.2 *In vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti tinkture timijana

###### Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda se zasniva se na reakciji stabilnog DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala sa antioksidansom (Brand-Williams W, 1995). Antioksidansi doniraju atom vodonika ili elektron radikalu, pri čemu radikal prelazi u redukovani neutralni DPPH-H (difenil-pikrilhidrazil) oblik. To dovodi do promene boje rastvora slobodnih radikala od izrazito ljubičaste do blede žute, što se spektrofotometrijski prati preko pada apsorbance. Nivo obezbojenosti rastvora DPPH radikala ukazuje na kapacitet vezivanja radikala, odnosno na potencijal antioksidativnih jedinjenja da redukuju DPPH.



DPPH radikal (ljubičast)

DPPH-H (žut)

**Slika 10.** Radikalna i redukovana forma DPPH

U epruvetu je dodato po 1 ml 90  $\mu$ M metanolnog rastvora DPPH, pomešano sa 20 do 400  $\mu$ l uzorka (tinktura timijana) i razblaženo do 4 ml 80% metanolom. Slepa proba je pripremljena dodatkom 1 ml radnog rastvora DPPH u 3 ml metanola. Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola. Smeša je ostavljena da stoji na tamnom mestu na sobnoj temperaturi. Nakon 60 minuta izmerena je apsorbanca reakcione smeše na talasnoj dužini od 515 nm.

Antioksidativna aktivnost određena pomoću ove metode izražava se kao kapacitet “hvatanja” slobodnih radikala (*Radical Scavenging Capacity*, RSC) i izračunata je na osnovu sledeće formule:

$$RSC = 100 - \frac{A_{uzorka} \cdot 100}{A_{slepe\ probe}}$$

$A_{uzorka}$  – apsorbanca uzorka

$A_{slepe\ probe}$  – apsorbanca slepe probe

Vrednost inhibitorne koncentracije  $IC_{50}$  (*Inhibitory concentration*) se definiše kao koncentracija ispitivanog uzorka koja redukuje koncentraciju DPPH radikala za 50%. Ova vrednost procenjena je linearnom regresionom analizom dobijene RSC vrednosti i izražena je kao mg/ml.

#### Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Količina ukupnih fenola određana je Folin-Ciocalteu metodom (Kroyer GT, 2004). Folin-Ciocalteu-ov reagens predstavlja smešu kompleksa fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline. U reakciji sa fenolnim jedinjenjima dolazi do redukcije ovog kompleksa, a nastali produkti imaju

plavu boju. Ukupni fenoli su određeni spektrofotometrijski, merenjem nastalog intenziteta obojenja.

Tinktura timijana (100 µl) pomešana je sa Folin-Ciocalteu reagensom (500 µl) i 7,5% rastvorom natrijum-karbonata. Paralelno su pripremljeni i slepa proba i standardi. Nakon mešanja na vorteksu i stajanja na tamnom mestu tokom 120 minuta, izmerena je apsorbancija na 740 nm. Za dalja računanja uzimana je srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbancija. Ukupni fenoli su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE) po litru.

#### **4.7.3 *In vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti**

Za *in vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti korišćen je ugljen-tetrahlorid, izuzetno prooksidativna supstanca. Uljani rastvor ugljen-tetrahlorida (ugljen-tetrahlorid:maslinovo ulje = 1:3), primenjen je intraperitonealno u dozi od 1 ml/kg, 30 minuta nakon poslednje doze preparata timijana. Dvadeset četiri sata nakon primene rastvora ugljen-tetrahlorida, životinje su uvedene u anesteziju pomoću rastvora uretana (0,75 mg/kg) i žrtvovane kardiopunkcijom, u cilju uzimanja uzoraka krvi i jetre za dalja ispitivanja.

Homogenat jetre pripremljen je tako što se 1 g tkiva jetre homogenizovao sa TRIS-HCl puferom (pH=7,4), u odnosu 1:3, na temperaturi od 4°C. Za homogenizaciju je korišćen homogenizator tipa B. Braun, Potter S (Melsungen, Nemačka). Tokom homogenizacije, posuda homogenizatora je bila sve vreme uronjena u isitnjeni led, kako bi se zaustavila aktivnost enzima i kako usled povećane temperature usled trenja pri homogenizaciji ne bi došlo do denaturacije proteina.

Za spektrofotometrijsko određivanje parametara oksidativnog stresa u pripremljenom homogenatu tkiva jetre korišćen je spektrofotometar Agilent 8453 (Santa Clara, USA). Određeni su sledeći parametri:

- ✓ intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), izmeren je na osnovu koncentracije sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA) (Buege AJ, 1978);
- ✓ aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) (Chin PTY, 1976);
- ✓ koncentracija redukovanog glutationa (GSH) (Kapetanović IM, 1979);
- ✓ aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) (Glatzle D, 1974);
- ✓ aktivnost peroksidaze (Px) (Simon LM, 1974);



- ✓ aktivnost katalaze (CAT) (Beers RFJ, 1950);
- ✓ aktivnost ksantin oksidaze (XOD) (Bergmayer UH, 1970).

#### **4.8 Morfološka ispitivanja**

Za ispitivanje morfologije jetre korišćen je svetlosni mikroskop, a tkivo jetro bojeno je klasičnom hematoksilin i eozin metodom (H&E). Dvadeset četiri sata nakon primene ugljen-tetrahlorida, uzeti su isečci jetre za histološku analizu. Uzorci jetre uzeti od svake životinje, fiksirani su u Bujenovom fiksativu tokom 24h. Nakon toga je izvršena dehidracija, odnosno uklanjanje vode iz tkiva pomoću izopropil alkohola rastuće koncentracije. Zatim je izvršeno kalupljenje u parafin i sečenje na rotacinom mikrotomu (Leica Microsystems), a preseci su debljine od 5  $\mu\text{m}$ . Napravljeni preparat obojen je hematoksilin i eozin metodom. Za analizu preparata korišćen je svetlosni mikroskop Olympus BX-43 (Olympus, Japan), a za fotografisanje kamera marke Olympus DP 73 (Olympus, Japan).

#### **4.9 Stabilnost sirupa timijana**

Stabilnost sirupa timijana ispitivana je praćenjem promene sastava sirupa, odnosno kvantitativnom analizom timola i karvakrola kao glavnih monoterpenskih komponenti, u periodu nakon prvog otvaranja, u zavisnosti od uslova čuvanja. Analiza sadržaja timola i karvakrola u sirupu timijana urađena je gasnom hromatografijom sa masenim spektrometrom.

Uzorci su pripremani tako što je odmereno 2 ml sirupa ili tinkture timijana i preneto u odgovarajuću vijalu, zapremine 20 ml. Nakon toga je kao interni standard dodat mentol ( $c = 1\mu\text{g/ml}$ ). Zatim je dodato 10 ml kisele demineralizovane vode. Demineralizovana voda se zakiselila tako što je na 100 ml demineralizovane vode dodato 1 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline, u cilju sprečavanja jonizacije. U pripremljenu smešu dodat je i 1 g natrijum-hlorida, nakon čega je smeša promućkana i ekstrahovana toluenom. Ekstrakcija se izvodila tri puta sa po 1 ml toluena, pri čemu je svaki put odpipetirano po 800  $\mu\text{l}$  rastvora i sve tri porcije su spojene u suhu epruvetu, u koju je prethodno dodat anhidrovani natrijum-sulfat. Nakon toga je smeša promućkana i odpipetiran je odgovarajući alikvot u vijal, a nakon toga se pristupilo analizi.

GC-MS analiza izvršena je na gasnom hromatografu 7890A (*Agilent Technologies*, SAD). Kapilarna kolona DB-5MS, dimenzija 60 m x 0,25 mm, i debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$  (*Agilent J&W Scientific*, SAD), korišćena je za ovu analizu. Temperaturni program bio je podešen na sledeći način: inicijalna temperatura je bila 70°C tokom 2 minuta, zatim se povećavala brzinom od 20°C u minutu do postizanja temperature od 150°C, nakon toga 4 minuta na 150°C, a zatim se povećavala brzinom od 10°C u minutu do postizanja temperature od 280°C i održavana je na 280°C tokom 15 minuta. Gasni hromatograf je bio direktno povezan sa masenim detektorom (5975C *Agilent*, SAD). Vreme trajanja analize je bilo 38 minuta. Helijum je korišćen kao noseći gas, a brzina protoka je bila podešena na 1 ml/min. Maseni spektri su snimani pri energiji jonizacije od 70 eV. Identifikacija monoterpenskih komponenti, timola i karvakrola, izvršena je upotrebom njihovih masenih i retencionih vremena pod datim uslovima, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST08, Wiley7).

Prilikom ispitivanja stabilnosti korišćene su tri različite serije sirupa timijana. Sve serije su bile identičnog sastava, ali su pripremljene u različitim vremenskim periodima. Podela uzoraka sirupa u grupe bile je metodom slučajnog izbora. U svakoj grupi je bilo po šest sirupa, a ukupan broj grupa je bio 18. U svakoj grupi je ispitivan sadržaj timola i karvakrola nakon prvog otvaranja, kao i treći, peti, sedmi i deseti dana nakon prvog otvaranja. U zavisnosti od uslova čuvanja i serije sirupa, postojale su sledeće grupe:

1. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**1.1**);
2. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**1.2**);
3. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**1.3**);
4. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**2.1**);
5. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**2.2**);
6. Sirup je čuvan na temperaturi od 4°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**2.3**);

7. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**3.1**);
8. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**3.2**);
9. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**3.3**);
10. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u primarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**4.1**);
11. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u primarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**4.2**);
12. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u primarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**4.3**);
13. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**5.1**);
14. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**5.2**);
15. Sirup je čuvan na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži, na svetlosti, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**5.3**);
16. Sirup je čuvan na temperaturi od 37°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je prvoj seriji sirupa (**6.1**);
17. Sirup je čuvan na temperaturi od 37°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je drugoj seriji sirupa (**6.2**);
18. Sirup je čuvan na temperaturi od 37°C, u primarnoj ambalaži, na tamnom mestu, i pripadao je trećoj seriji sirupa (**6.3**).

#### **4.10 Statistička obrada podataka**

Statistička obrada rezultata dobijenih tokom ispitivanja urađena je pomoću statističkog programa SPSS (version 17, Systat Software Inc., San Jose, CA). Kao mera centralne tendencije korišćena je aritmetička sredina ( $\bar{X}$ ), a mera varijabiliteta između podataka je predstavljena standardnom devijacijom (SD), odnosno standardnom greškom srednje vrednosti (*Standard*

*Error of Mean Value*, SEM). Studentovim t-tesom za male nezavisne uzorke analizirana je statistička značajnost razlika između ispitivanih grupa, odnosno analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (ANOVA). *Post hoc* testiranje nakon ANOVA-e urađeno je Tukey-evim metodom.

Sve statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05, odnosno statistički značajne su smatrane vrednosti  $p \leq 0,05$ .

Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Hemijska analiza sirupa i tinkture timijana

Monitorisani joni (m/z) za kvantifikaciju i potvrđivanje, i retenciona vremena analiziranih komponenti, timola i karvakrola u GC-MS analizi, prikazani su u Tabeli 6. Hemijski sastav sirupa i tinkture timijana određen je metodom GC-MS. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 7.

**Tabela 6.** GC-MS parametri za determinaciju timola i karvakrola

Analit	Monitorisani joni (m/z)		Retenciono vreme (min)
	Kvantifikacija	Potvrđivanje	
<b>Timol</b>	135	150 i 91	13,505
<b>Karvakrol</b>	135	150 i 91	13,715

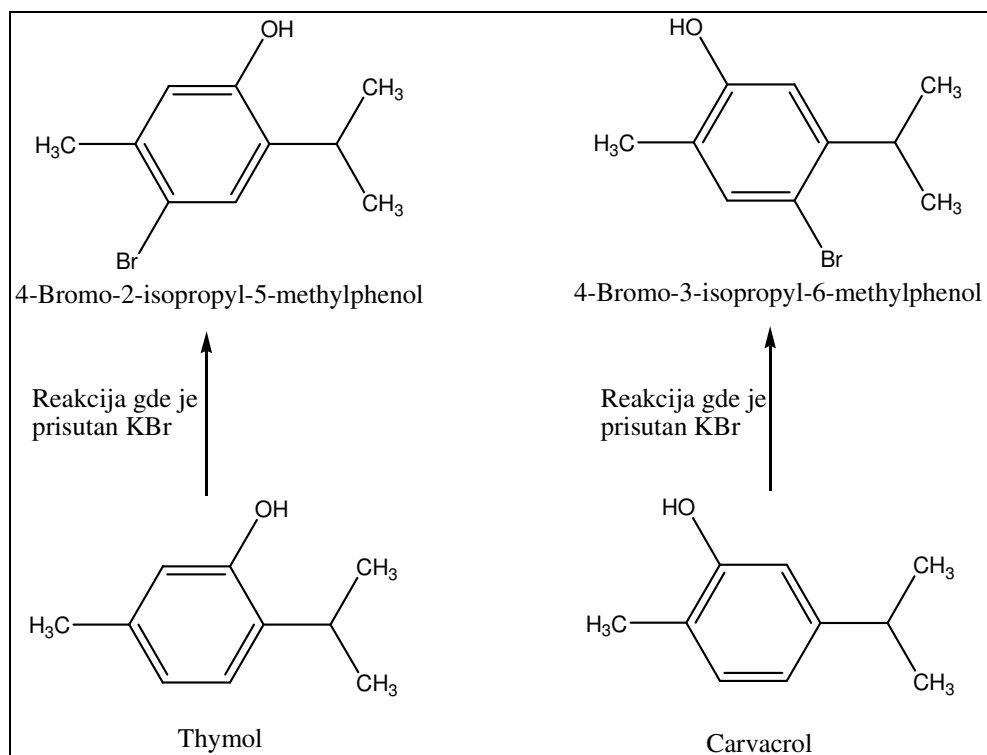
**Tabela 7.** Sastav sirupa i tinkture timijana

Ispitivana komponenta	Sirup timijana	Tinktura timijana
<b>Timol</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	5,70	94,16
<b>Karvakrol</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	0,89	6,57

GC-MS analizom sirupa timijana određen je sadržaj monoterpenskih fenola, timola i karvakrola. Koncentracija timola u ispitivanom uzorku sirupa timijana je iznosila 5,70  $\mu\text{g/g}$ , dok je koncentracija karvakrola bila značajno niža i iznosila je 0,89  $\mu\text{g/g}$ . Takođe, pored timola i karvakrola u sirupu timijana utvrđeno je prisustvo sledećih jedinjenja: benzaldehida, benzil alkohola, benzojeve kiseline i 5-bromo-2-metoksiacetofenona.

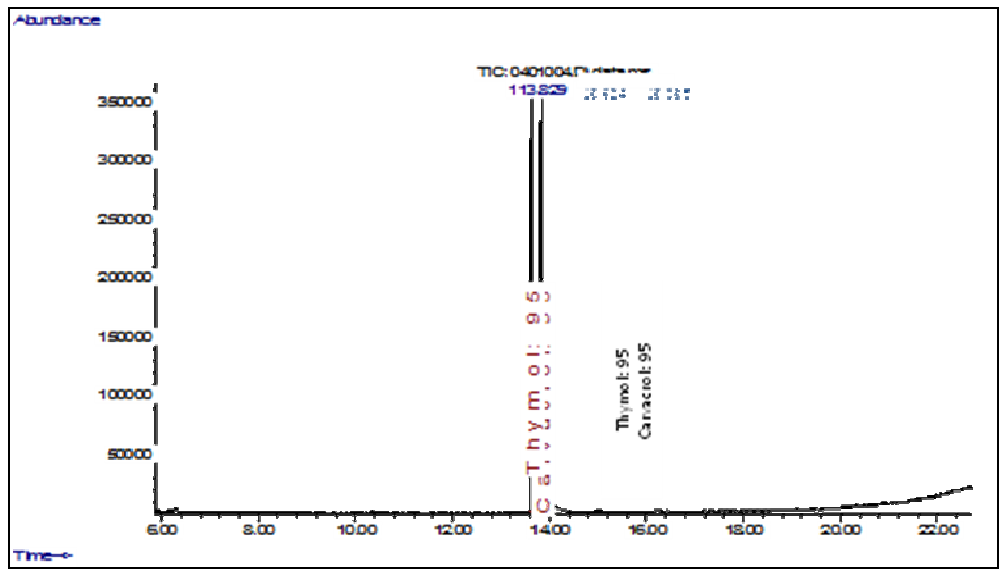
Sadržaj timola u ispitivanom uzorku tinkture timijana iznosio je 94,16  $\mu\text{g/g}$ , a sadržaj karvakrola je bio znatno niži i iznosio je 6,57  $\mu\text{g/g}$ . Prilikom analize tinkture timijana identifikovana su i sledeća jedinjenja: benzaldehid, benzil alkohol, linalool, terpinen-4-ol, benzen, eugenol, 11-n-decildokozan i 7-n-heksileikozan.

S obzirom da su u sirupu timijana identifikovani i bromo-derivati, koji nastaju usled dodatka kalijum-bromida u sirup, na Grafikonu 2 prikazana je reakciona shema nastanka bromo-derivata iz timola i karvakrola.

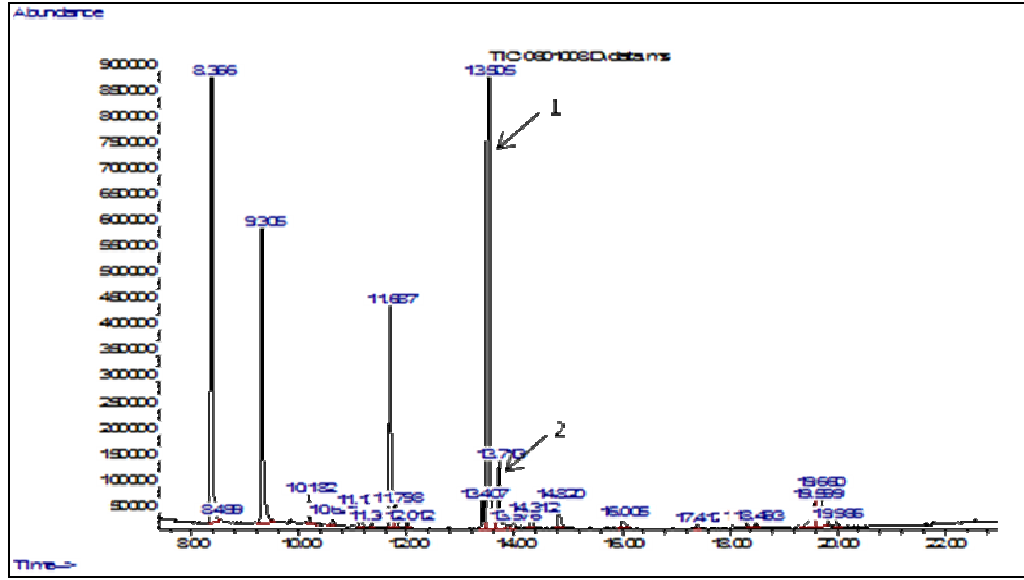


**Grafikon 2.** Reakciona shema nastanka bromo-derivata

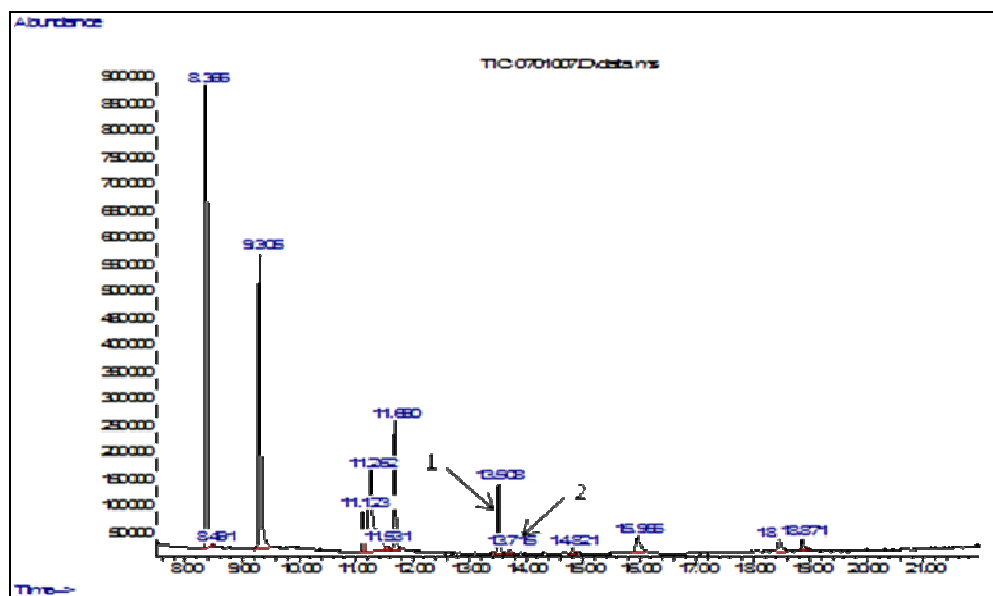
Na grafikonima koji slede, prikazani su hromatogrami standarda timola i karvakrola (Grafikon 3), kao i hromatogrami dobijeni prilikom GC-MS analize tinkture (Grafikon 4) i sirupa timijana (Grafikon 5).



Grafikon 3. Stanadardi timol i karvakrol



Grafikon 4. GC-MS analiza tinkture timijana



Grafikon 5. GC-MS analiza sirupa timijana

## 5.2 Farmakodinamska ispitivanja

### 5.2.1 Vrela ploča - Analgetički efekat

Tabela 8. Vreme trajanja reakcije na toplotni nadražaj nakon sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme trajanja reakcije (s)								
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	10,91± 2,61	11,11± 4,52	9,87± 2,17	12,47± 3,27	10,06± 1,84	10,91± 2,87	10,27± 1,91	11,58± 1,64	11,88± 2,70
Tin7	13,29± 2,21	19,14± 6,18	19,67± 4,79 <sup>*x</sup>	20,41± 4,66 <sup>*</sup>	15,57± 3,06	16,14± 4,11 <sup>#</sup>	20,03± 4,43 <sup>*</sup>	20,97± 4,02 <sup>*x</sup>	18,23± 7,04
Syr7	11,48± 1,51	15,65± 2,75	13,90± 3,31 <sup>#</sup>	17,06± 1,52 <sup>#</sup>	16,85± 5,02	16,93± 5,26 <sup>#</sup>	17,87± 4,77 <sup>*</sup>	20,02± 4,23 <sup>*x</sup>	18,72± 5,47
Con7Cod	11,17± 1,12	21,32± 7,67 <sup>*</sup>	23,54± 4,59 <sup>*</sup>	25,16± 2,99 <sup>*</sup>	21,64± 8,29 <sup>*</sup>	25,83± 5,73 <sup>*</sup>	23,05± 3,98 <sup>*</sup>	19,30± 5,72 <sup>*</sup>	19,87± 5,16
Con7Par	10,07± 1,93	15,03± 3,82	13,02± 3,36 <sup>#</sup>	15,85± 3,82 <sup>#</sup>	13,52± 3,96	14,77± 4,76 <sup>#</sup>	14,48± 4,48 <sup>#</sup>	12,69± 3,09	15,42± 4,99

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

# p<0,05 u odnosu na grupu Con7Cod

x p<0,05 u odnosu na grupu Con7Par



Kao što se vidi iz rezultata prikazanih u Tabeli 8, primena tinkture timijana tokom sedam dana doprinela je dužem zadržavanju miševa na vreloj ploči u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da je ta razlika bila statistički značajna u 10-om, 15-om, 40-om i 50-om minutu. Dok je nakon sedmodnevne primene sirupa timijana vreme zadržavanja bilo značajno duže, u odnosu na kontrolnu grupu, u 40-om i 50-om minutu eksperimenta.

Jednokratna primena kodeina je produžila vreme zadržavanja miševa na vreloj ploči, u odnosu na kontrolnu grupu, a razlika je bila značajna između 5-og i 50-og minuta trajanja eksperimenta. Takođe, analgetički efekat jednokratne primene kodeina je bio izraženiji od analgetičkog efekta jednokratne primene paracetamola.

U 10-om i 50-om minutu eksperimenta, tinktura timijana je pokazala značajniji analgetički efekat u odnosu na analgetički efekat paracetamola. Dok je sirup timijana imao slabiji analgetički efekat u odnosu na kodein, sa statistički značajnom razlikom u 10-om, 15-om i 30-om minutu.

## 5.2.2 Interakcije sa paracetamolom

**Tabela 9.** Vreme trajanja reakcije na toplotni nadražaj nakon sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana i jednokratne primene paracetamola ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme trajanja reakcije (s)								
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	10,91± 2,61	11,11± 4,52	9,87± 2,17	12,47± 3,27	10,06± 1,84	10,91± 2,87	10,27± 1,91	11,58± 1,64	11,88± 2,70
Tin7	13,29± 2,21	19,14± 6,18*	19,67± 4,79* <sup>#</sup>	20,41± 4,66* <sup>x</sup>	15,57± 3,06	16,14± 4,11	20,03± 4,43* <sup>x</sup>	20,97± 4,02* <sup>#,x</sup>	18,23± 7,04
Syr7	11,48± 1,51	15,65± 2,75	13,90± 3,31	17,06± 1,52	16,85± 5,02*	16,93± 5,26	17,87± 4,77*	20,02± 4,23* <sup>#,x</sup>	18,72± 5,47
Con7Par	10,07± 1,93	15,03± 3,82	13,02± 3,36	15,85± 3,82	13,52± 3,96	14,77± 4,76	14,48± 4,48	12,69± 3,09	15,42± 4,99
Tin7Par	9,97± 1,78	14,79± 3,76	13,77± 1,92	14,51± 2,69	15,63± 1,36	12,66± 3,25	12,95± 2,35	13,65± 2,65	14,08± 1,59
Syr7Par	11,58± 2,41	10,57± 2,33	16,27± 4,70*	15,93± 2,71	16,15± 3,18*	14,26± 3,57	13,96± 3,98	13,90± 3,45	16,71± 6,56

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

# p<0,05 u odnosu na grupu Con7Par

x p<0,05 u odnosu na grupu Tin7Par

U Tabeli 9 se uočava da je sedmodnevna primena tinkture timijana produžila vreme zadržavanja miševa na vreloj ploči u odnosu na grupu koja je primala tinkturu timijana i paracetamol, a razlika je bila statistički značajna u 15-om, 40-om i 50-om minutu eksperimenta. Takođe, i grupa tretirana sirupom timijana i paracetamolom je imala smanjeno analgetičko delovanje u odnosu na grupu koja je primala samo sirup timijana, ali ova razlika nije bila statistički značajna.

Grupe životinje koje su tretirane tinkturom timijana i paracetamolom, kao i sirupom timijana i paracetamolom, nisu pokazale razliku u analgetičkom delovanju u poređenju sa kontrolnom grupom (Con7Par).

**Tabela 10.** Vreme trajanja reakcije na toplotni nadražaj nakon jednokratne primene tinkture i sirupa timijana i jednokratne primene paracetamola ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme trajanja reakcije (s)								
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	10,91± 2,61	11,11± 4,52	9,87± 2,17	12,47± 3,27	10,06± 1,84	10,91± 2,87	10,27± 1,91	11,58± 1,64	11,88± 2,70
Tin1	12,74± 1,64	12,84± 1,30	15,95± 1,55*	14,65± 1,85	16,83± 2,44*	16,64± 4,30	15,90± 2,83	17,25± 3,18	17,26± 2,54*
Syr1	11,93± 2,11	13,42± 1,35	14,11± 1,38*	15,42± 3,36	19,55± 4,27*#	15,21± 3,06	15,54± 3,09	14,22± 2,37	14,68± 2,78
Con1Par	13,71± 2,42	13,16± 2,53	13,38± 2,62	16,14± 3,13	14,16± 1,24	16,66± 4,40	16,81± 5,89*	16,79± 3,69	13,83± 3,24
Tin1Par	12,53± 2,49	10,68± 1,62	13,25± 3,63	13,5± 3,34	15,32± 1,69*	16,06± 2,65	18,42± 3,15*	17,46± 4,96*	14,38± 2,22
Syr1Par	13,76± 2,89	13,07± 3,88	12,07± 2,29	14,27± 3,26	14,46± 2,27*	12,80± 3,50	15,64± 4,12	17,75± 3,37*	14,81± 3,07

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

# p<0,05 u odnosu na grupu Con1Par

Jednokratna primena tinkture timijana produžila je vreme zadržavanja miševa na vreloj ploči između nultog i 30-og minuta, u poređenju sa grupom koja je primala jednokratno tinkturu timijana i paracetamol (Tabela 10). Takođe i grupa tretirana jednokratno sirupom timijana je imala produženo reakciono vreme između 5-og i 30-og minuta, u odnosu na grupu koja je primala zajedno sirup timijana i paracetamol. Ove razlike nisu bile statistički značajne.

Jednokratna primena tinkture timijana i paracetamola, kao i sirupa timijana i paracetamola, nisu pokazale razlike u analgetičkom delovanju u poređenju sa kontrolnom grupom (Con1Par).

**Tabela 11.** Procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana i jednokratne primene paracetamola ( $X \pm SD$ )

Grupa	Procenat depresije bola (%)							
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	1,83± 23,02	-9,17± 21,41	14,68± 25,71	7,34± 17,71	0± 12,22	-5,50± 13,91	6,42± 7,82	9,17± 14,50
Tin7	41,73± 33,54	47,69± 23,16*	55,63± 34,05	17,39± 14,03	21,39± 24,24	50,28± 17,82*	57,27± 11,99*	36,72± 44,24
Syr7	35,82± 24,74	20,14± 25,82	47,08± 22,28	44,99± 37,34	45,10± 35,87	53,05± 28,39*	72,67± 27,22* <sup>#</sup>	60,90± 39,11
Con7Par	37,93± 36,84	19,04± 30,95	48,17± 53,16	24,24± 38,72	35,27± 40,87	29,33± 26,86	14,68± 19,65	37,54± 31,73
Tin7Par	49,8± 41,72	40,33± 24,85*	48,99± 39,26	61,23± 36,88	32,57± 53,05	32,15± 29,70	40,70± 39,10	44,84± 32,54
Syr7Par	-5,83± 29,21	40,73± 33,47*	39,54± 23,68	43,92± 41,74	26,53± 38,30	22,36± 37,83	21,80± 33,49	45,77± 59,09

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

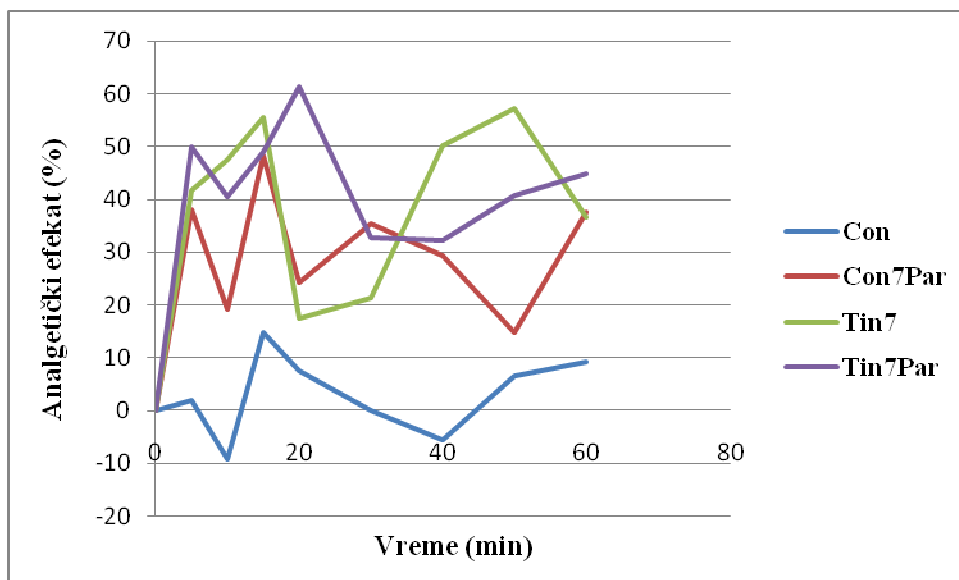
# p<0,05 u odnosu na grupu Con7Par

U Tabeli 11 se uočava da je procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene tinkture timijana bio veći u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom, a statistički značajna razlika je zabeležana u 10-om, 40-om i 50-om minutu. Takođe, procenat depresije bola je i nakon sedmodnevne primene sirupa timijana bio veći u poređenju sa kontrolnom grupom (Con), a razlika je bila statistički značajna u 40-om i 50-om minutu.

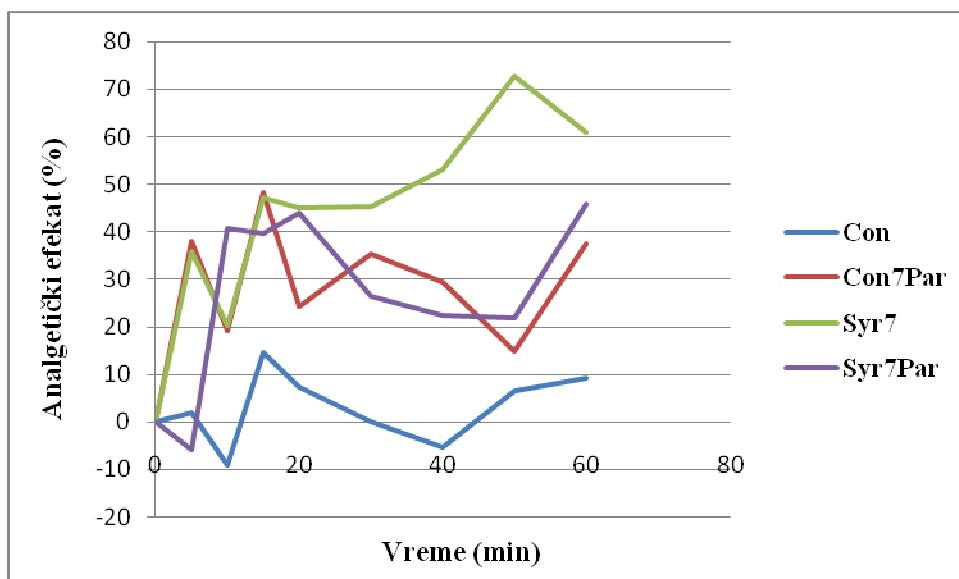
Primena tinkture timijana u kombinaciji sa paracetamolom povećala je procenat depresije bola kod ispitivanih životinja između 5-og i 60-og minuta, u poređenju sa kontrolnom grupom (Con7Par), ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Na grafikonima koji slede prikazan je procenat depresije nakon sedmodnevne primene tinkture timijana i jednokratne primene paracetamola (Grafikon 6), kao i nakon sedmodnevne primene sirupa timijana i jednokratne primene paracetamola (Grafikon 7). Na oba grafikona se

vidi da je najmanji procenat depresije bola bio u kontrolnoj grupi, tretiranoj samo fiziološkim rastvorom (Con).



**Grafikon 6.** Procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene tinkture timijana i jednokratne primene paracetamola



**Grafikon 7.** Procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene sirupa timijana i jednokratne primene paracetamola

### 5.2.3 Interakcije sa kodeinom

**Tabela 12.** Vreme trajanja reakcije na toplotni nadražaj nakon sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana i jednokratne primene kodeina ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme trajanja reakcije (s)								
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	10,91± 2,61	11,11± 4,52	9,87± 2,17	12,47± 3,27	10,06± 1,84	10,91± 2,87	10,27± 1,91	11,58± 1,64	11,88± 2,70
Tin7	13,29± 2,21	19,14± 6,18	19,67± 4,79*	20,41± 4,66*	15,57± 3,06	16,14± 4,11 <sup>#</sup>	20,03± 4,43*	20,97± 4,02*	18,23± 7,04
Syr7	11,48± 1,51	15,65± 2,75	13,90± 3,31 <sup>#</sup>	17,06± 1,52 <sup>#</sup>	16,85± 5,02	16,93± 5,26 <sup>#</sup>	17,87± 4,77	20,02± 4,23	18,72± 5,47
Con7Cod	11,17± 1,12	21,32± 7,67*	23,54± 4,59*	25,16± 2,99*	21,64± 8,29*	25,83± 5,73*	23,05± 3,98*	19,30± 5,72	19,87± 5,16
Tin7Cod	12,5± 2,59	15,72± 4,07	17,58± 3,51*	18,37± 6,13	19,72± 6,00*	15,99± 5,40 <sup>#</sup>	18,43± 6,73	18,99± 5,65	18,58± 6,28
Syr7Cod	12,49± 2,20	18,72± 4,29	19,28± 6,07*	15,44± 4,75 <sup>#</sup>	17,17± 4,62	17,53± 2,81 <sup>#</sup>	19,48± 5,61*	17,65± 6,26	15,67± 2,10

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

<sup>#</sup> p<0,05 u odnosu na grupu Con7Cod

U Tabeli 12 vidimo da je tokom sedmodnevne primene tinkture timijana došlo do produžetka reakcionog vremena kod ispitivanih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom fiziološkim rastvorom. Razlika je bila statistički značajna u 10-om, 15-om, 40-om i 50-om minutu. Takođe, i nakon sedmodnevne primene sirupa timijana reakciono vreme je produženo u odnosu na kontrolnu grupu (Con), ali ta razlika nije bila statistički značajna.

U eksperimentalnim grupama koje su tretirane tinkturom timijana i kodeinom, kao i sirupom timijana i kodeinom, analgetički efekat je bio smanjen u poređenju sa kontrolnom grupom (Con7Cod), a statistički značajna razlika je postojala u 30-om minutu za grupu Tin7Cod, odnosno u 15-om i 30-om za grupu Syn7Cod.

**Tabela 13.** Vreme trajanja reakcije na toplotni nadražaj nakon jednodnevne primene tinkture i sirupa timijana i jednokratne primene kodeina ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme trajanja reakcije (s)								
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	10,91± 2,61	11,11± 4,52	9,87± 2,17	12,47± 3,27	10,06± 1,84	10,91± 2,87	10,27± 1,91	11,58± 1,64	11,88± 2,70
Tin1	12,74± 1,64	12,84± 1,30	15,95± 1,55 <sup>#</sup>	14,65± 1,85 <sup>#,x</sup>	16,83± 2,44	16,64± 4,30	15,90± 2,83	17,25± 3,18	17,26± 2,54
Syr1	11,93± 2,11	13,42± 1,35	14,11± 1,38 <sup>#,x</sup>	15,42± 3,36 <sup>#,x</sup>	19,55± 4,27 <sup>*</sup>	15,21± 3,06	15,54± 3,09	14,22± 2,37 <sup>x</sup>	14,68± 2,78
Con1Cod	11,95± 2,57	18,70± 6,22 <sup>*</sup>	22,97± 3,62 <sup>*</sup>	22,84± 3,98 <sup>*</sup>	21,04± 5,24 <sup>*</sup>	18,25± 4,55	20,56± 3,12 <sup>*</sup>	19,01± 6,13 <sup>*</sup>	18,55± 2,52
Tin1Cod	13,90± 0,94	19,65± 3,25 <sup>*</sup>	22,03± 5,62 <sup>*</sup>	23,39± 2,16 <sup>*</sup>	22,69± 4,84 <sup>*</sup>	20,60± 5,33 <sup>*</sup>	19,51± 5,25 <sup>*</sup>	23,62± 4,16 <sup>*</sup>	20,32± 7,18 <sup>*</sup>
Syr1Cod	11,83± 1,74	18,82± 4,95 <sup>*</sup>	21,09± 5,54 <sup>*</sup>	20,71± 5,79 <sup>*</sup>	22,64± 4,84 <sup>*</sup>	21,56± 5,32 <sup>*</sup>	18,35± 6,37 <sup>*</sup>	22,17± 2,42 <sup>*</sup>	15,51± 2,73

\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

# p<0,05 u odnosu na grupu Con1Cod

x p<0,05 u odnosu na grupu Tin1Cod

Eksperimentalne grupe koje su imale jednodnevni tretman tinkturom timijana, odnosno sirupom timijana pokazale su jači analgetički efekat u poređenju sa kontrolnom grupom koja je primala fiziološki rastvor (Con). Statistički značajna razlika je postojala jedino u grupi Syr1 u 20-om minutu eksperimenta (Tabela 13).

Jednokratna primena tinkture timijana i kodeina produžila je vreme zadržavanja miševa na ploči, u poređenju sa grupom koja je primala samo tinkturu timijana, a razlika je bila statistički značajna u 15-om minutu.

U poređenju sa kontrolnom grupom (Con1Cod), eksperimentalna grupa tretirana jednokratno tinkturom timijana i kodeinom, imala je produženo vreme zadržavanja na vreloj ploči tokom nultog, 5-og, 15-og, 20-og, 30-og 50-og i 60-og minuta, ali razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 14.** Procenat depresije bola (%) nakon sedmodnevnog pretretmana tinkturom i sirupom timijana i jednokratne primene kodeina ( $X \pm SD$ )

Grupa	Procenat depresije bola (%)							
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Con	1,83± 23,02	-9,17± 21,41	14,68± 25,71	7,34± 17,71	0± 12,22	-5,50± 13,91	6,42± 7,82	9,17± 14,50
Tin7	41,73± 33,54	47,69± 23,16	55,63± 34,05	17,39± 14,03	21,39± 24,24	50,28± 17,82	57,27± 11,99	36,72± 44,24
Syr7	35,82± 24,74	20,14± 25,82 <sup>#</sup>	47,08± 22,28	44,99± 37,34	45,10± 35,87 <sup>#</sup>	53,05± 28,39 <sup>*</sup>	72,67± 27,22 <sup>*</sup>	60,90± 39,11
Con7Cod	91,92± 72,71 <sup>*</sup>	112,53± 49,82 <sup>*</sup>	110,97± 43,38 <sup>*</sup>	73,50± 93,09	131,08± 51,03 <sup>*</sup>	106,74± 39,14 <sup>*</sup>	73,95± 56,65 <sup>*</sup>	76,95± 40,01 <sup>*</sup>
Tin7Cod	31,05± 46,55	45,25± 42,09 <sup>#</sup>	32,16± 63,72 <sup>#</sup>	49,48± 58,07	15,49± 36,34 <sup>#</sup>	40,86± 43,28 <sup>#</sup>	38,38± 30,54	30,91± 17,67
Syr7Cod	50,27± 33,53	54,04± 44,75	23,55± 37,20 <sup>#</sup>	37,43± 33,79	41,73± 26,80 <sup>#</sup>	59,17± 42,51 <sup>*</sup>	38,72± 54,83	21,11± 17,73 <sup>#</sup>

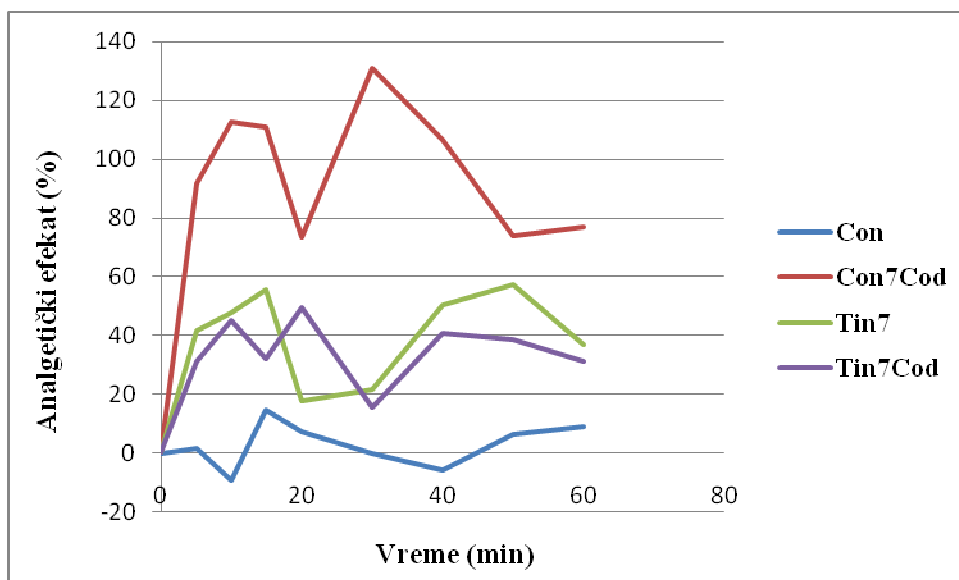
\* p<0,05 u odnosu na grupu Con

# p<0,05 u odnosu na grupu Con7Cod

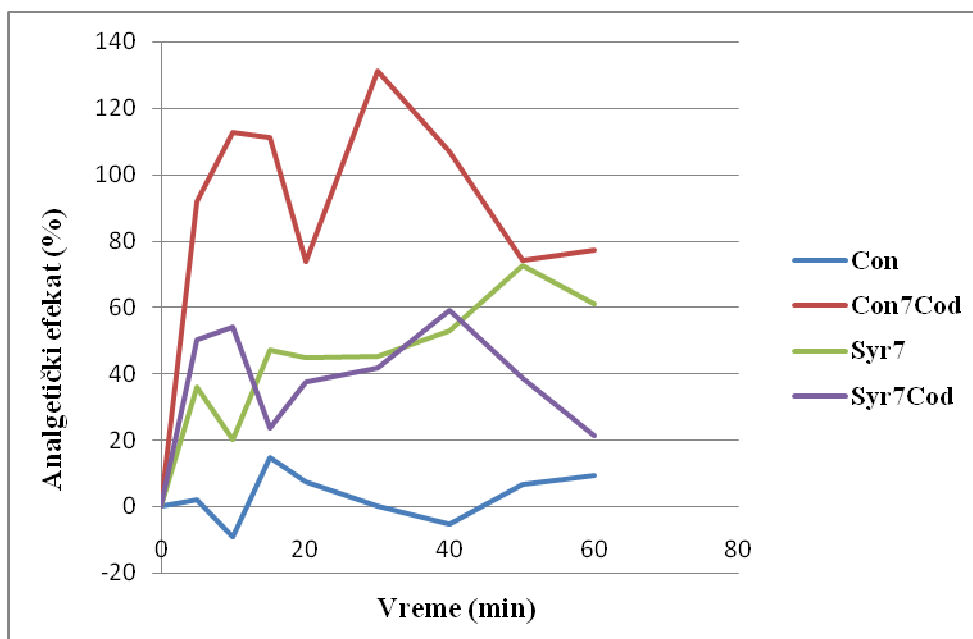
Procenat depresije bola je u grupi tretiranoj tokom 7 dana tinkturom timijana bio veći u poređenju sa kontrolnom grupom (Cod), ali razlike nisu bile statistički značajne. Takođe i jednokratna primena sirupa timijana imala je veći procenat depresije bola u odnosu na kontrolnu grupu, a razlika je bila statistički značajna u 40-om i 50-om minutu (Tabela 14).

Eksperimentalna grupa koja je imala sedmodnevni pretretman tinkturom timijana i jednokratnu primenu kodeina pokazala je manji procenat depresije bola u poređenju sa kontrolnom grupom (Con7Cod), a razlika je bila statistički značajna u 10-om, 15-om, 30-om i 40-om minutu. Takođe, i grupa koja je imala sedmodnevni pretretman sirupom timijana i jednokratnu primenu kodeina imala je manji procenat depresije bola u poređenju sa kontrolnom grupom, a razlika je bila statistički značajna u 15-om i 30-om minutu.

Na grafikonima koji slede prikazan je procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene tinkture timijana i jednokratne primene kodeina (Grafikon 8), kao i nakon sedmodnevne primene sirupa timijana i jednokratne primene kodeina (Grafikon 9).



**Grafikon 8.** Procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene tinkture timijana i jednokratne primene kodeina



**Grafikon 9.** Procenat depresije bola nakon sedmodnevne primene sirupa timijana i jednokratne primene kodeina



#### 5.2.4 Test sirćetne kiseline (Writhing test)

Uticaj sedmodnevnog pretretmana tinkture i sirupa timijana na broj grčeva izazvan nakon intraperitonealne primene 1% rastvora sirćetne kiseline, prikazan je u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Uticaj sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana na broj grčeva izazvan jednokratnom primenom sirćetne kiseline ( $X \pm SD$ )

<b>Grupa</b>	<b>Prvi period Broj grčeva</b>	<b>Drugi period Broj grčeva</b>	<b>Prvi period Analgetički efekat (%)</b>	<b>Drugi period Analgetički efekat (%)</b>
<b>Con7Ace</b>	30 $\pm$ 11,03	13 $\pm$ 7,55	-	-
<b>Tin7Ace</b>	20,33 $\pm$ 7,17	6 $\pm$ 5,18	32,23 $\pm$ 23,91	53,85 $\pm$ 39,82
<b>Syr7Ace</b>	26,50 $\pm$ 13,17	6 $\pm$ 5,97	11,67 $\pm$ 43,91	53,85 $\pm$ 45,89

U prvom periodu brojanja grčeva, od 5-og do 25-og minuta, nakon intraperitonealne primene 1% rastvora sirćetne kiseline, kod obe grupe životinja pretretiranih i tinkturom i sirupom timijana, došlo je do smanjenja broja grčeva u odnosu na kontrolnu grupu (ConAce), ali razlika nije bila statistički značajna.

Takođe, i u drugom periodu brojanja grčeva, od 25-og do 45-og minuta, nakon intraperitonealne primene 1% rastvora sirćetne kiseline, smanjen je broj grčeva u eksperimentalnim grupama, ali ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 16.** Uticaj jednokratne primene tinkture i sirupa timijana na broj grčeva izazvan jednokratnom primenom sirćetne kiseline ( $X \pm SD$ )

<b>Grupa</b>	<b>Prvi period Broj grčeva</b>	<b>Drugi period Broj grčeva</b>	<b>Prvi period Analgetički efekat (%)</b>	<b>Drugi period Analgetički efekat (%)</b>
<b>Con1Ace</b>	30,50 $\pm$ 5,82	8 $\pm$ 4,55	-	-
<b>Tin1Ace</b>	25,17 $\pm$ 9,37	4,50 $\pm$ 3,99	17,48 $\pm$ 30,71	43,75 $\pm$ 49,84
<b>Syr1Ace</b>	22,83 $\pm$ 8,89	5,17 $\pm$ 3,43	25,15 $\pm$ 29,13	35,38 $\pm$ 42,88

U prvom i drugom periodu brojanja grčeva, nakon jednokratne primene i sirupa i tinkture timijana, broj grčeva u eksperimentalnim grupama je bio manji u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 16). U prvom periodu najmanji broj grčeva zabeležen je u grupi tretiranom sirupom timijana, dok je u drugom periodu broj grčeva bio manji u grupi tretiranoj tinkturom timijana. Ove razlike nisu bile statistički značajne.

### 5.2.5 Test rotirajućeg štapa (Rotarod method)

U tabelama 17 i 18 prikazani su rezultati dobijeni tokom ispitivanja uticaja sedmodnevne i jednokratne primene sirupa i tinkture timijana na psihomotornu koordinaciju, nakon jednokratne primene diazepama. Vreme zadržavanja miševa na rotirajućem štapu, izraženo je u sekundama.

**Tabela 17.** Uticaj sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana na psihomotornu koordinaciju nakon primene diazepama ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme zadržavanja na rotirajućem štapu (s)			
	10 min	20 min	30 min	40 min
<b>Con7Dia</b>	9,67±6,02	105,33±64,89	258,83±73,42	300±0,00
<b>Tin7Dia</b>	32,80±39,62	152,20±143,41	201,20±135,51	251±109,57
<b>Syr7Dia</b>	7,67±9,13	45,83±25,96*	101,67±55,13*	170,83±63,13*

\* $p < 0,05$  u odnosu na grupu Con

Tokom sva četiri merna intervala, najveće skraćanje vremena zadržavanja miševa na rotirajućem štapu postignuto je nakon sedmodnevnog pretretmana sirupom timijana. Značajno skraćanje zadržavanja miševa na rotirajućem štapu u odnosu na kontrolno vreme postignuto je u 20-om, 30-om i 40-om minutu. Grupa životinja koja je imala sedmodnevni pretretman tinkturom timijana je u prvom i drugom mernom intervalu, odnosno 10 i 20 minuta nakon primene diazepama, pokazala najveću sposobnost da se zadrži na rotirajućem štapu. Međutim ove razlike u vremenu zadržavanja miševa na rotirajućem štapu između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne.

**Tabela 18.** Uticaj jednokratne primene tinkture i sirupa timijana na psihomotornu koordinaciju nakon primene diazepama ( $X \pm SD$ )

Grupa	Vreme zadržavanja na rotirajućem štapu (s)			
	10 min	20 min	30 min	40 min
<b>Con1Dia</b>	47±105,34	116,33±143,18	207,33±98,62	300±0,00
<b>Tin1Dia</b>	107,17±117,01	288,50±28,17	300±0,00	300±0,00
<b>Syr1Dia</b>	51±77,82	136,17±135,66	227,83±100,02	253,67±113,49

U prva tri ispitivana perioda, odnosno 10, 20 i 30 minuta nakon primene diazepama, najveće skraćenje vremena zadržavanja miševa na rotirajućem štapu postignuto je u kontrolnoj grupi. Dok je u poslednjem ispitivanom periodu, odnosno 40 minuta nakon primene diazepama, najveće skraćenje vremena zadržavanja miševa na rotirajućem štapu bilo u eksperimentalnoj grupi koja je sedam dana pretretirana sirupom timijana. Navedene razlike između ispitivanih grupa nisu bile statistički značajne.

### 5.2.6 Vreme spavanja (Sleeping time)

Rezultati ispitivanja uticaja kako sedmodnevne tako i jednokratne primene sirupa i tinkture timijana na indukciono vreme i dužinu vremena spavanja, nakon intraperitonealne primene pentobarbitala, prikazani su Tabelama 19 i 20.

**Tabela 19.** Uticaj sedmodnevne primene tinkture i sirupa timijana na indukciono vreme i vreme trajanja spavanja nakon primene pentobarbitala ( $X \pm SD$ )

Grupa	Indukciono vreme (min)	Vreme spavanja (min)
<b>Con7Pen</b>	4,83±2,56	71±63,33
<b>Tin7Pen</b>	3,50±0,83	76,17±81,22
<b>Syr7Pen</b>	3,67±0,82	83,33±26,21*

\* $p < 0,05$  u odnosu na grupu Con

Sedmodnevna primena sirupa i tinkture timijana dovela je do skraćenja indukcionog vremena, u poređenju sa kontrolnom grupom. Najkraće indukciono vreme je bilo u eksperimentalnoj grupi Tin7Pen. Vreme spavanja je bilo duže u eksperimentalnim grupama, nego u kontrolnoj grupi. Vreme trajanja spavanja je u grupi tretiranoj sedam dana sirupom timijana (Syr7Pen) bilo statistički značajno produženo u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 20.** Uticaj jednokratne primene tinkture i sirupa timijana na indukciono vreme i vreme trajanja spavanja nakon primene pentobarbitala ( $X \pm SD$ )

<b>Grupa</b>	<b>Indukciono vreme (min)</b>	<b>Vreme spavanja (min)</b>
<b>Con1Pen</b>	4,33±1,03	89,83±49,47
<b>Tin1Pen</b>	4,67±0,82	74±33,91
<b>Syr1Pen</b>	5,50±1,38	64,33±33,35

Nasuprot sedmodnevnog pretretmana, jednodnevni pretretman sirupom i tinkturom timijana doveo je do povećanja indukcionog vremena, u poređenju sa kontrolnom grupom. Vreme trajanja spavanja je bilo kraće u eksperimentalnim grupama, u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa koja je imala sedmodnevni pretretman tinkturom timijana imala je najkraće vreme spavanja. Navedene razlike između grupa u indukcionom vremenu i vremenu trajanja spavanja nisu bile statistički značajne.

### 5.3 Farmakokinetička ispitivanja

Farmakokinetički parametri paracetamola kod eksperimentalnih životinja nakon peroralne (p.o.) i intravenske (i.v.) aplikacije paracetamola prikazani su u Tabelama 21 i 22, dok su koncentracije paracetamola u serumu prikazane na Grafikonima 10 i 11.

**Tabela 21.** Uticaj tinkture (0,18 ml/kg) i sirupa timijana (5,6 ml/kg) primenjenih *per os*, tokom sedam dana na farmakokinetičke osobine paracetamola primenjenog intravenski (20 mg/kg) belim laboratorijskim pacovima ( $X \pm SD$ )

Farmakokinetički parametri	Fiziološki + Par <i>i.v.</i>	Tin + Par <i>i.v.</i>	Syr + Par <i>i.v.</i>
konstanta (1/min)	0,01907±0,0069	0,0355±0,01143*	0,0310±0,0104
$t_{1/2}$ (min)	41,67±18,51	21,21±6,75*	24,63±8,30
$C_0$ (μg/ml)	38,04±19,54	24,55±13,29	20,74±8,24
AUC <sub>0-t</sub> (min*μg/ml)	1129,84±225,65	925,40±454,27	1017,99±351,24
AUC <sub>inf</sub> (min*μg/ml)	1252,58±284,33	941,41±476,15	1050,15±352,90
AUC <sub>inf</sub> /D (min*μg/ml)	14,38±2,92	10,02± 5,02	11,42±3,83
Vd (ml/kg)	4145,63±1384,92	3468,13± 1478,18	3430,78±1474,62
Cl (ml/min/kg)	72,31±16,63	122,54±60,28	100,57±49,49
AUMC <sub>0-t</sub> (min*min*μg/ml)	37299,35±14177,80	30480,17±18406,91	36971,91±15189,13
AUMC <sub>inf</sub> (min*min*μg/ml)	61412,93±32169,49	33164,87±21286,44	42454,92±16485,76
MRT <sub>0-t</sub> (min)	32,93±10,12	31,75±8,18	35,83±3,75
MRT <sub>inf</sub> (min)	47,40±17,36	33,49±8,50	40,01±4,80
Vss (ml/kg)	3323,05±1071,97	3884,26±1547,03	3972,12±1809,98

\*p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu

U poređenju sa kontrolnom grupom životinja koje je tokom sedam dana primala fiziološki rastvor, konstanta eliminacije paracetamola je veća kod eksperimentalnih grupa

tretiranih sirupom i tinkturom timijana. Statistički značajna razlika postoji između kontrolne grupe i grupe pretretirane tinkturom timijana.

Poluvreme eliminacije paracetamola je manje kod eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajna razlika postoji u poluvremenu eliminacije paracetamola ( $t_{1/2}$ ) između kontrolne grupe i eksperimentalne grupe pretretirane tinkturom timijana.

Početa koncentracija, odnosno koncentracija paracetamola u nultom vremenu ( $C_0$ ) manja je kod eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa.

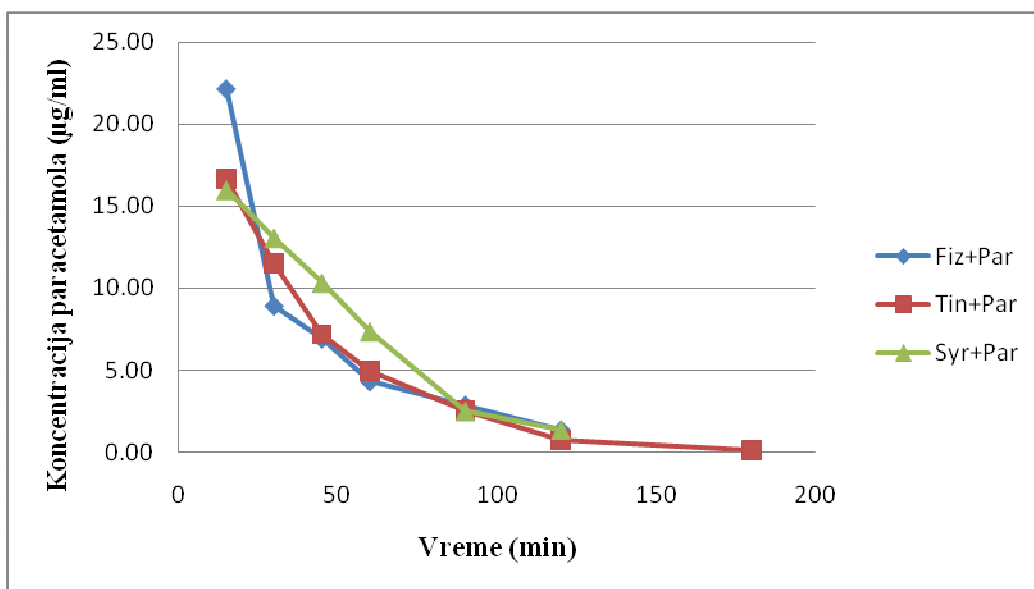
Vrednost površina ispod krive koncentracije paracetamola u serumu ( $AUC_{0-t}$ ) je najmanja kod eksperimentalne grupe pretretirane tinkturom timijana.

Volumen distribucije ( $V_d$ ) je manji kod eksperimentalnih grupa pretretiranih sirupom i tinkturom timijana u odnosu na kontrolnu grupu, ali ova razlika nije statistički značajna.

Vrednosti klirensa paracetamola ( $Cl$ ) povećane su nakon sedmodnevnog pretretmana tinkturom i sirupom timijana, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Srednje vreme zadržavanja leka u organizmu ( $MRT_{0-t}$ ) je najveće kod eksperimentalne grupe pretretirane sirupom timijana, dok je najmanje kod grupe pretretirane tinkturom timijana.

Volumen distribucije u stanju ravnoteže ( $V_{ss}$ ) je veći kod eksperimentalnih grupa, u poređenju sa kontrolnom grupom. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika.



**Grafikon 10.** Koncentracija paracetamola u serumu nakon intravenskog davanja paracetamola

U sve tri ispitivane grupe, paracetamol je dat u jednakoj dozi, ali se sa Grafikona 10 vidi da početne koncentracije paracetamola nisu iste. Kod kontrolne grupe je najveća početna koncentracija paracetamola u serumu. Paracetamol je mogao najduže da se detektuje u serumu kod grupa životinja pretretiranih tinkturom timijana.

**Tabela 22.** Uticaj tinkture (0,18 ml/kg) i sirupa timijana (5,6 ml/kg) primenjenih *per os*, tokom sedam dana na farmakokinetičke osobine paracetamola primenjenog *per os* (20 mg/kg) belim laboratorijskim pacovima ( $X \pm SD$ )

Farmakokinetički parametri	Fiziološki + Par <sub>p.o.</sub>	Tin + Par <sub>p.o.</sub>	Syr + Par <sub>p.o.</sub>
konstanta (1/min)	0,0152±0,0052	0,0176±0,0055	0,0362±0,0161 <sup>*,**</sup>
t <sub>1/2</sub> (min)	50,77±19,63	43,89±19,04	22,88±11,46 <sup>*</sup>
t <sub>max</sub> (min)	30,00±0,00	24,00±8,22	32,50±6,12
C <sub>max</sub> (μg/ml)	5,58±1,53	7,80±3,54	7,03±2,59
C <sub>max</sub> /D (μg/ml)	0,06±0,02	0,09±0,04	0,08±0,03
AUC <sub>0-t</sub> (min*μg/ml)	337,8150±205,71	420,45±138,11	394,48±137,41
AUC <sub>inf</sub> (min*μg/ml)	460,81±242,75	424,01±136,64	411,13±131,37
AUC <sub>inf</sub> /D (min*μg/ml)	4,88±2,64	4,83±1,77	4,47±1,52
Vd*F (ml/kg)	17971,15±8689,11	14277,28±6447,40	8229,84±5688,89
Cl*F (ml/min/kg)	268,62±154,58	233,54±93,03	249,99±94,58
AUMC (min*min*μg/ml)	17987,40±16150,84	22355,20±4808,93	19521,64±6924,98
AUMC <sub>inf</sub> (min*min*μg/ml)	40551,20±24557,57	23382,73±4623,16	22398,12±6553,18
MRT <sub>0-t</sub> (min)	48,10±12,46	55,24±8,43	49,68±5,26
MRT <sub>inf</sub> (min)	84,35±18,70	57,41±9,29 <sup>*</sup>	55,52±11,05 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu

<sup>\*\*</sup> p<0,05 u odnosu na Tin+Par<sub>p.o.</sub> grupu

Uočava se da postoji statistički značajna razlika u vrednosti konstante eliminacije između ispitivanih grupa životinja. Najveću konstantu eliminacije ima grupa pretretirana sirupom

timijana. Statistički značajna razlika postoji između grupe pretretirane sirupom timijana i kontrolne grupe, kao i između grupe pretretirane sirupom timijana i grupe pretretirane tinkturom timijana.

Poluvreme eliminacije paracetamola je manje kod esperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Postoji statistički značajna razlika u vrednosti poluvremena eliminacije između kontrolne grupe i grupe pretretirane sirupom timijana.

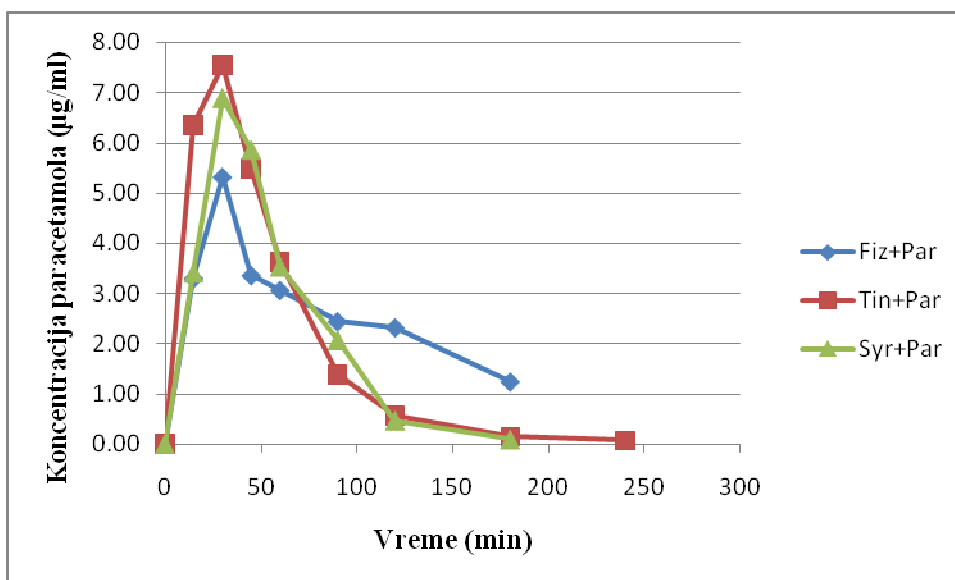
Vreme za koje se postiže maksimalna koncentracija paracetamola u serumu ( $t_{max}$ ) je najkraće u grupi životinja pretretiranim tinkturom timijana, dok je najduže u grupi životinja pretretiranim sirupom timijana. Statistički značajna razlika ne postoji.

Maksimalne koncentracije paracetamola ( $C_{max}$ ) veće su kod esperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu, ali ova razlika nije statistički značajna.

Grupa životinja pretretirana tinkturom timijana ima veću vrednost površine ispod krive koncentracije paracetamola u serumu u odnosu na druge dve ispitivane grupe, ali ova razlika nije statistički značajna.

Volumen distribucije i klirens nakon peroralne primene paracetamola su najveći kod kontrolnih grupa, bez statistički značajne razlike.

Postoji statistički značajna razlika u prosečnoj vrednosti srednjeg vremena zadržavanja leka u organizmu  $MRT_{inf}$  između ispitivanih grupa životinja. Grupa životinja pretretirana sirupom timijana ima značajno manju vrednost  $MRT_{inf}$  u poređenju sa kontrolnom grupom.



**Grafikon 11.** Koncentracija paracetamola u serumu nakon peroralnog davanja paracetamola



Na Grafikonu 11 dat je prikaz promene koncentracije paracetamola u vremenu nakon primene paracetamola peroralnim putem. U sve tri ispitivane grupe, paracetamol je dat u istoj dozi. Maksimalna koncentracija paracetamola ( $C_{max}$ ) postignuta je kod grupa životinja pretretiranih tinkturom timijana. Takođe, u ovoj grupi paracetamol je mogao najduže da se detektuje u serumu.

**Tabela 23.** Biološka raspoloživost paracetamola (F) izračunata kao odnos srednjih vrednosti površina ispod krive nakon per os ( $AUC_{p.o.}$ ) i nakon intravenske primene ( $AUC_{i.v.}$ ) paracetamola, u kontrolnoj grupi i u grupama pretretiranim tinkturom i sirupom timijana

<b>Grupa</b>	<b><math>AUC_{p.o.}</math> (X±SD)</b>	<b><math>AUC_{i.v.}</math> (X±SD)</b>	<b>F (%)</b>
<b>Fiziološki + Par</b>	337,81±205,71	1129,84±225,65	29,89
<b>Tin + Par</b>	420,45±138,11	925,40±454,27	45,43
<b>Syr + Par</b>	394,49±137,41	1018,00±351,24	38,75

U Tabeli 23 uočava se da je biološka raspoloživost paracetamola niža kod kontrolne grupe u odnosu na eksperimentalne grupe. Između AUC vrednosti nema statistički značajne razlike, dok se biološka raspoloživost značajno razlikuje.

## 5.4 Biohemijska i toksikološka ispitivanja

### 5.4.1 Lipidni status

**Tabela 24.** Koncentracije triglicerida i holesterola u serumu pacova nakon sedmodnevnog pretretmana fiziološkim rastvorom (Con7), tinkturom timijana (Tin7), sirupom timijana (Syr7), kao i nakon jednokratne primene ugljen-tetrahlorida u grupama (Con7CCl<sub>4</sub>, Tin7CCl<sub>4</sub>, Syr7CCl<sub>4</sub>) (X±SEM)

Grupa	Trigliceridi (mmol/l)	Holesterol (mmol/l)
Con7	1,31±0,24	1,88±0,25
Con7CCl <sub>4</sub>	0,34±0,05*	1,38±0,06
Tin7	0,89±0,16	1,87±0,32
Tin7CCl <sub>4</sub>	0,51±0,10*	1,56±0,07
Syr7	1,29±0,20 <sup>#</sup>	1,95±0,17
Syr7CCl <sub>4</sub>	0,59±0,05 <sup>#</sup>	1,37±0,12

\*p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

<sup>#</sup>p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 24 prikazani su rezultati ispitivanja lipidnog statusa u serumu pacova. Primenom jednofaktorske ANOVE analizirano je postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

Koncentracija triglicerida u serumu je statistički značajno niža u grupama tretiranim kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>), kombinacijom tinkture timijana i ugljen-tetrahlorida (Tin7CCl<sub>4</sub>), kombinacijom sirupa timijana i ugljen-tetrahlorida (Syr7CCl<sub>4</sub>) u odnosu na kontrolnu grupu (Con7). Dok je koncentracija triglicerida u serumu statistički značajno veća u grupi sa sedmodnevnim pretretmanom sirupom timijana (Syr7) u odnosu na grupu tretiranu kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>).

U Tabeli 24 se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola između ispitivanih grupa.

#### 5.4.2 Parametri jetrene funkcije

**Tabela 25.** Koncentracije AST i ALT enzima, ukupnog bilirubina i direktnog bilirubina u serumu pacova nakon sedmodnevnog pretretmana fiziološkim rastvorom (Con7), tinkturom timijana (Tin7), sirupom timijana (Syr7), kao i nakon jednokratne primene ugljen-tetrahlorida u grupama (Con7CCl<sub>4</sub>, Tin7CCl<sub>4</sub>, Syr7CCl<sub>4</sub>) (X±SEM)

Grupa	AST (U/l)	ALT (U/l)	Ukupni bilirubin (μmol/l)	Direktni bilirubin (μmol/l)
Con7	127,3±7,2	47,3±3,8	2,18±0,10	0,17±0,02
Con7CCl <sub>4</sub>	859,3±160,3*	144,5±32,2*	3,08±0,17*	0,58±0,04*
Tin7	199,8±46,3 <sup>#</sup>	48,0±3,5 <sup>#</sup>	2,33±0,18	0,37±0,07
Tin7CCl <sub>4</sub>	1430,7±285,3*	209,8±38,5*	2,62±0,31	0,52±0,12*
Syr7	120,0±5,8 <sup>#</sup>	41,0±1,9 <sup>#</sup>	1,98±0,07 <sup>#</sup>	0,25±0,06 <sup>#</sup>
Syr7CCl <sub>4</sub>	626,7±108,5	101,3±16,3	2,52±0,10	0,40±0,03

\* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

<sup>#</sup> p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 25 prikazani su rezultati ispitivanih parametara koji se koriste kao pokazatelji jetrene funkcije. Određivana je koncentracija enzima aspartat aminotransferaze i enzima alanin aminotransferaze, kao i koncentracija ukupnog i direktnog bilirubina. Primenom jednofaktorske ANOVA-e analizirano je postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

Koncentracija AST enzima je statistički značajno veća u grupi tretiranoj kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>), kao i u grupi tretiranoj kombinacijom tinkture timijana i ugljen-tetrahlorida (Tin7CCl<sub>4</sub>), u odnosu na kontrolnu grupu (Con7). Takođe, statistički značajna razlika u koncentraciji enzima AST postoji između eksperimentalnih grupa Tin7 i Syr7, u odnosu na grupu tretiranu kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>).

U Tabeli 25 se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT enzima u serumu između ispitivanih životinja. Koncentracija ALT enzima je značajno veća u grupi tretiranoj kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>), kao i u grupi

tretiranoj kombinacijom tinkture timijana i ugljen-tetrahlorida (Tin7CCl<sub>4</sub>), u odnosu na kontrolnu grupu (Con7). Razlika u koncentraciji enzima ALT u serumu je statistički značajna između eksperimentalnih grupa Tin7 i Syr7 u odnosu na grupu Con7CCl<sub>4</sub>.

Razlika u koncentraciji ukupnog bilirubina u serumu je statistički značajna između kontrolne grupe (Con7) i grupe tretirane kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>). Takođe, statistički značajna razlika postoji i u koncentraciji ukupnog bilirubina u serumu između grupe sa sedmodnevnim pretretmanom sirupom timijana (Syr7) i grupe tretirane kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>).

Statistički značajna razlika u koncentraciji direktnog bilirubina postoji između kontrolne grupe (Con7) i grupa tretiranih kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>) i kombinacijom tinkture timijana i ugljen-tetrahlorida (Tin7CCl<sub>4</sub>). Takođe, u grupi tretiranoj sedam dana sirupom timijana (Syr7) je značajno niža koncentracija direktnog bilirubina u poređenju sa grupom tretiranom kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>).

### 5.4.3 Parametri bubrežne funkcije

**Tabela 26.** Koncentracija uree i kreatinina u serumu pacova nakon sedmodnevnog pretretmana fiziološkim rastvorom (Con7), tinkturom timijana (Tin7), sirupom timijana (Syr7), kao i nakon jednokratne primene ugljen-tetrahlorida u grupama (Con7CCl<sub>4</sub>, Tin7CCl<sub>4</sub>, Syr7CCl<sub>4</sub>) (X±SEM)

<b>Grupa</b>	<b>Urea</b> (mmol/l)	<b>Kreatinin</b> (μmol/l)
<b>Con7</b>	9,22±0,44	45,50±0,72
<b>Con7CCl<sub>4</sub></b>	10,47±0,35	50,67±1,12
<b>Tin7</b>	9,15±1,07	45,0±1,65 <sup>#</sup>
<b>Tin7CCl<sub>4</sub></b>	10,75±0,30	51,33±1,02 <sup>*</sup>
<b>Syr7</b>	10,67±0,47	44,17±0,60 <sup>#</sup>
<b>Syr7CCl<sub>4</sub></b>	8,95±0,78	50,17±1,89

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

<sup>#</sup> p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

Kao pokazatelji bubrežne funkcije određivani su koncentracija uree i koncentracija kreatinina u serumu, a dobijeni rezultati prikazani su Tabeli 26. Primenom jednofaktorske ANOVA-e analizirano je postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

U Tabeli 26 uočava se da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa. Koncentracija uree u serumu je veća u grupama Con7CCl<sub>4</sub>, Tin7CCl<sub>4</sub> i Syr7, u odnosu na kontrolnu grupu Con7, ali ta razlika nije statistički značajna.

Koncentracija kreatinina u serumu je statistički značajno veća u grupi tretiranoj kombinacijom tinkture timijana i ugljen-tetrahlorida (Tin7CCl<sub>4</sub>) u odnosu na kontrolnu grupu (Con7). Dok je koncentracija kreatinina u serumu statistički značajno snižena u eksperimentalnim grupama tretiranim tinkturom timijana (Tin7) i sirupom timijana (Syr7) u poređenju sa grupom Con7CCl<sub>4</sub>.

## 5.5 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

### 5.5.1 *In vitro* antioksidativna aktivnost

**Tabela 27.** Procenat neutralizacije DPPH radikala (% RSC) tinkturom timijana

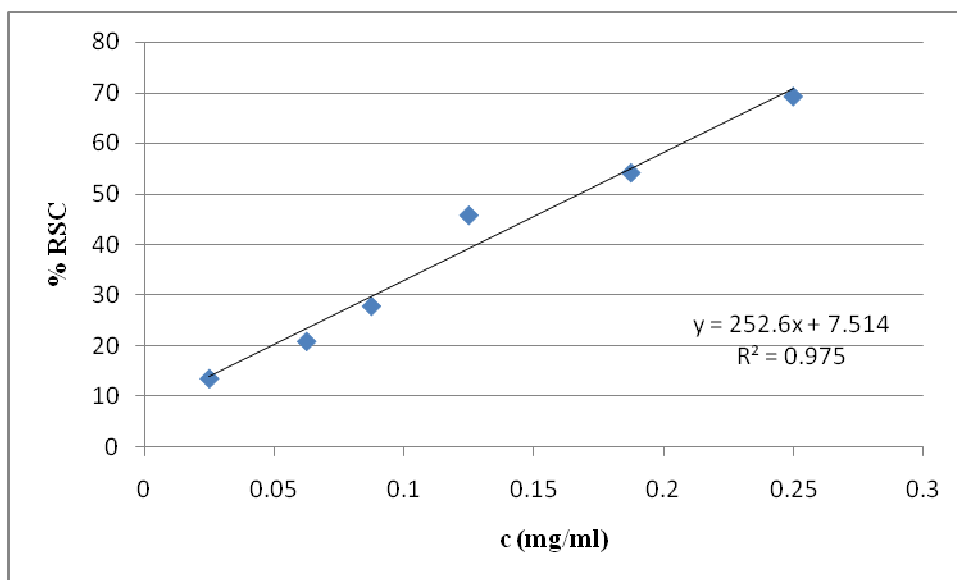
<b>Koncentracija tinkture (mg/ml)</b>	0,025	0,625	0,088	0,125	0,188	0,250
<b>% RSC</b>	13,60	20,91	27,87	45,77	54,13	69,15

U Tabeli 27 se uočava da sa povećanjem koncentracije tinkture timijana raste i procenat neutralizacije DPPH radikala, odnosno redukujući kapacitet.

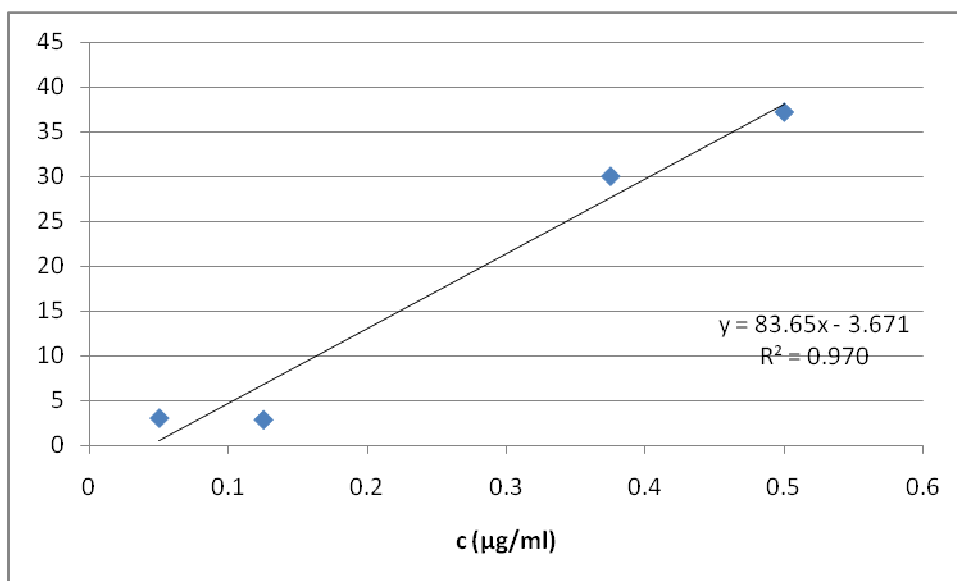
Rezultati DPPH testa izraženi su kroz srednju vrednost srednje inhibitorne koncentracije IC<sub>50</sub>, koja predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnu da stabilizuje 50% prisutnog DPPH radikala u testiranom rastvoru.

Rezultati DPPH testa pokazuju da tinktura timijana poseduju visoku aktivnost neutralisanja slobodnih radikala. Koeficijent determinacije je iznosio 97,5% (R<sup>2</sup>=0,975) (Grafikon 12), a vrednost IC<sub>50</sub> je iznosila 0,169 mg/ml. Kao kontrola, korišćen je dobro poznati antioksidans, askorbinska kiselina (vitamin C). Koeficijent determinacije za askorbinsku kiselinu

iznosio je 0,970 ( $R^2=0,970$ ) (Grafikon 13), a vrednost  $IC_{50}$  je iznosila 0,642  $\mu\text{g/ml}$ . Prema tome, 1 mg askorbinske kiseline ekvivalentan je 263,2 mg tinkture timijana.

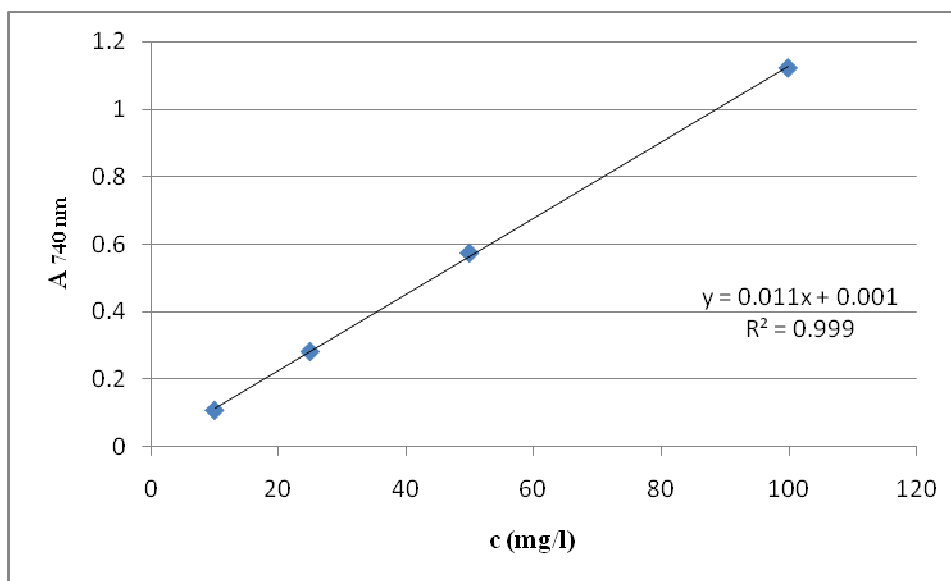


**Grafikon 12.** Procenat neutralizacije DPPH radikala (% RSC) tinkturom timijana



**Grafikon 13.** Procenat neutralizacije DPPH radikala (% RSC) askorbinskom kiselinom

Na Grafikonu 14 je prikazana kalibraciona kriva galne kiseline, dobijena tokom određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorku tinkture timijana, pomoću Folin-Ciocalteu metoda.



**Grafikon 14.** Kalibraciona kriva za galnu kiselinu

**Tabela 28.** Sadržaj ukupnih fenola (TPC, mg GAE/l) ispitivanog uzorka tinkture timijana

	<b>Tinktura timijana</b>
<b>TPC, mg GAE/l</b>	4859,77

Ukupan sadržaj fenola u ispitivanom uzorku tinkture timijana, koji je određen pomoću Folin-Ciocalteu metoda je 4.589,77 mg GAE.

### 5.5.2 *In vivo* antioksidativna aktivnost

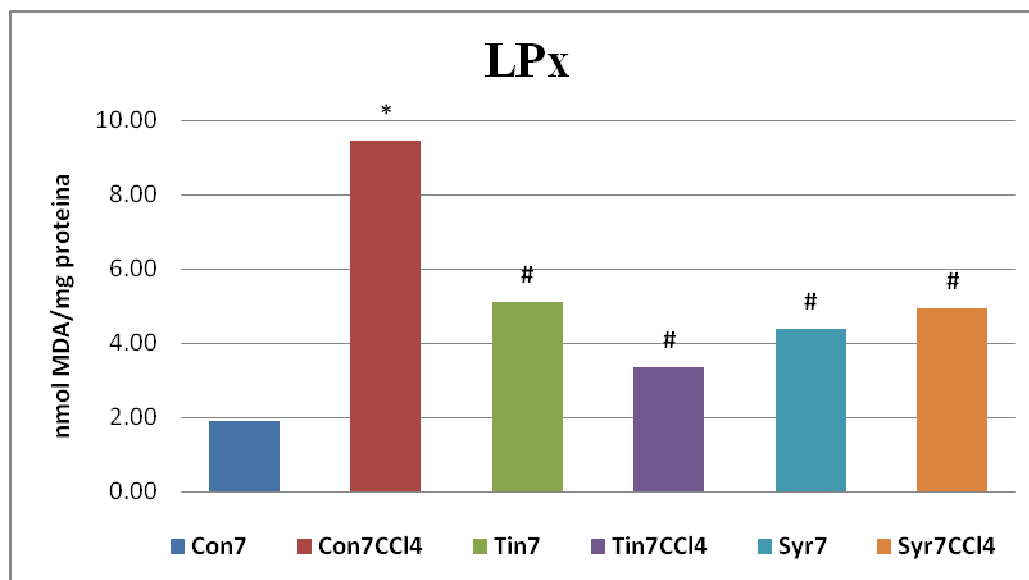
U homogenatu jetre ispitivanih pacova određen je intenzitet lipidne peroksidacije (LPx) na osnovu koncentracije malondialdehida, kao i aktivnost enzima ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), peroksidaze (Px), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i redukovanog glutationa (GSH). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 29, kao i na Grafikonima koji slede. Primenom jednofaktorske ANOVA-e analizirano je postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

**Tabela 29.** Intenzitet LPx (nmol MDA/mg proteina), aktivnost XOD (nmol/mg proteina/min), CAT (nmol/mg proteina/min), Px (nmol/mg proteina/min), GPx (nmol/mg proteina/min), GR (nmol/mg proteina/min) i GSH (nmol GSH/mg proteina) u jetri ispitivanih pacova (X±SD)

Grupa	LPx	XOD	CAT	Px	GPx	GR	GSH
Con7	1,88±0,98	1,22±0,07	9,18±0,19	5,84±0,96	9,08±1,91	2,24±1,01	1,81±0,52
Con7CCl <sub>4</sub>	9,43±3,65*	2,07±0,13*	2,41±0,71*	3,65±0,45*	18,72±1,22*	1,61±0,41	0,78±0,25
Tin7	5,12±1,82 <sup>#</sup>	1,52±0,38 <sup>#</sup>	8,28±0,64 <sup>#</sup>	8,58±0,83 <sup>*,#</sup>	13,35±1,15 <sup>*,#</sup>	3,51±0,72 <sup>*,#</sup>	1,26±0,49
Tin7CCl <sub>4</sub>	3,36±3,45 <sup>#</sup>	1,48±0,10 <sup>#</sup>	4,70±0,46 <sup>*,#</sup>	6,96±0,92 <sup>#</sup>	13,16±2,16 <sup>*,#</sup>	2,26±0,57	1,23±0,67
Syr7	4,38±1,96 <sup>#</sup>	1,48±0,04 <sup>#</sup>	6,29±0,81 <sup>*,#</sup>	6,45±0,48 <sup>#</sup>	9,65±0,94 <sup>#</sup>	2,60±0,69	1,32±0,64
Syr7CCl <sub>4</sub>	4,92±1,59 <sup>#</sup>	1,60±0,14 <sup>*,#</sup>	4,18±0,72 <sup>*,#</sup>	5,40±0,79 <sup>#</sup>	12,96±2,00 <sup>*,#</sup>	2,59±0,49	3,17±1,11 <sup>*,#</sup>

\* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

<sup>#</sup> p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu



**Grafikon 15.** Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol MDA/mg proteina)

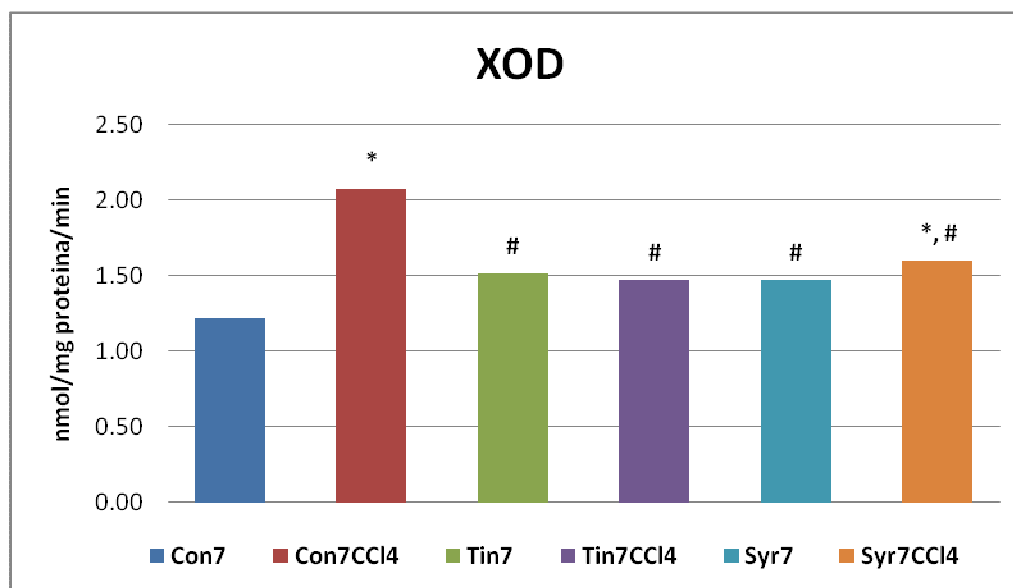
\* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

<sup>#</sup> p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

Dobijeni rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri ispitivanih grupa životinja. Vrednost LPx u jetri je statistički značajno veća u grupi tretiranoj kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>) u odnosu na kontrolnu



grupu (Con7). Razlika u vrednosti LPx je statistički značajna između grupe koja je dobijala fiziološki rastvor i ugljen-tetrahlorid (Con7CCl<sub>4</sub>) i između eksperimentalnih grupa koje su pretretirane tinkturom timijana (Tin7) i sirupom timijana (Syr7), kao i kombinacijom tinktura timijana i ugljen-tetrahlorid (Tin7CCl<sub>4</sub>) i sirup timijana i ugljen-tetrahlorid (Syr7CCl<sub>4</sub>).

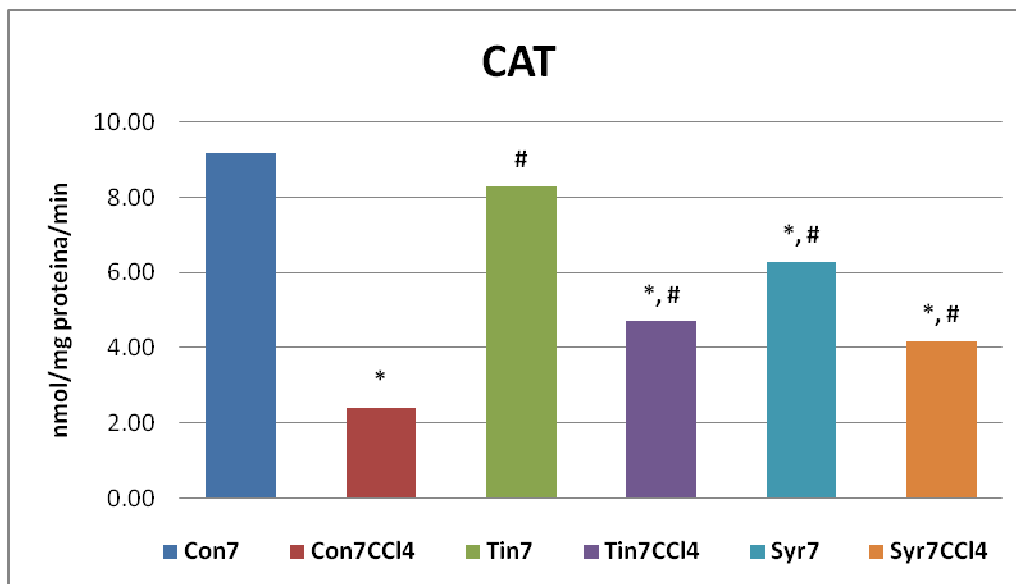


**Grafikon 16.** Aktivnost enzima ksantin oksidaze (nmol/mg proteina/min)

\* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

# p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 16 se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji enzima ksantin oksidaze u jetri ispitivanih grupa životinja. Sve grupe koje su imale jednokratni tretman ugljen-tetrahloridom, imaju veće vrednosti XOD u poređenju sa kontrolnom grupom koja je tretirana samo fiziološkim rastvorom (Con7). Vrednost XOD je statistički značajno manja u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu koja je nakon fiziološkog rastvora tretirana ugljen-tetrahloridom (Con7CCl<sub>4</sub>), kao i u odnosu na grupu koja je nakon primene sirupa timijana tretirana ugljen-tetrahloridom (Syr7CCl<sub>4</sub>). Koncentracija XOD je najveća u grupi Con7CCl<sub>4</sub>. U svim eksperimentalnim grupama vrednost enzima XOD je statistički značajno manja u poređenju sa grupom Con7CCl<sub>4</sub>.

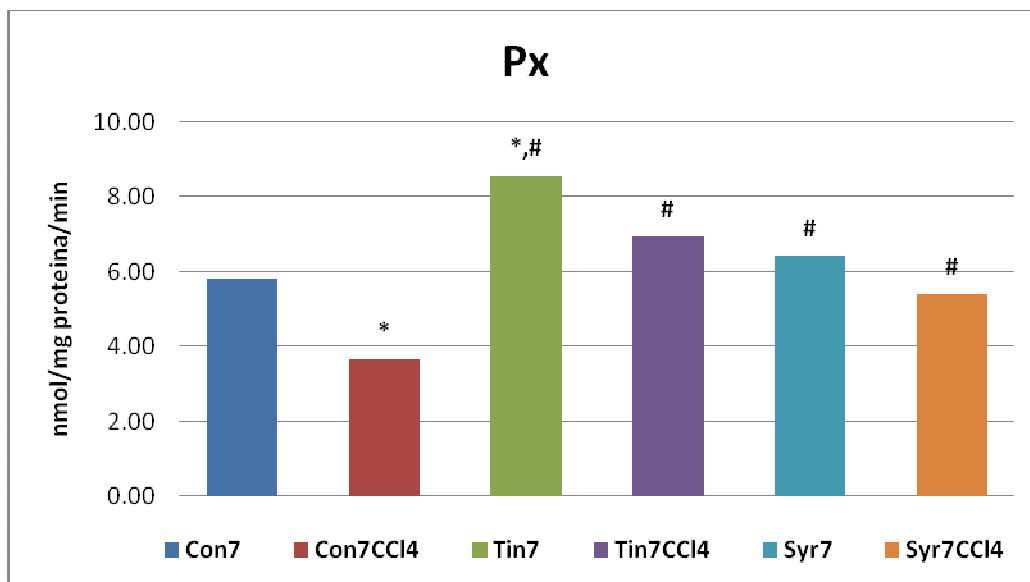


**Grafikon 17.** Aktivnost enzima katalaze (nmol/mg proteina/min)

\* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

# p<0,05 u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 17 prikazani su rezultati aktivnosti enzima katalaze u jetri ispitivanih grupa životinja. Aktivnost enzima katalaze izražena je u nmol/mg proteina/min. Aktivnost enzima katalaze je najveća u kontrolnoj grupi, tretiranoj fiziološkim rastvorom. Tretman sa ugljen-tetrahloridom je u svim grupama statistički značajno smanjio aktivnost enzima katalaze. Takođe, aktivnost enzima katalaze je statistički značajno smanjena i grupi tretiranoj sirupom timijana. Koncentracija katalaze je najniža u grupi tretiranoj kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>). Razlika u koncentraciji katalaze je statistički značajna između grupe Con7CCl<sub>4</sub> i eksperimentalnih grupa tretiranih tinkturom timijana (Tin7) i sirupom timijana (Syr7), kao kombinacijama tinktura timijana i ugljen-tetrahlorid (Tin7CCl<sub>4</sub>) i sirup timijana i ugljen-tetrahlorid (Syr7CCl<sub>4</sub>).

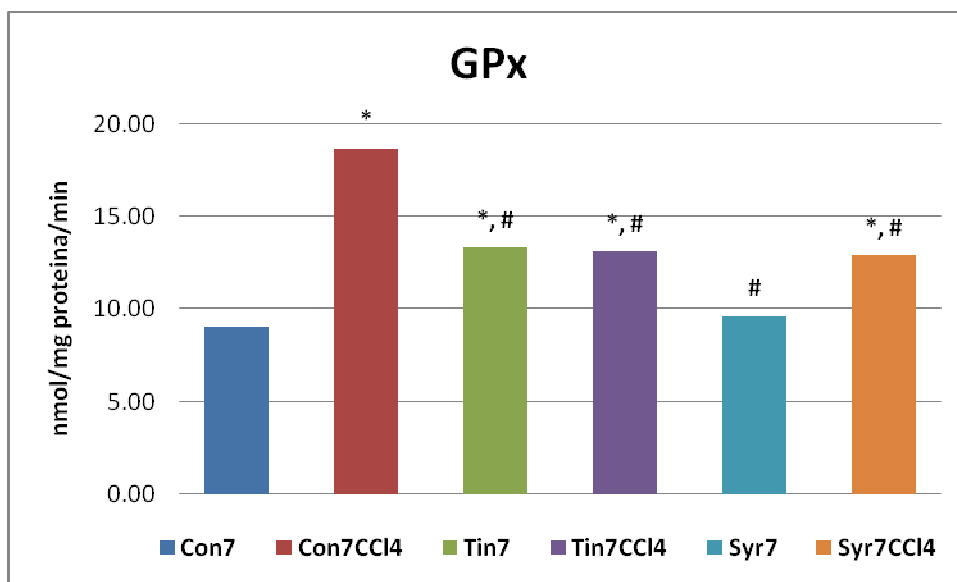


**Grafikon 18.** Aktivnost enzima peroksidaze (nmol/mg proteina/min)

\*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

#  $p < 0,05$  u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 18 iz priloženih rezultata se može uočiti da je tretman sa ugljen-tetrahloridom doveo do smanjenja aktivnosti enzima peroksidaze, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama. U poređenju sa grupom koja je tretirana kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorda (Con7CCl<sub>4</sub>), koncentracija enzima peroksidaze je u svim drugim eksperimentalnim grupama (Tin7, Tin7CCl<sub>4</sub>, Syr7CCl<sub>4</sub>, Syr7) statistički značajno veća. Koncentracija peroksidaze je najveća u grupi tretiranoj tinkturom timijana (Tin7).



**Grafikon 19.** Aktivnost enzima glutation peroksidaze (nmol/mg proteina/min)

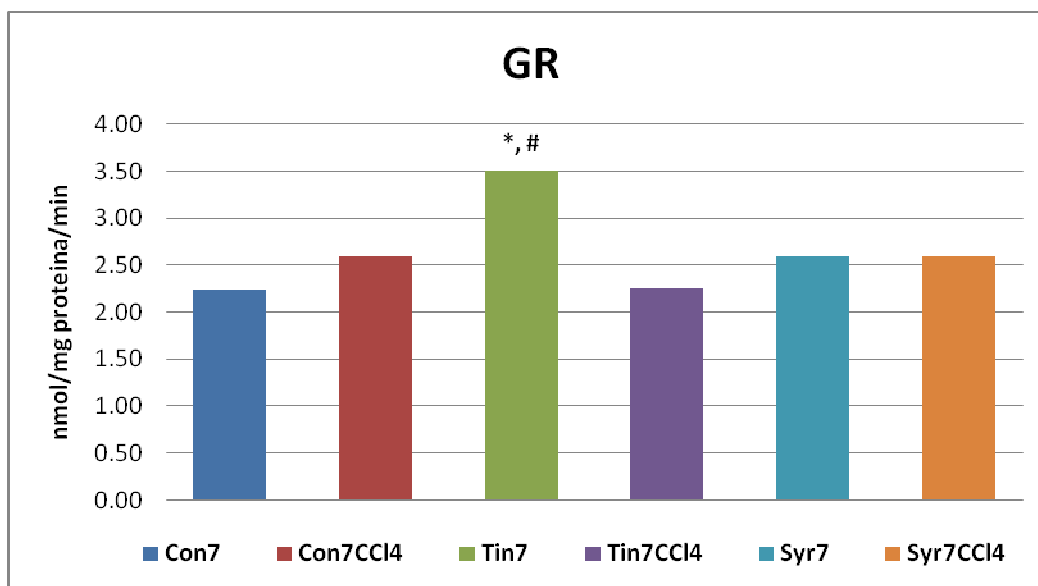
\*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

#  $p < 0,05$  u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 19 prikazani su rezultati aktivnosti enzima glutation reduktaze. Iz priloženih rezultata se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GPx u jetri između ispitivanih grupa nakon sedmodnevnog tretmana. Tretman sa ugljen-tetrahloridom je povećao aktivnost enzima glutation reduktaze u grupama Con7CCl<sub>4</sub> i Syr7CCl<sub>4</sub>, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama, Con7 i Syr7.

Najniža koncentracija enzima glutation reduktaze je kod grupe tretirane samo fiziološkim rastvorom (Con7). Statistički značajna razlika u koncentraciji GPx postoji između grupe Con7 i grupa koje su imale tretman sa ugljen-tetrahloridom (Con7CCl<sub>4</sub>, Tin7CCl<sub>4</sub>, Syr7CCl<sub>4</sub>), kao i u odnosu na grupu koja je tretirana tinkturom timijana (Tin7).

Primena preparata timijana, kako tinkture tako i sirupa, kao i kombinacija ovih preparata sa ugljen-tetrahloridom, dovela je do statistički značajnog smanjenja koncentracija enzima glutation reduktaze u poređenju sa grupom koja je primala samo ugljen-tetrahlorid (Con7).

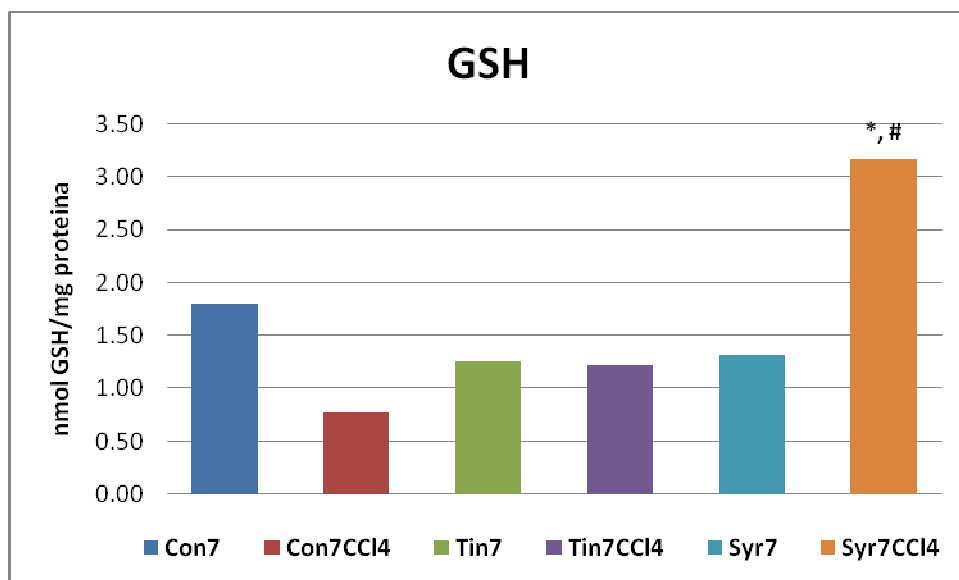


**Grafikon 20.** Aktivnost enzima glutation reduktaze (nmol/mg proteina/min)

\*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

#  $p < 0,05$  u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 20 prikazani su rezultati aktivnosti enzima glutation reduktaze u jetri ispitivanih grupa životinja, a koncentracija enzima GR izražena je u nmol/mg proteina/min. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da je tretman sa ugljen-tetrahloridom doveo do smanjenja aktivnosti enzima glutation reduktaze, u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama. U eksperimentalnoj grupi tretiranoj samo tinkturom timijana koncentracija enzima glutation reduktaze je bila statistički značajno veća u poređenju sa grupom tretiranom sa fiziološkim rastvorom (Con7), kao i u poređenju sa grupom koja je tretirana kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>). U ostalim grupama nivo aktivnosti enzima glutation reduktaze nije se statistički značajno menjao.



**Grafikon 21.** Aktivnost redukovanog glutationa (nmol GSH/mg proteina)

\*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Con7)

#  $p < 0,05$  u odnosu na Con7CCl<sub>4</sub> grupu

U Tabeli 29 i Grafikonu 21 prikazani su rezultati aktivnosti redukovanog glutationa u jetri ispitivanih grupa životinja, a koncentracija enzima GSH izražena je u nmol GSH/mg proteina. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da je aktivnost redukovanog glutationa značajno povećana kod eksperimentalne grupe koja je primala sirup timijana i ugljen-tetrahlorid (Syr7CCl<sub>4</sub>), u poređenju sa kontrolnom grupom (Con7) i grupom tretiranom kombinacijom fiziološkog rastvora i ugljen-tetrahlorida (Con7CCl<sub>4</sub>). Između ostalih ispitivanih grupa ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti redukovanog glutationa.

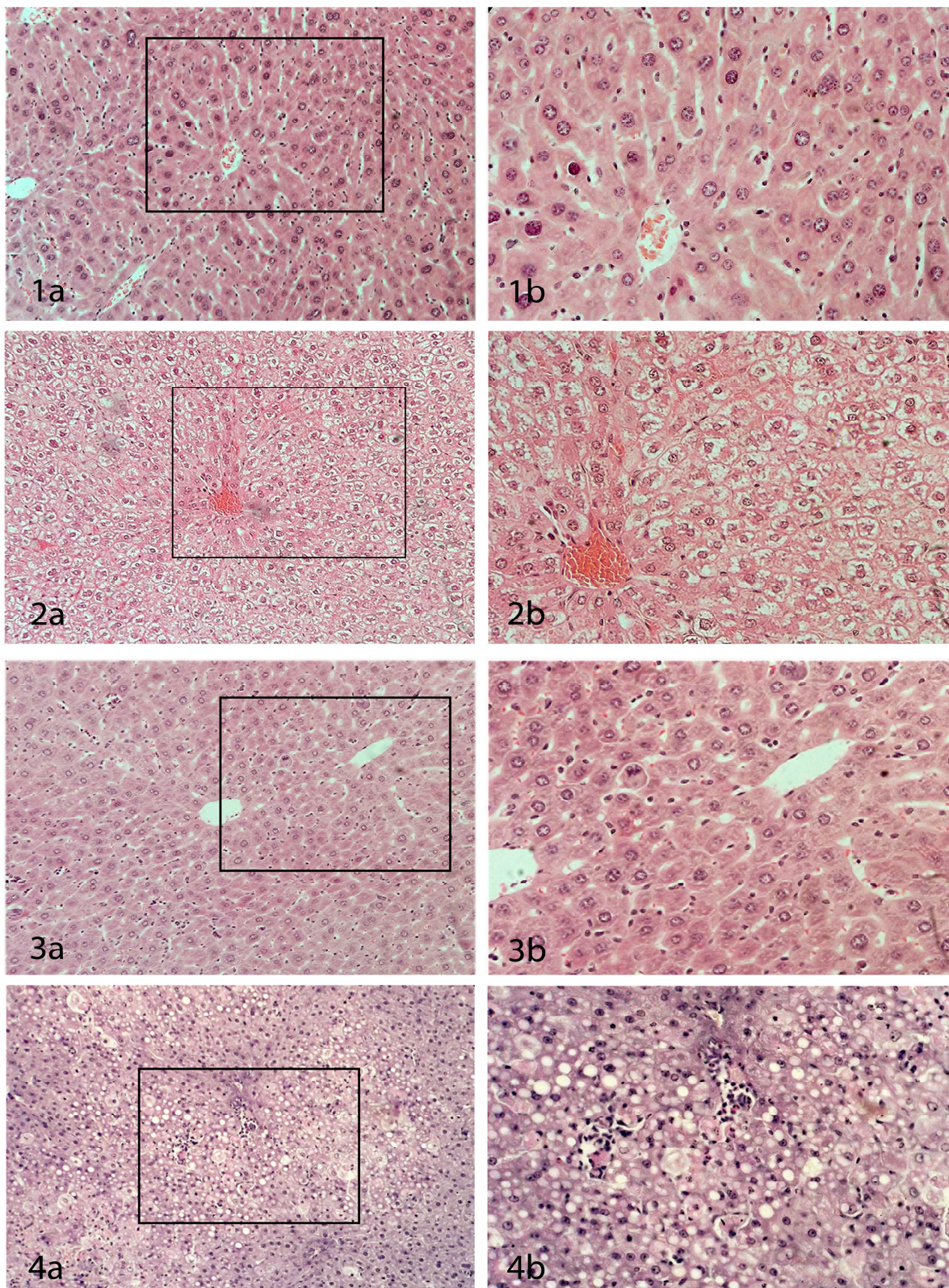
## 5.6 Morfološka ispitivanja

Morfološke promene jetre ispitane su standardnom hematoksilin i eozin metodom (H&E metodom). U kontrolnoj grupi, histopatološka ispitivanja jetrenog tkiva su pokazala normalnu ćelijsku građu uz prisustvo različitih jetrenih ćelija, sinusoidalnog prostora i centralne vene. Hepatociti imaju homogenu citoplazmu i centralno pozicionirano jedro, uobičajenih dimenzija. Sinusoidalni kapilari su uobičajene veličine, bez prisustva limfocitnog infiltrata. Arterija, vena interlobularis i žučni kanalići su prisutni u Kiernan-ovom prostoru (Slika 11.1). Kod eksperimentalne grupe tretirane tokom sedam dana tinkturom timijana nije bilo razlike prilikom

histološke analize jetrenog tkiva u poređenju sa kontrolnom grupom, tretiranom fiziološkim rastvorom (Slika 11.3).

Histopatološka analiza isečaka jetre životinja tretiranih ugljen-tetrahloridom pokazala je jasno prisustvo konfluentne nekroze centrobulbarnog dela, a delimično i intermedijarne zone klasičnog jetrenog režnja. Takođe, u centrobulbarnom delu može se primetiti acidofilna degeneracija i koagulaciona nekroza hepatocita. U intermedijernoj zoni se primećuju znaci masne degeneracije i hepatociti u vidu matiranog stakla (*ground-glass*). Hepatociti perifernih zona se takođe odlikuju masnim promenama sa mikro- i makrocitoplazmatskim masnim kapljicama (Slika 11.2). Ove promene u građi jetre nisu primećene u kontrolnoj grupi niti u grupi tretiranoj samo tinkturom timijana.

Primena timijana u kombinaciji sa ugljen-tetrahloridom nije poboljšala morfološke promene izazavane ugljen-tetrahloridom, s obziorn da nisu primećene razlike prilikom histološke analize jetrenog tkiva ove grupe i grupe koja je primala samo ugljen-tetrahlorid (Slika 11.4).



**Slika 11.** Isečci jetre, 100x (a) i 400x (b). Kontrolna grupa (1), grupa tretirana sa  $\text{CCl}_4$  (2) ili tinkturom timijana (3), i kombinacijom  $\text{CCl}_4$  i tinktura timijana (4), H&E



## 5.7 Stabilnost sirupa timijana

Tokom ispitivanja stabilnosti sirupa timijana određivane su koncentracije timola i karvakrola u ispitivanim uzorcima sirupa, u periodu od deset dana nakon prvog otvaranja. Dobijeni rezultati su prikazani u tabelama koje slede.

**Tabela 30.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 4°C, sekundarna ambalaža, mrak ( $X \pm SD$ )

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym ( $\mu\text{g/g}$ )	Thym ( $\mu\text{g/g}$ )	Thym ( $\mu\text{g/g}$ )	Thym ( $\mu\text{g/g}$ )	Thym ( $\mu\text{g/g}$ )
<u>1.1</u>	10,95±0,63	10,66±0,28	10,99±0,20	10,73±0,24	10,64±0,11
<u>1.2</u>	10,90±0,65	10,85±0,29	10,79±0,36	10,63±0,18	10,56±0,18
<u>1.3</u>	10,89±0,56	10,94±0,28	10,59±0,44	10,63±0,18	10,65±0,30

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u Tabeli 30 uočava se da između tri ispitivane serije sirupa timijana, koje su čuvane pri istim uslovima ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama timola tokom ispitivanog perioda nakon prvog otvaranja.

Poređenjem razlike u koncentraciji timola tokom prvog i poslednjeg dana ispitivanja, u okviru iste ispitivane grupe, odnosno serije sirupa timijana, utvrđeno je da je koncentracija timola prvog dana bila veća u poređenju sa koncentracijom desetog dana, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

**Tabela 31.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 4°C, sekundarna ambalaža, mrak ( $X \pm SD$ )

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )
<u>1.1</u>	0,51±0,05	0,53±0,02	0,55±0,03	0,51±0,03	0,49±0,03
<u>1.2</u>	0,52±0,06	0,50±0,03	0,52±0,05	0,50±0,03	0,49±0,03
<u>1.3</u>	0,52±0,07	0,52±0,04	0,50±0,05	0,49±0,03	0,45±0,03 <sup>*, y, x</sup>

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na 1.1 grupu

<sup>y</sup> p<0,05 u odnosu na 1.2 grupu

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 31 je dat prikaz rezultata ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Uslovi čuvanja su bili: temperatura od 4°C, sekundarna ambalaža i mrak. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je desetog dana nakon prvog otvaranja, koncentracija karvakrola statistički značajno niža u grupi 1.3 u odnosu na druge dve ispitivane grupe, dok između ostalih grupa ne postoji značajna razlika u koncentraciji karvakrola.

Poređenjem razlike u koncentraciji karvakrola tokom prvog i poslednjeg dana ispitivanja, u okviru iste ispitivane grupe, odnosno serije sirupa timijana, utvrđeno je da je koncentracija karvakrola u grupi 1.3 desetog dana bila statistički značajno niža u poređenju sa prvim danom nakon otvaranja. Kod ostalih grupa, koncentracija karvakrola je desetog dana bila niža u odnosu na prvi dan, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

**Tabela 32.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 4°C, primarna ambalaža, mrak ( $X \pm SD$ )

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>2.1</u>	10,74±0,27	10,76±0,45	10,70±0,30	10,67±0,17	10,67±0,25
<u>2.2</u>	10,83±0,10	10,72±0,38	10,60±0,51	10,53±0,34	10,69±0,33
<u>2.3</u>	10,81±0,26	10,79±0,30	10,73±0,36	10,66±0,32	10,46±0,28 <sup>x</sup>

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 32 je dat prikaz rezultata promene koncentracije timola tokom ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Uslovi čuvanja su bili: 4°C, primarna ambalaža i mrak. Tokom ispitivanog perioda nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji timola između ispitivanih serija sirupa timijana, odnosno između ispitivanih grupa.

U poređenju sa koncentracijom timola prvog dana nakon otvaranja, u grupi 2.3 je koncentracija desetog dana bila statistički značajno niža. Takođe, u svim ostalim grupama, koncentracija timola je bila manja desetog dana u odnosu na prvi dan, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 33.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 4°C, primarna ambalaža, mrak (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)
<u>2.1</u>	0,48±0,03	0,48±0,08	0,50±0,04	0,51±0,03	0,48±0,01
<u>2.2</u>	0,50±0,03	0,50±0,03	0,49±0,04	0,49±0,04	0,47±0,01 <sup>x</sup>
<u>2.3</u>	0,49±0,02	0,46±0,05	0,49±0,04	0,48±0,01 <sup>*</sup>	0,47±0,02

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na 1.1 grupu

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 33 je dat prikaz rezultata promene koncentracije karvakrola tokom ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Sirupi su čuvani na temperaturi od 4°C, u primarnoj ambalaži i na tamnom mestu. Koncentracija karvakrola je tokom sedmog dana nakon otvaranja sirupa u grupi 2.3 bila statistički značajno niža u poređenju sa grupom 2.2. Između ostalih ispitivanih grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola.

Koncentracija karvakrola je desetog dana nakon otvaranja bila statistički značajno manja u grupi 2.2, u odnosu na njegovu koncentraciju prvog dana. U ostalim ispitivanim grupama nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola između prvog i desetog dana nakon otvaranja sirupa.

**Tabela 34.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, sekundarna ambalaža, mrak (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>3.1</u>	9,63±0,28	9,22±0,21	9,25±0,04	9,32±0,23	9,16±0,22 <sup>x</sup>
<u>3.2</u>	9,40±0,26	9,16±0,45	9,26±0,05	9,12±0,23	9,23±0,26
<u>3.3</u>	9,20±0,41	9,35±0,47	9,27±0,08	9,29±0,17	9,18±0,19

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 34 je dat prikaz rezultata promene koncentracije timola tokom ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Sirupi su čuvani na temperaturi

od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na tamnom mestu. Između ispitivanih serija, odnosno grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji timola tokom ispitivanog perioda čuvanja, odnosno 10 dana nakon otvaranja sirupa.

Koncentracija timola je desetog dana nakon otvaranja u grupi 3.1 bila statistički značajno manja, u poređenju sa koncentracijom timola prvog dana nakon otvaranja sirupa. Takođe, u svim ostalim ispitivanim grupama, koncentracija timola je bila manja desetog dana u odnosu na prvi dan, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 35.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, sekundarna ambalaža, mrak (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)
<u>3.1</u>	0,40±0,03	0,36±0,05	0,37±0,04	0,37±0,02	0,35±0,02 <sup>x</sup>
<u>3.2</u>	0,41±0,02	0,36±0,04	0,37±0,07	0,37±0,03	0,33±0,03 <sup>x</sup>
<u>3.3</u>	0,42±0,03	0,36±0,04	0,36±0,02	0,34±0,06	0,34±0,04 <sup>x</sup>

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

Promene u koncentraciji karvakrola u tri ispitivane serije sirupa timijana nakon prvog otvaranja prikazane su Tabeli 35. Sve tri ispitivane serije sirupa su čuvane u istim uslovima, na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na tamnom mestu. Između ispitivanih grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola tokom ispitivanog perioda.

Koncentracija karvakrola je desetog dana nakon otvaranja sirupa bila u sve tri ispitivane grupe statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju karvakrola prvog dana.

**Tabela 36.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, primarna ambalaža, svetlost (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>4.1</u>	9,91±0,72	9,63±0,64	9,33±0,32	9,62±0,60	9,59±0,82
<u>4.2</u>	9,73±0,61	9,76±0,73	9,62±0,26	9,42±0,44	9,39±0,42
<u>4.3</u>	9,51±0,64	9,52±0,78	9,74±0,44	9,48±0,44	9,11±0,31

U Tabeli 36 je dat prikaz rezultata promene koncentracije timola tokom ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Sirupi su čuvani na temperaturi od 20°C, u primarnoj ambalaži i na svetlom mestu. Između ispitivanih serija, odnosno grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji timola tokom ispitivanog perioda čuvanja, odnosno 10 dana nakon otvaranja sirupa.

Poređenjem razlike u koncentraciji timola tokom prvog i poslednjeg dana ispitivanja, u okviru iste ispitivane grupe, odnosno serije sirupa timijana, utvrđeno je da je koncentracija timola prvog dana bila veća u poređenju sa koncentracijom desetog dana, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 37.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, primarna ambalaža, svetlost (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)
<u>4.1</u>	0,44±0,13	0,40±0,09	0,46±0,12	0,42±0,11	0,38±0,09
<u>4.2</u>	0,46±0,08	0,43±0,05	0,43±0,06	0,37±0,06	0,42±0,10
<u>4.3</u>	0,48±0,08	0,44±0,06	0,38±0,04	0,41±0,13	0,39±0,13

Promene u koncentraciji karvakrola u tri ispitivane serije sirupa timijana nakon prvog otvaranja prikazane su Tabeli 37. Sve tri ispitivane serije sirupa su čuvane u istim uslovima, na temperaturi od 20°C, u primarnoj ambalaži i na svetlom mestu. Između ispitivanih grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola tokom ispitivanog perioda nakon prvog otvaranja sirupa.

Poređenjem razlike u koncentraciji karvakrola tokom prvog i poslednjeg dana ispitivanja, u okviru iste ispitivane grupe, odnosno serije sirupa timijana, utvrđeno je da je koncentracija karvakrola desetog dana bila manja u poređenju sa prvim danom nakon otvaranja u sve 3 ispitivane grupe, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 38.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, sekundarna ambalaža, svetlost (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>5.1</u>	10,97±0,13	10,79±0,77	9,72±0,09	9,06±0,26	8,51±0,35 <sup>x</sup>
<u>5.2</u>	10,96±0,05	11,17±0,96	9,81±0,17	9,18±0,12	8,59±0,13 <sup>x</sup>
<u>5.3</u>	10,95±0,12	10,68±0,52	9,65±0,51	9,15±0,18	8,50±0,11 <sup>x</sup>

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 38 je dat prikaz rezultata ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Ispitivani sirupi timijana su čuvani na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu. U ispitivanim sirupima određivana je koncentracija timola. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je tokom ispitivanog perioda od deset dana nakon prvog otvaranja, ne postoji značajna razlika u koncentraciji timola između ispitivanih grupa.

Poređenjem razlike u koncentraciji timola tokom prvog i poslednjeg dana ispitivanja, u okviru iste ispitivane grupe, odnosno serije sirupa timijana, utvrđeno je da je koncentracija timola desetog dana bila statistički značajno manja u sve tri ispitivane grupe sirupa, u poređenju sa prvim danom nakon otvaranja.

**Tabela 39.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 20°C, sekundarna ambalaža, svetlost (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)	Carv (µg/g)
<u>5.1</u>	0,47±0,08	0,56±0,16	0,42±0,13	0,27±0,08	0,32±0,06 <sup>x</sup>
<u>5.2</u>	0,51±0,06	0,54±0,16	0,47±0,10	0,36±0,10	0,30±0,05 <sup>x</sup>
<u>5.3</u>	0,52±0,12	0,43±0,10	0,35±0,04 <sup>y</sup>	0,42±0,06 <sup>*</sup>	0,29±0,09 <sup>x</sup>

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na 5.1 grupu

<sup>y</sup> p<0,05 u odnosu na 5.2 grupu

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

Promene u koncentraciji karvakrola u tri ispitivane serije sirupa timijana nakon prvog otvaranja prikazane su Tabeli 39. Sve tri ispitivane serije sirupa su čuvane u istim uslovima, na

temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu. Koncentracija karvakrola je tokom petog dana nakon prvog otvaranja bila značajno manja u grupi 5.3 u poređenju sa grupom 5.2, dok je desetog dana nakon otvaranja koncentracija karvakrola bila veća u grupi 5.3 u odnosu na grupu 5.1. U svim ostalim ispitivanim grupama nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola tokom ispitivanog perioda čuvanja nakon prvog otvaranja sirupa.

Koncentracija karvakrola je desetog dana nakon otvaranja sirupa bila u sve tri ispitivane grupe statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju karvakrola prvog dana.

**Tabela 40.** Sadržaj timola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 37°C, primarna ambalaža, mrak (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>6.1</u>	9,70±0,52	9,84±0,38	9,53±0,26	9,56±0,52	9,10±0,60
<u>6.2</u>	9,67±0,25	9,73±0,22	9,53±0,38	9,86±0,64	9,15±0,35 <sup>x</sup>
<u>6.3</u>	9,75±0,16	9,69±0,30	9,41±0,40	9,24±0,65	9,54±0,38

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 40 je dat prikaz rezultata ispitivanja stabilnosti tri serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja. Ispitivani sirupi timijana su čuvani na temperaturi od 37°C, u primarnoj ambalaži i na tamnom mestu. U ispitivanim sirupima određivana je koncentracija timola. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je tokom ispitivanog perioda od deset dana nakon prvog otvaranja, ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji timola između ispitivanih serija sirupa, odnosno grupa.

Koncentracija timola je desetog dana nakon otvaranja u grupi 6.2 bila statistički značajno manja, u poređenju sa koncentracijom timola prvog dana nakon otvaranja sirupa. Takođe, u svim ostalim ispitivanim grupama, koncentracija timola je bila manja desetog dana u odnosu na prvi dan, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tabela 41.** Sadržaj karvakrola u 3 ispitivane serije sirupa timijana pri istim uslovima čuvanja: 37°C, primarna ambalaža, mrak ( $X \pm SD$ )

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )
<u>6.1</u>	0,46 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,05 <sup>x</sup>
<u>6.2</u>	0,41 $\pm$ 0,05 <sup>*</sup>	0,43 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,04
<u>6.3</u>	0,41 $\pm$ 0,04 <sup>*</sup>	0,42 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,06

<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na 6.1 grupu

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 1. dan

U Tabeli 41 prikazani su rezultati praćenja stabilnosti sirupa timijana, odnosno promene u koncentraciji karvakrola tokom ispitivanog perioda čuvanja sirupa. Ispitivane su tri serije sirupa timijana, tokom vremenskog perioda od deset dana nakon prvog otvaranja. Sve serije su čuvane na temperaturi od 37°C, u primarnoj ambalaži i na tamnom mestu. Koncentracija karvakrola je tokom prvog dana bila značajno niža u grupama 6.2 i 6.3 u poređenju sa grupom 6.1. U svim ostalim ispitivanim grupama nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji karvakrola tokom ispitivanog perioda.

Koncentracija karvakrola je desetog dana nakon otvaranja bila statistički značajna manja u grupi 6.1, u odnosu na njegovu koncentraciju prvog dana. Takođe, u ostalim ispitivanim grupama koncentracija karvakrola je bila manja desetog dana, u poređenju sa prvim danom nakon otvaranja, ali te razlike nisu bile statistički značajne.



U Tabeli 42 i na Grafikonu 23 dat je prikaz rezultata promene koncentracije timola u ispitivanim grupama, koje su čuvane pri različitim uslovima.

**Tabela 42.** Sadržaj timola u 6 ispitivanih serija sirupa timijana pri različitim uslovima čuvanja (X±SD)

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)	Thym (µg/g)
<u>1</u>	10,91±0,58	10,82±0,29	10,79±0,37	10,68±0,21	10,61±0,21
<u>2</u>	10,79±0,22	10,75±0,36	10,68±0,38	10,62±0,28	10,61±0,29
<u>3</u>	9,41±0,35 <sup>*,y</sup>	9,24±0,38 <sup>*,y</sup>	9,26±0,05 <sup>*,y</sup>	9,24±0,22 <sup>*,y</sup>	9,19±0,21 <sup>*,y</sup>
<u>4</u>	9,72±0,64 <sup>*,y</sup>	9,64±0,68 <sup>*,y</sup>	9,56±0,37 <sup>*,y</sup>	9,51±0,48 <sup>*,y</sup>	9,36±0,56 <sup>*,y</sup>
<u>5</u>	10,96±0,10 <sup>x,z</sup>	10,88±0,76 <sup>x,z</sup>	9,73±0,30 <sup>*,y,x</sup>	9,13±0,19 <sup>*,y</sup>	8,53±0,21 <sup>*,y,x,z</sup>
<u>6</u>	9,70±0,33 <sup>*,y,w</sup>	9,76±0,30 <sup>*,x,w</sup>	9,49±0,37 <sup>*,y</sup>	9,55±0,63 <sup>*,y</sup>	9,36±0,46 <sup>*,y,w</sup>

\* p<0,05 u odnosu na 1 grupu

<sup>y</sup> p<0,05 u odnosu na 2 grupu

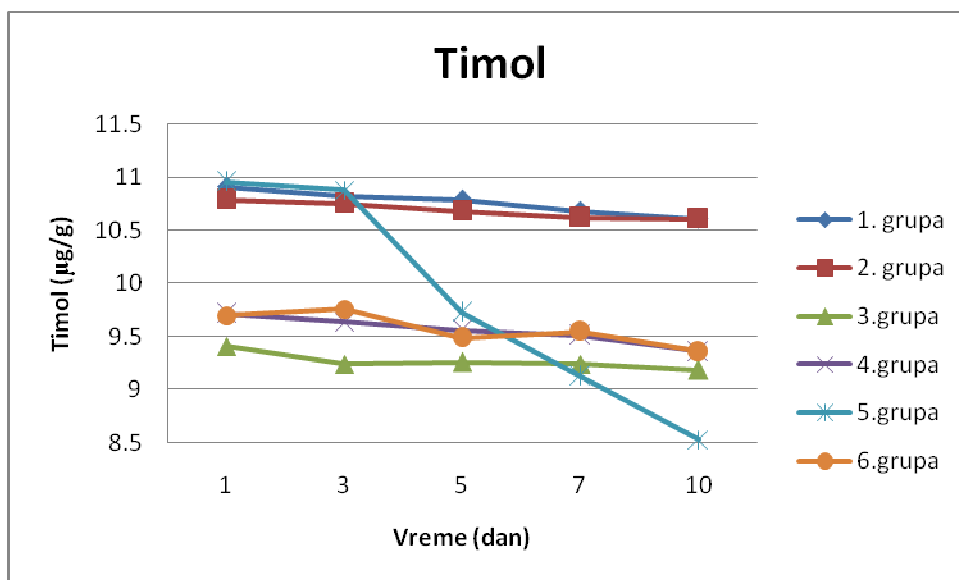
<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 3 grupu

<sup>z</sup> p<0,05 u odnosu na 4 grupu

<sup>w</sup> p<0,05 u odnosu na 5 grupu

U zavisnosti od uslova čuvanja postojala je razlika u koncentraciji timola u ispitivanim serijama sirupa timijana. Koncentracija timola je bila statistički značajno niža u grupama 3 i 4, odnosno pri čuvanju na temperaturi od 20°C, u poređenju sa grupama 1 i 2, koje su čuvane na temperaturi od 4°C. Takođe pri čuvanju sirupa na temperaturi od 37°C, odnosno u grupi 6, koncentracija timola je bila manja u poređenju sa grupama koje su čuvane na temperaturi od 4 °C (1,2). U grupi 5 koja je čuvana na temperaturi od 20°C, na svetlosti, koncentracija timola je tokom petog, sedmog i desetog dana, bila značajno niža nego u grupama 1 i 2, koje su čuvane na temperaturi od 4°C.

Na Grafikonu 22 uočavamo da je koncentracija timola u svim ispitivanim grupama bila manja desetog dana, nego prvog dana nakon otvaranja. Ove razlike nisu bile statistički značajne osim u grupi 5, koja je čuvana na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu.



**Grafikon 22.** Sadržaj timola u ispitivanim serijama sirupa timijana u zavisnosti od uslova čuvanja

U Tabeli 43 i na Grafikonu 23 dat je prikaz rezultata promene koncentracije timola u ispitivanim grupama, koje su čuvane pri različitim uslovima.

**Tabela 43.** Sadržaj karvakrola u 6 ispitivanih serija sirupa timijana pri različitim uslovima čuvanja ( $X \pm SD$ )

Grupa	Interval merenja				
	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	10. dan
	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )	Carv ( $\mu\text{g/g}$ )
<u>1</u>	0,52±0,06	0,52±0,02	0,52±0,05	0,50±0,03	0,47±0,03
<u>2</u>	0,49±0,03	0,48±0,05	0,49±0,04	0,49±0,03	0,47±0,02
<u>3</u>	0,41±0,03 <sup>*,y</sup>	0,36±0,04 <sup>*,y</sup>	0,37±0,04 <sup>*,y</sup>	0,36±0,04 <sup>*,y</sup>	0,34±0,04 <sup>*,y</sup>
<u>4</u>	0,46±0,10	0,42±0,07 <sup>*</sup>	0,42±0,08 <sup>*</sup>	0,40±0,10 <sup>*</sup>	0,40±0,11
<u>5</u>	0,50±0,09 <sup>x</sup>	0,51±0,15 <sup>x</sup>	0,42±0,10	0,35±0,10 <sup>*,y</sup>	0,30±0,06 <sup>*,y</sup>
<u>6</u>	0,43±0,04 <sup>*,y</sup>	0,43±0,03 <sup>*,x</sup>	0,40±0,05 <sup>*,y</sup>	0,41±0,05 <sup>*,y</sup>	0,38±0,05 <sup>*,y,w</sup>

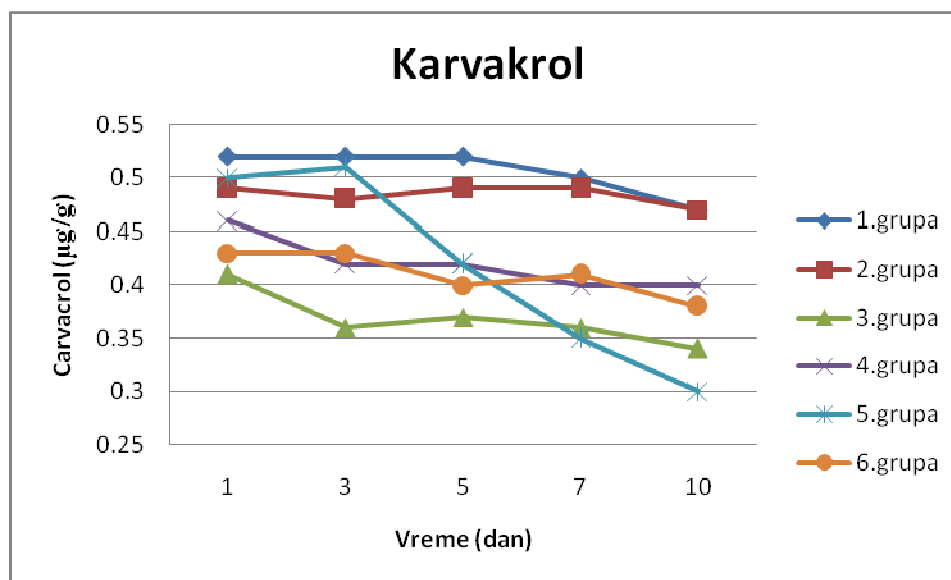
<sup>\*</sup> p<0,05 u odnosu na 1 grupu

<sup>y</sup> p<0,05 u odnosu na 2 grupu

<sup>x</sup> p<0,05 u odnosu na 3 grupu

<sup>w</sup> p<0,05 u odnosu na 5 grupu

Koncentracija karvakrola je bila statistički značajno niža u grupi 3, odnosno pri čuvanju na temperaturi od 20°C, u poređenju sa grupama 1 i 2, koje su čuvane na temperaturi od 4°C. Takođe, u grupi 6 čuvanoj na temperaturi od 37°C, koncentracija karvakrola je bila statistički značajno niža u poređenju sa grupama 1 i 2.



**Grafikon 23.** Sadržaj karvakrola u ispitivanim serijama sirupa timijana u zavisnosti od uslova čuvanja

Koncentracija karvakrola je desetog dana nakon otvaranja bila statistički značajno manja u grupi 3, koja je čuvana na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na tamnom mestu, u odnosu na koncentraciju karvakrola prvog dana. Takođe, u grupi 5, koja je čuvana na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu, koncentracija karvakrola je bila statistički značajno niža desetog dana, u odnosu na prvi dan. U ostalim ispitivanim grupama koncentracija karvakrola je bila manja desetog dana, u poređenju sa prvim danom nakon otvaranja, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

## 6 DISKUSIJA

### 6.1 Hemijska analiza sirupa i tinkture timijana

Hemijski sastav i sadržaj etarskog ulja u aromatičnim biljkama podložni su varijacijama, tako da biljke u okviru iste populacije mogu varirati u odnosu na glavnu monoterpensku komponentu. Analizom sekundarnih metabolita biljke *Thymus vulgaris* sa juga Francuske, utvrđeno je prisustvo šest hemotipova. Hemotipovi nose naziv prema dominantnoj komponenti etarskog ulja. Fenolni hemotipovi su timol i karvakrol, a nefenolnim hemotipovima pripadaju geraniol, linalool,  $\alpha$ -terpinol i tujanol-4 (Passet J, 1971). Međutim, u populacijama iz Španije nije primećeno postojanje geraniol hemotipa, dok je ustanovljeno prisustvo sedmog hemotipa, 1,8-cineol (Adzet T, 1977).

Prema zahtevu poslednje Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 7.0), herba timijana mora da sadrži najmanje 1,2% (12 ml/kg) etarskog ulja, u kome je ukupan sadržaj timola i karvakrola najmanje 40%. Evropska farmakopeja propisuje da se analiza etarskog ulja vrši gasnom hromatografijom.

Naše ispitivanje hemijskog sastava sirupa i tinkture timijana obuhvatalo je kvalitativnu i kvantitativnu analizu odabranih monoterpenskih fenola, timola i karvakrola, uz primenu GC-MS metode. Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da je timol (94,16  $\mu\text{g/g}$ ) dominantna komponenta u tinkturi timijana u odnosu na karvakrol (6,57  $\mu\text{g/g}$ ). Takođe, i u sirupu timijana, timol (5,7  $\mu\text{g/g}$ ) se pokazao kao dominantna komponenta, dok se karvakrol detektovao u znatno manjoj koncentraciji (0,89  $\mu\text{g/g}$ ). Na osnovu dobijenih rezultata, odnosno najzastupljenijih komponenti, zaključujemo da ispitivani uzorci pripadaju fenolnom, odnosno timol hemotipu.

### 6.2 Analgetičko delovanje i interakcije sa paracetamolom i kodeinom

Paracetamol, odnosno acetaminofen kako se još naziva, jedan je od najčešće korišćenih analgetika i antipiretika u svetu, dok je njegovo antiinflamatorno dejstvo slabo izraženo (Moore N, 2007; Walsh A, 2007). Dostupan je u slobodnoj prodaji bez lekarskog recepta, sam ili u kombinaciji sa drugim lekovima. Kao analgo-antipiretik koristi se u pedijatrijskoj populaciji, kod trudnica i kod stanja kao što su peptički ulkus, krvarenje u gastrointestinalnom traktu,

odnosno kad je primena drugih nesteroidnih antiinflamatornih lekova kontraindikovana (Fays L, 2015; Martino M, 2015). Nakon peroralne primene, paracetamol se dobro apsorbuje. Paracetamol se najvećim delom metaboliše u jetri. Glavni metaboliti su glukuronski (60%), sulfatni (30%) i cisteinski konjugati (3%). Oko 5-10% paracetamola se oksidiše izoenzimima citohroma P450 (citohromi CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2A6), pri čemu nastaje reaktivan i toksičan metabolit N-acetil-p-benzohinon imin (NAPQI). Nastali metabolit, NAPQI, inaktivira se konjugacijom sa glutationom, pri čemu nastaju netoksični konjugati sa cisteinom i merkaptopurnom kiselinom, i ne prouzrokuje se oštećenje jetre. Međutim, kod prekomernih doza paracetamola, zalihe jetrenog enzima glutationa se smanjuju i do 90%, pa se paracetamol vezuje za druge ćelijske proteine, a posebno za proteine mitohondrija. Dolazi do narušavanja funkcije mitohondrija, povećava se propustljivost membrane, a kao rezultat nastaje oštećenje membrane i nekroza ćelija, odnosno hepatocita (Bessems JG, 2001; Jaeschke H, 2002; Larson AM, 2007). Faktori koji mogu povećati toksičnost paracetamola su gladovanje, kao i uzimanje drugih sredstava (lekovi, biljni lekovi, alkohol) koja indukuju jetrene enzime (Norris W, 2008).

Kodein (3-metoksimorfin) je alkaloid iz opijuma, koji deluje kao analgetik i antitusik. Glavni metabolički put kodeina je glukuronidacija uz prisustvo enzima uridin difosfat glukuronil transferaze (UGT2B7), pri čemu nastaje neaktivni metabolit kodein-6-glukuronid (60-70%) (Coffman BL, 1997). Deo kodeina se metaboliše preko jetrenog enzima CYP2D6 O-demetilacijom u svoj aktivni metabolit morfin (5-15%), dok se jedan deo preko enzima CYP3A4 N-demetilacijom metaboliše u norkodein (10-20%). Dalje morfin podleže reakciji glukuronidacije, pri čemu nastaje aktivni metabolit morfin-6-glukuronid i neaktivan metabolit morfin-3-glukuronid, koji se izlučuju bubrezima. S obzirom da kodein ima mali afinitet za opioidne receptore, analgetičko dejstvo kodeina prvenstveno zavisi od njegovog aktivnog metabolita, morfina. Kako je za nastanak aktivnog metabolita kodeina važan izoenzim CYP2D6, genetski polimorfizam CYP2D6 predstavlja značajan faktor koji utiče na individualne varijacije analgetičkog dejstva kodeina (Kirchheiner J, 2007; Mikus G, 2005).

Test vrela ploča se koristi za procenu analgetičkog delovanja centralnim mehanizmima, jer su lizanje i otresanje zadnje šape integrisani u višim sferama mozga (Le Bars D, 2001; Jakovljević V, 2006). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da i sirup i tinktura timijana poseduju analgetičko delovanje u testu vrele ploče. Tinktura timijana pokazala je jače analgetičko dejstvo u odnosu na sirup timijana. Različiti efekti u zavisnosti od vrste preparata

timijana, mogu se objasniti i različitim sadržajem aktivnih principa u ispitivanim preparatima. Timol i karvakrol, kao glavne aktivne komponente, prisutni su u većim koncentracijama u tinkturi u odnosu na sirup timijana.

Postoje mnogobrojni literaturni podaci koji ukazuju na analgetičko dejstvo timijana. U kliničkoj studiji sprovedenoj na 84 ispitanika upoređivan je efekat primene 2% etarskog ulja timijana i ibuprofena u terapiji dismenoreje. Doza etarskog ulja timijana je bila 24 kapi, a ibuprofena 200 mg. Dobijeni rezultati su pokazali da primena etarskog ulja timijana može biti podjednako efikasna kao i primena ibuprofena u smanjenju bola i spazma izazvanog primarnom dismenorejom (Salmalian H, 2014). Takođe, slični rezultati su dobijeni u istraživanju Iravani-a i saradnika. Oni su upoređivali efekat 1% etarskog ulja timijana i 2% etarskog ulja timijana u terapiji dismenoreje, ali je primena 2% etarskog ulja timijana bila efikasnija u suzbijanju bola (Iravani M, 2009). Različita istraživanja potvrđuju i analgetičko dejstvo vodeno-alkoholnog ekstrakta timijana. Poređenjem analgetičkog dejstva vodeno-alkoholnog ekstrakta timijana i etarskog ulja timijana, utvrđeno je da etarsko ulje ima jače analgetičko dejstvo čak i u manjim dozama (Taherian AA, 2009; Mikaili P, 2010; Jaffary F, 2004).

Primena sirupa i tinkture timijana u kombinaciji sa paracetamolom i kodeinom ispoljila je različite efekte. Višekratna primena i sirupa i tinkture timijana značajno je smanjila analgetičko delovanje kodeina. S obzirom da se metabolički put kodeina odvija preko izoenzima citohroma CYP2D6 i CYP3A4, smanjeno analgetičko delovanje kodeina uz primenu preparata timijana može se objasniti dejstvom timijana na mikrozomalne izoenzime CYP2D6 i CYP3A4. U *in-vitro* ispitivanjima, Foster i saradnici su zaključili da vodeni ekstrakt timijana deluje kao induktor nekoliko citohrom P450 izoenzima: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 (Foster BC, 2003). Za razliku od kodeina, primena tinkture timijana dovela je do povećanja analgetičkog delovanja paracetamola.

Analgetičko dejstvo karvakrola, kao jednog od aktivnih principa timijana, potvrđeno je u nekoliko studija (Melo FH, 2012; Guimaraes AG, 2010). Guimaraes i saradnici su ispitivali analgetički efekat karvakrola nakon intraperitonealne primene, koristeći različite testove. Kao izvor bolne draži korišćeni su sirćetna kiselina, formalin, glutamat, kapsaicin i toplotni nadražaj. U testovima u kojima su kao izvor bolne draži upotrebljavani sirćetna kiselina, formalin, glutamat i kapsaicin, karvakrol je u svim ispitivanim dozama (25 mg/kg, 50 mg/kg,

100 mg/kg) pokazao značajno analgetičko dejstvo. Međutim, u testu vrele ploče, analgetičko delovanje je postignuto samo sa jednom dozom karvakrola, 100 mg/kg. Rezultati ove studije ukazuju da karvakrol poseduje značajnu analgetičku aktivnost, posredovanu i perifernim i centralnim mehanizmima. U prethodnim ispitivanjima utvrđeno je da su u postizanju analgetičkog efekta karvakrola u testu vrele ploče uključene supraspinalne i spinalne komponente (Le Bars D, 2001).

Za ispitivanje analgetičkog dejstva korišćen je i test sirćetne kiseline, kao efikasan model za visceralni bol (Ahmed F, 2007). Intraperitonealna primena sirćetne kiseline izaziva oslobađanje nekoliko medijatora kao što su bradikinin, supstanca P, prostaglandini i citokini kao što su interleukin-1 beta (IL-1  $\beta$ ), interleukin-8 (IL-8), faktor nekroze tumora (TNF- $\alpha$ ) (Ribeiro RA 2000; Ugwah-Oguejiofor CJ, 2013). Smatra se da analgetičko dejstvo preparata timijana u testu sirćetne kiseline može biti povezano sa inhibicijom oslobađanja ovih medijatora. Ispitivanjem dejstva karvakrola na bolni nadražaj izazvan sirćetnom kiselinom, potvrđeno je da je karvakrol smanjio broj grčeva izazvanih nakon primene sirćetne kiseline. Navodeći, da je karvakrol učestvovao u inhibiciji sinteze prostaglandina (Guimaraes AG, 2010). Takođe, u studiji Lima-e i saradnika navodi se da karvakrol ostvaruje antiinflamatorno dejstvo tako što smanjuje produkciju inflamatornih medijatora, IL-1  $\beta$  i prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Lima MS, 2013).

U našem istraživanju prilikom izvođenja testa sirćetne kiseline, i jednokratna i sedmodnevna primena sirupa i tinkture timijana, dovele su do smanjenja broja grčeva u oba ispitivana perioda, u odnosu na kontrolnu grupu. U ovom testu analgetičko delovanje tinkture timijana je bilo izraženije u poređenju sa sirupom timijana, što se može objasniti većom koncentracijom aktivnih principa timijana, timola i karvakrola, odgovornih za analgeziju i antiinflamatorno dejstvo u tinkturi u odnosu na sirup timijana. Bol koji izaziva primena sirćetne kiseline je posledica inflamatornog procesa, a analgetičko dejstvo preparata timijana, može se objasniti inhibicijom sinteze prostaglandina, jer kako smo naveli postoje literaturni podaci prema kojima se smatra da karvakrol ima ulogu u inhibiciji sinteze prostaglandina i smatra se ključnom komponentom odgovornom za postizanje antiinflamatornog i analgetičkog delovanja (Guimaraes AG, 2010).

### 6.3 Interakcije sa diazepamom i pentobarbitalom

Nakon više od pola veka od uvođenja prvog benzodiazepina, ovi lekovi i dalje spadaju u psihotropne lekove koji se najviše propisuju u kliničkoj praksi. Međutim, primena benzodiazepina povezana je i sa neželjenim dejstvima, kao što su sedacija, oštećenje motorne koordinacije (ataksija) i kognitivni efekti (anterogradna amnezija). Nakon dugotrajne primene razvija se tolerancija na efekte benzodiazepina i zavisnost, tako da su prema trenutnim smernicama preporuke da se trajanje terapije ograniči na četiri nedelje (Baldwin DS, 2013; Dell'osso B, 2013). Diazepam je benzodiazepinski anksiolitik širokog spektra delovanja. Ublažava anksioznost i napetost, deluje hipnosedativno, miorelaksanto i antikonvulzivno. Metabolizam diazepama odvija se u jetri. U prvoj fazi dolazi do odvajanja metil grupe, odnosno demetilacije posredovane citohromima CYP3A4 i CYP2C19, pri čemu nastaje metabolit nordiazepam. Manjim delom diazepam podleže hidroksilaciji posredovanoj izoenzimom CYP3A4 i nastaje temazepam. Nordiazepam i temazepam se dalje metabolišu do oksazepama, a oksazepam se konjuguje sa glukuronskom kiselinom i kao neaktivan konjugat izlučuje urinom (Chouinard G, 1999).

Nakon sedmodnevne primene, sirup timijana je potencirao efekat diazepama prilikom izvođenja Rotarod testa, i ta razlika je bila statistički značajna. Dok jednokratna primena preparata timijana, sirupa i tinkture, nije imala značajan uticaj na psihomotornu koordinaciju miševa nakon primene diazepama. U studiji Guimaraes-a i saradnika ispitivan je uticaj intraperitonealne primene karvakrola u tri različite doze (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) na psihomotornu aktivnost miševa nakon primene diazepama (3 mg/kg), uz upotrebu Rotarod testa. Međutim, karvakrol nije imao uticaj na psihomotornu aktivnost ispitivanih životinja (Guimaraes AG, 2010). Takođe, Melo i saradnici su ispitivali uticaj jednokratne primene karvakrola na psihomotornu funkciju miševa nakon primene diazepama. Karvakrol je primenjen peroralno u tri različite doze: 12,5 mg/kg, 25 mg/kg i 50 mg/kg. Diazepam, kao standardni lek, primenjen je intraperitonealno u dozi od 2 mg/kg. Rezultati ove studije pokazali su da karvakrol, u sve tri ispitivane doze, nije imao značajan efekat na psihomotornu koordinaciju životinja (Melo FH, 2010).

Pre otkrića benzodiazepina u terapiji anksioznosti su se prvenstveno koristili barbiturati, a danas su uglavnom prevaziđeni i njihova upotreba je ograničena na anesteziju i lečenje epilepsije. Barbiturati se najvećim delom metabolišu u jetri do neaktivnih metabolita, koji se u



obliku glukuronida izlučuju urinom. Glavni nedostatak barbiturata je da stvaraju visok nivo tolerancije i zavisnost, kao i da u jetri povećavaju sintezu citohroma P450 i enzima koji vrše konjugaciju i tako povećavaju metaboličku degradaciju drugih lekova i broj mogućih interakcija. Pentobarbital spada u grupu kratko delujućih benzodiazepina (Rang PH, 2005). Danas se retko koristi u farmakoterapiji, ali je značajan u eksperimentalnoj farmakologiji, gde se koristi kao hipnotik za ispitivanje uticaja ksenobiotika na indukciono vreme i vreme trajanja spavanja.

Ispitivanjem uticaja timijana na hipnotičko delovanje pentobarbitala i analizom dobijenih rezultata uočava se da su postignuti različiti efekti sedmodnevne i jednokratne primene preparata timijana. Poređenjem rezultata eksperimentalnih grupa životinja sa kontrolnom grupom, uočeno je da je nakon jednokratne primene preparata timijana, produženo indukciono vreme, a vreme trajanja spavanja skraćeno, u odnosu na kontrolnu grupu. Dok je nakon sedmodnevne primene sirupa i tinkture timijana, indukciono vreme skraćeno, a vreme trajanja spavanja produženo. Produženo vreme spavanja može biti rezultat inhibitornog efekta na enzime uključene u metabolizam pentobarbitala. U studiji Melo-a i saradnika praćen je uticaj jednokratne peroralne primene karvakrola (12,5 mg/kg, 25 mg/kg i 50 mg/kg) na centralni nervni sistem. Za postizanje hipnotičkog efekta korišćen je natrijum-pentobarbital intraperitonealno u dozi od 40 mg/kg. Sve tri primenjene doze karvakrola nisu imale efekat ni na indukciono vreme ni na vreme trajanja spavanja, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Melo FH, 2010).

#### **6.4 Farmakokinetika ispitivanja**

Biološka raspoloživost (eng. *Bioavailability*) predstavlja količinu leka koja dospeva u sistemsku cirkulaciju, i u velikoj meri zavisi od farmaceutskog oblika leka, odnosno puta primene. Nakon intravenske primene leka, biološka raspoloživost je maksimalna, odnosno iznosi 100%. Nakon peroralne primene kod ljudi, paracetamol se dobro apsorbuje, a maksimalna koncentracija u plazmi se postiže posle 30-60 minuta, a biološka raspoloživost je od 63-89%. Nakon intravenske primene maksimalna koncentracija paracetamola se postiže za 15 minuta (Oscier C, 2007).

S obzirom da se paracetamol vrlo često koristi u kombinaciji sa preparatima timijana, ispitivali smo potencijalni uticaj preparata timijana na farmakokinetiku paracetamola, nakon peroralne i nakon intravenske primene.

Sve grupe životinja su primile paracetamol intravenski u istoj dozi, ali početne koncentracije paracetamola bile su u svim ispitivanim grupama različite. Najveću početnu koncentraciju paracetamola imala je kontrolna grupa. Upotreba preparata timijana, sirupa i tinkture, smanjila je početnu koncentraciju paracetamola kod ispitivanih životinja nakon i.v. primene. Nakon primene tinkture timijana početna koncentracija je smanjena za 35%, a nakon primene sirupa timijana za 45% u odnosu na kontrolnu grupu. Poluvreme eliminacije paracetamola je bilo manje, a konstanta brzine eliminacije veća kod životinja koje su pretretirane sirupom i tinkturom timijana, što ukazuje na kraće zadržavanje paracetamola u krvi kod ovih životinja. Da se paracetamol brže eliminiše iz organizma kod eksperimentalnih životinja, ukazuje i veći klirens i manji volumen distribucije kod grupa koje su bile pretretirane sirupom i tinkturom timijana.

Nakon peroralne primene paracetamola, grupe životinja koje su bile pretretirane tinkturom i sirupom timijana imale su veće vrednosti ukupne površine ispod krive, odnosno veće količine leka u cirkulaciji, u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, i maksimalne koncentracije paracetamola u serumu su bile veće kod eksperimentalnih grupa, odnosno nakon primene tinkture i sirupa timijana. Nakona primene tinkture timijana  $C_{max}$  je bila za 40% veća, odnosno nakon primene sirupa timijana za 26% veća, u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeni rezultati ukazuju da povećanje koncentracije paracetamola u grupama koje su pretretirane preparatima timijana može biti posledica interakcije na nivou enzima koji učestvuju u biotransformaciji paracetamola. Citohrom CYP3A4 je jedan od enzima koji učestvuje u metabolizmu paracetamola, a postoje studije koje ukazuju da timijan ima uticaj na ovaj enzim (Kluth D, 2006). Takođe je utvrđeno da karvakrol ima inhibitorno dejstvo na UGT1A9, izoformu enzima UDP-glukuronil transferaze, koja je uključena u proces glukuronidacije paracetamola (Dong RH, 2012). Da biljni preparati mogu uticati na farmakokinetiku paracetamola, potvrđeno je i u nekim drugim istraživanjima. Ispitivanjem uticaja etanolnog ekstrakta biljke *Vitex Negundo* na interkacije sa paracetamolom utvrđeno je da je smanjena apsorpcija paracetamola kao i intenzitet terapijskog dejstva, jer su smanjene AUC vrednosti kao i maksimalna koncentracija paracetamola (Tripathi YB, 2009). U grupama koje su pretretirane tinkturom i sirupom timijana, poluvreme eliminacije i volumen distribucije su bili manji, a konstanta eliminacije veća, u odnosu na kontrolnu grupu. Ove vrednosti ukazuju na brži gubitak leka iz organizma nakon pretremana preparatima timijana.

Površina ispod krive koncentracije paracetamola u serumu ispitivanih životinja je bila veća nakon intravenske primene, u odnosu na peroralnu primenu paracetamola. Biološka raspoloživost paracetamola kod grupa životinja pretretiranih preparatima timijana, sirupom i tinkturom, bila je veća u odnosu na kontrolnu grupu. Povećanje biološke raspoloživosti paracetamola nakon primene preparata timijana može biti posledica uticaja aktivnih principa timijana na mikrozomalne enzime uključene u metabolizam paracetamola. Postoje literaturni podaci koji ukazuju da aktivni principi timijana imaju dejstvo na enzime CYP3A4 i UGT1A9 (Kluth D, 2006; Dong RH, 2012).

## 6.5 Uticaj na biohemijske parametre

Jetra je, posle kože, najveći organ ljudskog organizma. U jetri se odvija veliki broj funkcija koje su značajne za homeostazu organizma. Ona ima ulogu u metabolizmu, varenju, detoksikaciji i eliminaciji supstanci iz organizma. Uključena je u metabolizam ugljenih hidrata, proteina i lipida. Na prisustvo potencijalno štetnih supstanci (ksenobiotici), jetra reaguje mehanizmima urođene imunosti i inflamatornim reakcijama. Danas postoji veliki broj *in vitro* i *in vivo* modela eksperimentalnog oštećenja jetre u cilju ispitivanja potencijalnog hepatoprotektivnog dejstva lekova (Ramadori G, 2005).

Najčešće određivani enzimi za procenu funkcije jetre su ALT i AST. Ova dva enzima se nalaze u visokoj koncentraciji u hepatocitima, pa je iz tog razloga njihova serumska koncentracija najbolji pokazatelj oštećenja jetre. Enzim ALT je najviše zastupljen u jetrenim ćelijama, odnosno u ćelijskoj citoplazmi, tako da je on vrlo specifičan pokazatelj oštećenja jetre. AST je manje specifičan pokazatelj oštećenja funkcije jetre, jer je on zastupljeniji u srcu, pankreasu, skeletnim mišićima, mozgu, bubrezima, plućima, leukocitima i eritrocitima (Giannini EG, 2005; Kim WR, 2008).

Jedna od najčešće korišćenih supstanci za izazivanje oštećenja jetre kod eksperimentalnih životinja je ugljen-tetrahlorid. Uticaj preparata timijana na jetru oštećenu ugljen-tetrahloridom ispitivan je praćenjem vrednosti enzima AST i ALT, a u cilju bolje procene toksikoloških karakteristika timijana rađena je i histološka analiza isečaka jetre. U rezultatima naše studije, hepatotoksičnost izazavana ugljen-tetrahloridom primećena je na osnovu porasta nivoa enzima jetre, ALT i AST, kao i na osnovu vidljivih histopatoloških promena. Visoke vrednosti enzima

ALT i AST u serumu nakon primene ugljen-tetrahlorida ukazuju na gubitak strukturnog i funkcionalnog integriteta jetre, kao i na oslobađanje ovih citoplazmatskih enzima u sistemsku cirkulaciju. Takođe, u našim rezultatima je primećen i porast bilirubina u serumu, što ukazuje na moguću narušenu ekskretornu funkciju jetre. Ovo je u skladu sa rezultatima mnogih ranijih studija, u kojima je kao model korišćena jetra oštećena ugljen-tetrahloridom.

Upotreba samo preparata timijana nije dovela do značajnih biohemijskih i histoloških promena jetrene funkcije, u poređenju sa grupama tretiranim samo fiziološkim rastvorom. S druge strane, upotreba tinkture timijana u kombinaciji sa ugljen-tetrahloridom dovela je do neočekivanog porasta vrednosti ALT i AST enzima u serumu, dok je sirup timijana u kombinaciji sa ugljen-tetrahloridom smanjio aktivnost aminotransferaza u poređenju sa grupom tretiranom ugljen-tetrahloridom.

Različiti rezultati dejstva tinkture i sirupa timijana na jetri ukazuju da je doza tinkture previsoka, s obzirom da je poznato da biljni polifenoli u visokim koncentracijama i pod određenim uslovima kao što je prisustvo peroksidaza, mogu da postanu prooksidanti i da izazovu citotoksičnost i oštećenje jetre usled nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Galati G, 2004). Timol i karvakrol, kao glavni monoterpeni timijana, u principu ne pokazuju dozno-zavisne efekte i zato je potrebno pronaći odgovarajući opseg doza, u kojima će biti postignut najviši efekat (Guimaraes AG, 2013).

U prethodnim studijama je pokazano da peroralna primena koncentrovanog etanolnog ekstrakta timijana u testovima subakutne toksičnosti dovodi do povećanja mase jetre kod miševa (Barnes J, 2007). Pored toga, u studiji koju su sprovedi Liu i saradnici tokom 2011. godine (Liu Y, 2011), ispitavno je 16 fenolnih i 5 botaničkih ekstrakata, uključujući metanolni ekstrakt timijana. Kao model korišćeni su humani hepatociti, kao i hepatociti pacova, a ispitivane su različite biološke aktivnosti vezane za hepatotoksičnost. Klaster analiza korišćena je za grupisanje fenola. Ekstrakt timijana grupisan je u hepatotoksičnu grupu u hepatocitima MH1C1 pacova, ali ne i u humanim HepG2/C3A ćelijama. Pored toga, hepatoprotektivni efekat timijana ispitivan je na eksperimentalnim modelima jetre, kod kojih su oštećenja jetre izazvana paracetamolom (Grespan R, 2014), N-nitrozo-dietilaminom (NDEA) (Rana P, 2008) i aflatoksinima (Abdel-Aziem SH, 2014). U istraživanju u kojem je ispitivana suplementacija ekstraktom timijana tokom osam nedelja, pokazana je njegova sposobnost da ublaži akutnu hepatotoksičnost izazvanu ugljen-tetrahloridom (Al-Badr NA, 2011). Rezultati naše studije

razlikuju se od ovih rezultata, što se može objasniti različitim primenjenim dozama i različitim vremenskim periodom primene preparata timijana. Hepatotprotektivna aktivnost je dokazana za mnoge aktivne sastojke timijana. Kod miševa, timol je poboljšao oštećenje jetre izazavano primenom ugljen-tetrahlorida, i smatra se da je timol delimično sprečio lipidnu peroksidaciju i poboljšao aktivnost antioksidantnih enzima (Al-Malki AL, 2010). Takođe, i karvakrol je pokazao antioksidantno delovanje i hepatoprotektivni efekat na modelu hepatotoksičnosti kod pacova, izazvanoj D-galaktozaminom (Aristatile B, 2009).

Antidijabetesni efekat timijana primećen je na modelima pacova, kod kojih su za indukciju dijabetesa korišćeni streptozocin (Ozkol H, 2013) i aloksan (Hanna ET, 2014), što ukazuje na mogućnost njegove primene kod metaboličkog sindroma. Takođe, primena timijana dovela je do smanjenja koncentracije holesterola i triglicerida u serumu, ali u našoj studiji nije postignut taj efekat. Primena tinkture timijana tokom sedam dana dovela je do smanjenja triglicerida u serumu, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

Urea (karbamid) je krajnji proizvod metabolizma aminokiselina, odnosno proteina. Produkcija uree predstavlja jednu od najznačajnijih detoksikacionih funkcija jetre, pomoću koje se amonijak pretvara u relativno netoksično jedinjenje, ureu. Urea se najvećim delom izlučuje putem bubrega. Kreatinin se sintetiše u bubrezima, jetri i pankreasu, a iz organizma se odstranjuje putem bubrega, mehanizmom glomerularne filtracije. Kod osoba sa zdravim bubrezima i normalnim katabolizmom mišićnih belančevina nivo kreatinina u krvi je vrlo stabilan. Koncentracija kreatinina je mera efikasnosti glomerularne filtracije (Gowda S, 2010).

Osim ispitivanja uticaja preparata timijana na funkciju jetre, ispitivan je i uticaj preparata timijana na bubrežnu funkciju. U cilju praćenja bubrežne funkcije određivane su koncentracije uree i kreatinina u serumu. Ugljen-tetrahlorid je blago smanjio nivo uree i kreatinina u serumu pacova.

U prethodnim studijama (Rašković A, 2014; Popović M, 2008), ugljen-tetrahlorid je primenjen u većim dozama (1 ml/kg) i izazvao je izraženije nefrotoksične efekte, što je bilo praćeno značajnim povećanjem koncentracije uree i kreatinina u serumu. Parametri bubrežne funkcije nisu se značajno promenili nakon istovremene primene ugljen-tetrahlorida i tinkture timijana, što je u skladu sa rezultatima studije koju su sprovedi Ozkol i saradnici 2013 (Ozkol H, 2013). S druge strane, značajna nefroprotektivna aktivnost timijana je zabeležana kod pacova tretiranih aflatoksinom (Hamzawy MA, 2012).

## 6.6 Antioksidanta aktivnost

Antioksidansi sprečavaju oštećenje ćelija i tkiva, jer se ponašaju kao hvatači slobodnih radikala. U cilju neutralizacije slobodnih radikala i zaštite organizma od različitih bolesti, telo proizvodi endogene antioksidanse, odnosno enzimske i neenzimske komponente. Enzimske komponente koje učestvuju u antioksidativnoj zaštiti su katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD), glutacion peroksidaza (GPx) i glutacion reduktaza (GR), a neenzimske komponente su vitamin E, vitamin C, redukovani glutacion (GSH) (Jacob RA, 1995). Slobodni radikali su molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što ih čini vrlo reaktivnim i nestabilnim. Nespareni elektroni se mogu nalaziti na atomima različitih elemenata, tako da se slobodni radikali dele na reaktivne vrste kiseonika (*Reactive Oxygen Species*, ROS), reaktivne vrste azota (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), reaktivne vrste broma (*Reactive Bromine Species*, RBS) i reaktivne vrste sumpora (*Reactive Sulphur Species*, RSS). Reaktivne kiseonične vrste predstavljaju najznačajniju grupu slobodnih radikala u biološkim sistemima (Halliwell B, 2007). Poremećaj ravnoteže između nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta i aktivnosti antioksidativne zaštite uzrokuje oksidativni stres. Oksidativni stres može izazvati oštećenje konstituenata ćelije kao što su lipidne membrane, proteini i nukleinske kiseline (DNK i RNK) i na taj način dovesti do inhibicije njihove funkcije. Zbog toga se smatra da je oksidativni stres odgovoran za patogenezu mnogih bolesti i savremena medicina mu poklanja sve više pažnje (Marnet LJ, 2000; Valko M, 2007).

Poslednjih godina raste interesovanje za upotrebu prirodnih antioksidanasa biljnog porekla, zbog njihove osobine da štite organizam od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom. Novija istraživanja su pokazala da mnoge aromatične biljke koje sadrže veliku količinu fenolnih jedinjenja predstavljaju dobar izvor prirodnih antioksidanasa (Erkan N, 2008; Sarahroodi S, 2012).

Antioksidantna aktivnost timijana i njegovih eksrakata uglavnom zavisi od sadržaja etarskog ulja. Dokazano je da fenolni hemotipovi timijana imaju jače antioksidativno dejstvo u poređenju sa nefenolnim tipovima, a timol i karvakrol se smatraju najznačajnijim komponentama koje doprinose antioksidantom delovanju. Oksidacioni proizvodi timola, timokinon i timohidrokinon, poseduju još snažnije antioksidantno dejstvo nego sam timol (Chizzola R, 2008; Kulišić T, 2005).

U mnogim *in vitro* studijama potvrđeno je antioksidantno dejstvo ekstrakata timijana. Jedan od najčešće korišćenih testova za procenu antioksidativne aktivnosti u *in vitro* uslovima je DPPH test. DPPH test pruža podatke o reaktivnosti jedinjenja sa stabilnim slobodnim DPPH radikalom. Na ovaj način se može oceniti sposobnost ispitivanih supstanci, da inhibiraju produkciju reaktivnih kiseoničnih radikala. Pored DPPH testa, ponekad se kao *in vitro* test za procenu antioksidantne aktivnosti koristi i ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska) kiselina) test. Mehanizam ABTS testa sličan je DPPH test, osim što se kao radikal koristi plavo-zelena obojeni ABTS radikal. U *in vitro* studiji koju su sproveli Kaledaite i saradnici, ekstrakti timijana su pokazali antioksidativnu aktivnost, odnosno sposobnost inhibicije DPPH i ABTS radikala, kao i veći sadržaj ukupnih fenola u poređenju sa žalfijom i koprivom (Kaledaite R, 2011). Takođe ekstrakti timijana, žalfije i majorana pripremljeni pomoću metanola, etanola, dietiletra i heksana, ispitivani su pomoću DPPH testa, i metanolni ekstrakt timijana je imao najnižu IC<sub>50</sub> vrednost, odnosno najjači antioksidacioni potencijal (Roby MHH, 2013). Antioksidantna svojstva tinktura 11 biljaka koje se koriste kao začini, uključujući i timijan, ispitivna su DPPH testom tokom dve godine, i timijan je pokazao stabilnu antioksidativnu aktivnost sa malim varijacijama u sposobnosti hvatanja radikala („skevindžer aktivnost“) posle jedne godine (Szabo MR, 2010).

U različitim studijama sadržaj fenola u etanolnim ekstraktima timijana, računat kao mg GAE po gramu suve mase uzorka, kretao se od 3,36 mg GAE/g sm (Vallverdu-Queralt A, 2014) do 7,30 mg GAE/g sm (Roby MHH, 2013). U našim ispitivanjima, određen je visok sadržaj ukupnih fenola 4859,77 mg GAE/l, a to je u skladu sa rezultatima studije koju su sproveli Kulišić i saradnici (Kulišić T, 2006), gde je ukupni sadržaj fenola u vodenim ekstraktima iznosio 2.000 mg GAE/l kod timijana, odnosno 4.400 mg GAE/l kod majčine dušice. Različiti rezultati dobijeni u ovim studijama mogu se objasniti različitim geografskim lokacijama, delovima biljaka koji se koriste za dobijanje ekstrakta, načinima i uslovima ekstrakcije, kao što su rastvarač, temperatura i vreme (Kozics K, 2013).

Uzimajući u obzir ulogu oksidativnog stresa u etiopatogenezi oštećenja jetre izazvanog mnogim ksenobioticima, ispitivali smo uticaj farmaceutskih preparata koji sadrže timijan na lipidnu peroksidaciju i endogeni antioksidativni sistem odbrane u jetri. Kao model koristili smo akutno oštećenu jetru ugljen-tetrahloridom. Ugljen-tetrahlorid je hepatotoksičan agens koji se metaboliše u jetri. Pod dejstvom citohroma P450, ugljen-tetrahlorid se metaboliše u trihlormetil

radikal ( $\text{CCl}_3\cdot$ ), a nakon toga u trihlormetilperoksi radikal ( $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ ). Nastali metaboliti su vrlo reaktivni i sposobni su da se kovalentno vežu za ćelijske makromolekule, a posebno za masne kiseline iz membranskih fosfolipida. Napadom na polinezasićene kiseline u ćelijskoj membrani, slobodni radikali iniciraju proces lipidne peroksidacije i posledičnu lančanu reakciju (Manibusan MK, 2007). U našim ispitivanjima intenzitet lipidne peroksidacije određivan je indirektno preko koncentracije malondialdehida (MDA). Primena ugljen-tetrahlorida je značajno povećala nivo MDA, glavnog sekundarnog produkta lipidne peroksidacije i indikatora stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. Istovremena primena timijana i ugljen-tetrahlorida uspeła je da spreči povećanje MDA indukovano ugljen-tetrahloridom, ukazujući na njegovu sposobnost da očuva ćelijski integritet. Slično našim rezultatima, i u nekim drugim studijama suplementacija ekstraktom timijana i etarskim uljem timijana tokom osam nedelja rezultirala je inhibicijom lipidne peroksidacije izazvane ugljen-tetrahloridom u jetri pacova (Al-Badr NA, 2011). Takođe, ugljen-tetrahlorid je povećao aktivnost prooksidativnog enzima ksantin oksidaze (XOD). Enzim ksantin oksidaza katalizuje pretvaranje hipoksantina u ksantin, odnosno ksantina u mokraćnu kiselinu, uz stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika, superoksid anjon radikala i vodonik peroksida. Primena timijana je značajano smanjila koncentraciju enzima XOD, nakon upotrebe ugljen-tetrahlorida.

Antioksidativna aktivnost mnogih enzima je značajno promenjena nakon primene ugljen-tetrahlorida. Upotreba ugljen-tetrahlorida je imala za posledicu smanjenje aktivnosti katalaze, peroksidaze i glutathion reduktaze. Ovo se može objasniti inaktivacijom ovih enzima, usled pojačane produkcije slobodnih radikala. S druge strane, vrednost enzima glutathion peroksidaze je povećana nakon primene ugljen-tetrahlorida. Slični rezultati su dobijeni i u prethodnim studijama (Rašković A, 2014) i u studiji Hsiao i saradnika 2003 (Hsiao G, 2003), gde je nakon primene ugljen-tetrahlorida došlo do povećanja aktivnosti glutathion peroksidaze i smanjenja aktivnosti katalaze. Dobro je poznato da katalaza ima važnu ulogu u eliminaciji reaktivnih vrsta kiseonika, koji potiču od redoks procesa ksenobiotika u jetri, i da se lako inaktiviše lipidnom peroksidacijom. S druge strane, u uslovima oksidativnog stresa, aktivnost enzima glutathion peroksidaze može se lako povećati kao adaptivni odgovor hepatocita na oksidativna oštećenja (Halliwell B, 1984). U nekoliko različitih studija (Abdel-Aziem SH, 2014; Al-Badr NA, 2011), svi antioksidanti enzimi su smanjeni nakon primene ugljen-tetrahlorida, ali ove razlike se mogu pripisati različitim protokolima eksperimenata.



Pored *in vitro* eksperimentalnih modela oštećenja jetre, antioksidativna aktivnost timijana potvrđena je i u nekoliko *in vivo* modela. Etarsko ulje i vodeni ekstrakti dobijeni iz timijana pokazali su zaštitnu ulogu u LDL (*Low Density Lipoprotein* – lipoproteini niske gustine) oksidaciji izazvanoj bakrom (Kulišić T, 2007). Pored toga, vodeni ekstrakt timijana je inhibisao aktivnost glukoza-6-dehidrogenaze u eritrocitima i posledičnu hemolizu izazvanu nitrozativnim stresom (Al-Awaida W, 2014). U nekoliko studija je ispitan uticaj timijana na antioksidativni status, kao i na aktivnost antioksidativnih enzima. Takođe je pokazano da pacovi koji su tokom svog životnog veka primali ulje timijana kao dijetetski suplement, zadržali su veći antioksidativni kapacitet i sprečeno je smanjenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze u jetri i srcu starih pacova (Youdim KA, 1999). Takođe, i peroralna primena etanolnog ekstrakta timijana je kod zdravih pacova poboljšala antioksidativni status, i postignuta je zaštita od oksidativnog stresa prvenstveno zbog antioksidantnog delovanja glavnih aktivnih komponenata timijana, ali može biti povezana i sa fenolnim metabolitima, kao što je timol-sulfat (Rubio L, 2014).

Rezultati ove studije su pokazali da timijan svoju antioksidantnu aktivnost postiže i kao hvatač slobodnih radikala (eng. *Free Radical Scavenging*) i kroz aktivaciju fizioloških odbrambenih mehanizama. Uprkos pokazanoj antioksidativnoj aktivnosti, preparati timijana neočekivano nisu uspjeli da poboljšaju oštećenja jetre kod pacova. Uloga oksidativnog stresa u oštećenjima jetre je vrlo značajna, ali treba napomenuti da je pokazano i da su neki drugi patofiziološki mehanizmi uključeni u hepatotoksičnost izazvanu lekovima, uključujući inflamatorne procese. Iako, je antiinflamatorni efekat timijana pokazan u *in vivo* studijama, izolovani aktivni principi timol i karvakrol su pokazali antagonistički efekat. Pretpostavlja se da timol poseduje iritirajući efekat koji verovatno uključuje histamin, prostanoide i druge antiinflamatorne medijatore, nasuprot karvakrolu koji ima dobro utvrđenu antiinflamatornu aktivnost (Fachini-Queiroz FC, 2012). S obzirom da je utvrđeno da je timol glavna aktivna komponenta u našim ispitivanim preparatima timijana, uloga inflamatornih procesa može objasniti naše rezultate, iako su potrebna detaljnija istraživanja mehanizama uključenih u ovaj proces.

## 6.7 Ispitivanje stabilnosti sirupa timijana

Stabilnost lekova predstavlja sposobnost određene formulacije da zadrži prihvatljive fizičke, hemijske i mikrobiološke karakteristike, tokom celog perioda čuvanja i upotrebe. Stabilnost ukazuje na otpornost prema različitim hemijskim, fizičkim i mikrobiološkim reakcijama koje bi mogle da promene početne osobine leka i to za vreme transporta, čuvanja i upotrebe. Važan kriterijum za stabilnost je procena tih efekata na pogodnost upotrebe lekovitog preparata u terapiji (Jovanović M, 2005).

U osnovi razlikuju se dve grupe faktora koji utiču na stabilnost lekova: spoljašnji i unutrašnji faktori. U unutrašnje faktore spadaju elementi koji se definišu u ranim fazama razvoja leka: osobine i kvalitet lekovite supstance, farmaceutski oblik, formulacija proizvoda, odnosno osobine pomoćnih supstanci i kontaktne ambalaže. Dok se pod spoljašnjim faktorima podrazumeva uticaj: temperature, vlage, svetlosti, kiseonika, mikroorganizama, toka skladištenja, transporta i upotrebe leka. Svi navedeni faktori, u funkciji vremena, različitom brzinom i intenzitetom utiču na promene lekova, zavisno od osobine aktivne supstance (Solomon LJ, 2011).

Rezultati naših ispitivanja stabilnosti sirupa timijana su pokazali da unutar različitih serija sirupa čuvanih pod istim uslovima ne postoje značajne razlike u pogledu stabilnosti, što samo potvrđuje da su sve serije sirupa pripremljene na isti način i da nije bilo odstupanja prilikom pripreme sirupa.

Poređenjem sirupa pripremljenih na isti način, ali čuvanih pod različitim uslovima, ustanovljeno je da postoje razlike u stabilnosti. Najmanju stabilnost, odnosno najveće odstupanje u koncentracijama aktivnih komponenti timola i karavkrola, pokazali su sirupi čuvani na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu. Pri ovim uslovima čuvanja koncentracija karvakrola i timola je bila statistički značajno niža desetog dana, u odnosu na prvi dan ispitivanja. Sirupi koji su čuvani pod sličnim uslovima, ista temperatura i sekundarna ambalaža, ali na tamnom mestu, pokazali su znatno bolju stabilnost. Prisustvo svetlosti može biti uzrok degradacije preparata.

## 7 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da:

1. Primena preparata timijana, sirupa i tinkture, ispoljava značajno analgetičko dejstvo i smanjuje visceralnu bol kod eksperimentalnih životinja. Analgetičko delovanje preparata timijana je komparabilno analgetičkom efektu paracetamola.
2. Sirup i tinktura timijana stupaju u značajne interakcije sa lekovima koji deluju na centralni nervni sistem eksperimentalnih životinja.
3. Pretretman sirupom i tinkturom timijana značajno utiče na analgetičko delovanje kodeina i paracetamola. Pri tome, pretretman preparatima timijana dovodi do značajnog smanjenja analgetičkog delovanja kodeina, dok pretretman tinkturom timijana značajno pojačava analgetički efekat paracetamola.
4. Sirup timijana značajno potencira diazepamom izazvan poremećaj motorne koordinacije laboratorijskih miševa.
5. I sirup i tinktura timijana potenciraju hipnotičko delovanje pentobarbitala, pri čemu je pretretman sirupom ispoljio jači efekat u odnosu na tinkturu timijana.
6. Pretretman sirupom i tinkturom timijana značajno povećava biološku raspoloživost paracetamola. Povećanje biološke raspoloživosti paracetamola je najizraženije nakon pretretmana tinkturom timijana.
7. Uticaj timijana na pokazatelje funkcije jetre zavisi od farmaceutske formulacije u kojoj se preparati timijana primenjuju. Pretretman sirupom timijana je sprečio ugljen-tetrahloridom izazvano povećanje aktivnosti jetrenih transaminaza, za razliku od tinkture, koja je izazvane poremećaje potencirala.
8. Primena sirupa i tinkture timijana štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta, odnosno umanjuje posledice izloženosti oksidativnom stresu.
9. Ambalaža i uslovi čuvanja značajno utiču na stabilnost sirupa timijana. Najmanju stabilnost imaju preparati sirupa čuvani na temperaturi od 20°C, u sekundarnoj ambalaži i na svetlom mestu.

## 8 LITERATURA

1. Abdel-Aziem SH, Hassan AM, El-Denshary ES, Hamzawy MA, Mannaa FA, Abdel-Wahhab MA. Ameliorative effects of thyme and calendula extracts alone or in combination against aflatoxins-induced oxidative stress and genotoxicity in rat liver. *Cytotechnology*. 2014;66:457-70.
2. Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh EA, Kyslychenko VS, Karpiuk UV. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan. *Pak J Pharm Sci*. 2012 Jan;25(1):239-46.
3. Abu-Ghazaleh BM. Inhibition of growth and caseinase production of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* 28 by combination of low pH and NaCl, potassium sorbate or *Thymus vulgaris* extract. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2010 Jun;57(2):95-108.
4. Adzet T, Granger R, Passet J, San Martin R. Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: ca signification taxonomique. *Biochem Syst Ecol*. 1977;5:269-72.
5. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*. 1994;32:31-6.
6. Ahmed F, Shahid IZ, Biswas UK, Roy BA, Das AK, Choudhuri MSK. Antiinflammatory, antinociceptive and neuropharmacological activities of *Clerodendron viscosum*. *Pharm Biol*. 2007;45:587-93.
7. Al-Awaida W, Akash M. Protective role of aqueous medicinal herbal extracts against oxidative stress on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and RBC fragility. *Life Sci J*. 2014;11:385-91.
8. Al-Badr NA. Effect of thyme powder, extract and oil on carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Am Sci*. 2011;7:221-7.
9. Al-Malki AL. Antioxidant properties of thymol and butylated hydroxytoluene in carbon tetrachloride-induced mice liver injury. *JKAU Sci*. 2010;22:239-48.
10. Anand P, Singh B. Flavonoids as lead compounds modulating the enzyme targets in Alzheimer's disease. *Med Chem Res*. 2013;22:3061-75.

11. Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009 Dec;23(6):757-65.
12. Azirak S, Rencuzogullari E. The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environ Toxicol*. 2008 Dec;23(6):728-35.
13. Babaei M, Abarghoei ME, Ansari R, Vafaei AA, Taherian AA, Akhavan MM, et al. Antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris* on the guinea-pig ileum. *Nat Prod Res*. 2008;22(13):1143-50.
14. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem. Toxicol*. 2008;46:446-75.
15. Baldwin DS, Aitchison K, Bateson A, Curran HV, Davies S, Leonard B, et al. Benzodiazepines: risks and benefits. A reconsideration. *J Psychopharmacol*. 2013;27:967-71.
16. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal Medicines*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2007.
17. Baser KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharmaceut Design*. 2008;14:3106-19.
18. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*. 1950;195:133-40.
19. Bergmayer UH. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim, Germany: Verlag Chemie; 1970.
20. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol*. 2001;31(1):55-138.
21. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak, V. Anticancer activity of essential oils: A review. *J Sci Food Agric*. 2013;93(15):3643-53.
22. Bhandari SS, Kabra MP. To evaluate anti-anxiety activity of thymol. *J Acc Dis*. 2014;3(2):136-40.
23. Boonyarikpunchai W, Sukrong S, Towiwat P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;124:67-73.

24. Boskabady MH, Aslani MR, Kiani S. Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytother Res.* 2006;20:28-33.
25. Botelho MA, Martins J, Ruela G, Rachid RSI, Santos JA, Soares JB, et al. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phyto.Ther.Res.* 2009;23:1439-48.
26. Braga PC, Saso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni M, Marabini L. Antiinflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacol.* 2006;77:130-36.
27. Braga PC, Sasso MD, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoter.* 2007 Sep;78(6):396-400.
28. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Techn.* 1995;28:25-30.
29. Braüchler C, Meimberg H, Heubl G. Molecular phylogeny of *Menthinae* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) - Taxonomy, biogeography and conflicts. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;55:501-23.
30. Broucke CO, Lemli JA. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm Weekbl Sci.* 1983 Feb 25;5(1):9-14.
31. Buege AJ, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1978.
32. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:179-89.
33. Čančarević A, Bugraski B, Šavikin K, Zdunić G. Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Lek sirov.* 2013;33:3-17.
34. Carlen C, Schaller M, Carron CA, Vouillamoz JF, Baroffio CA. The new *Thymus vulgaris* L. hybrid cultivar (Varico 3) compared to five established cultivars from Germany, France and Switzerland. *Acta Hort.* 2010;860:161-66.
35. Centeno S, Calvo MA, Adelantado C, Figueroa S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pak J Biol Sci.* 2010 May 1;13(9):452-5.

36. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(3):217-26.
37. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of Rat Lung Soluble Glutathione Peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1976;445:558-660.
38. Chizzola R, Michitsch B, Franz C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J Agric Food Chem.* 2008;56:6897-904.
39. Chouinard G, Lefko-Singh K, Teboul E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19(4):533-52.
40. Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 1997;25:1-4.
41. Cronquist A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants.* New York: The New York Botanical Garden; 1988.
42. Czygan FC, Hiller K. *Thymi herba.* In: Wichtl M, editor: *Herbal drugs and Phytopharmaceuticals.* Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 2004.
43. Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules.* 2010;15:7313-52.
44. Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact.* 2011;193(1):97-106.
45. Dell'osso B, Lader M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. *Eur Psychiatry.* 2013;28:7-20.
46. Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Ge GB, Cao YF, Li XB, et al. Identification of CYP isoforms involved in the metabolism of thymol and carvacrol in human liver microsomes (HLMs). *Pharmazie.* 2012 Dec;67(12):1002-6.
47. Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Liang SC, Ge GB, Yang L, et al. Investigation of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) inhibitory properties of carvacrol. *Phytother Res.* 2012 Jan;26(1):86-90.

48. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88:308-16.
49. El-Kader, MAA, Mohamed, NZ. Evaluation of protective and antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on paracetamol-induced toxicity in rats. *Austr J Basic and App Sci.* 2012;6(7):467-74.
50. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 2008;110(1):76-82.
51. Esmaeili D, Mobarez AM, Tohidpour A. Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of thymus vulgaris and eucalyptus globulus. *Open Microbiol J.* 2012;6:65-9.
52. European Medicines Agency (EMA). Assessment report on *Thymus vulgaris* L., *vulgaris zygis* L., herba. London: Doc. Ref. EMA/HMPC/131903/2009.
53. European Medicines Agency (EMA). Assessment report on *Thymus vulgaris* L., *vulgaris zygis* L., aetheroleum. London: Doc. Ref. EMA/HMPC/342334/2013.
54. European Pharmacopoeia. 7<sup>th</sup> ed. Council of Europe. Strasbourg. 2011.
55. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevao-Silva CF, Carvalho MD, Cunha JM, Grespan R, et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:657026.
56. Fays L, Van Malderen K, De Smet K, Sawchik J, Verlinden V, Hamdani J, et al. Use of paracetamol during pregnancy and child neurological development. *Dev Med Child Neurol.* 2015 Aug;57(8):718-24.
57. Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, et al. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrated by natural products. *Phytomedicine.* 2003;10:334-42.
58. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000;48:3597-604.
59. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol.* 2011 Sep;11(9):1150-9.



60. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:287-303.
61. Gehan IK, Rasoul A, Abdelgaleil S. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pest Biochem Physiol.* 2012;103:56-61.
62. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. 2005 Feb 1;172(3):367-79.
63. Gildemeister E, Hoffmann F. *Die ätherischen Öle.* Berlin: Akademie-Verlag; 1961.
64. Glatzle D, Vuillenmir K. Glutathione Reductase Test with Whole Blood a Convenient Procedure for the Assessment of the Riboflavine Status in Human. *Experimentia.* 1974;30:565-638.
65. Gorunović M, Lukić P. *Farmakognozija.* Beograd: Zavod za grafičku tehniku TMF-a; 2001.
66. Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AK, Vernekar SN. Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci.* 2010 Apr;2(4):170-3.
67. Grespan R, Aguiar RP, Giubilei FN, Fuso RR, Damiao MJ, Silva EL, et al. Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:954136.
68. Guimaraes AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010 Dec;107(6):949-57.
69. Guimaraes AG, Quintans JS, Quintans Jr LJ. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytother Res.* 2013;27:1-15.
70. Guimaraes AG, Xavier MA, Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2012;385(3):253–63.
71. Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicol.* 2006;217:213-20.
72. Guo X, Shen L, Tong Y, Zhang J, Wu G, He Q, et al. Antitumor activity of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester and its pharmacokinetic and metabolic properties. *Phytomedicine.* 2013 Jul 15;20(10):904-12.

73. Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 2002;82:83-7.
74. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219:1-14.
75. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* 4<sup>th</sup> edition. New York: Oxford University Press Inc; 2007.
76. Halliwell B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:1341-8.
77. Hamzawy MA, El-Denshary ES, Hassan NS, Mannaa FA, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant and Hepatorenoprotective Effect of *Thyme vulgaris* Extract in Rats during Aflatoxicosis. *Global J Pharmacol.* 2012;6:106-17.
78. Hanna ET, Aniess WI, Khalil AF, Abdalla ES, Hassanin EA, Nagib EW. The effect of ginger and thyme on some biochemical parameters in diabetic rats. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2014;9:54-61.
79. Harborne JB, Baxter H. *Handbook of natural flavonoids.* Chichester: Wiley & Sons; 1999.
80. Haroun EM, Mahmoud OM, Adam SE. Effect of feeding *Cuminum cyminum* fruits, *Thymus vulgaris* leaves or their mixture to rats. *Vet Hum Toxicol.* 2002;44:67-9.
81. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13:572-84.
82. Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res.* 2010 Jan;51(1):132-9.
83. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Androea camphorata* extract. *J Agric Food Chem.* 2003;51:3302-8.
84. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother.* 2001 May;47(5):565-73.
85. Iravani M. Clinical effects of *Zataria multiflora* essential oil on primary dysmenorrhea. *J Med Plants.* 2009;8:54-60.
86. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res.* 1995;15:755-66.

87. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002;65:166-76.
88. Jaffary F, Ghannadi A, Siahpoush A. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Zataria multiflora*. *Fitoterapia.* 2004;75:217-20.
89. Jakovljević V. Eksperimentalna farmakologija u naučno-istraživačkom radu. Novi Sad: Alfa graf; 2006.
90. Jovanović M, Đurić Z. Osnovi industrijske farmacije. Zemun: Nijansa; 2005.
91. Jugl-Chizzola M, Spersger J, Schilcher F, Novak J, Bucher A, Gabler C, et al. Effects of *Thymus vulgaris* L. as feed additive in piglets and against haemolytic *E. coli* in vitro. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005 Nov-Dec;118(11-12):495-501.
92. Jukić M, Miloš M. Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.). *Croat Chem Acta.* 2005;78:105-10.
93. Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J Pharm Pharmacol.* 2014;2:377-92.
94. Kaledaite R, Bernatoniene J, Majiene D, Dvorackova K, Masteikova R, Muselik J, et al. Investigation of antiradical activity of *Salvia officinalis* L., *Urtica dioica* L., and *Thymus vulgaris* L. extracts as potential candidates for a complex therapeutic preparation. *J Med Plant Res.* 2011;5:6090-6.
95. Kapetanović IM, Mieyal II. Inhibition of Acetaminophen Induced Hepatotoxicity by Phenacetin and Its Alkoxy Analogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979;209:25-30.
96. Kazazić PS. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh hig rada toksikol.* 2004;55:279-90.
97. Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus* spp. *Braz J Microbiol.* 2014 Aug 29;45(2):523-31.
98. Kim WR, Flamm SL, Bisceglie AM, Bodenheimer HC. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology.* 2008 Apr;47(4):1363-70.
99. Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen JT, Lotsch J, Roots I, et al. Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics J.* 2007 Aug;7(4):257-65.

100. Kliebenstein DJ, Osbourn A. Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15:415–23.
101. Kluth D, Banning A, Paur I, Blomhoff R, Brigelius-Flohe R. Modulation of pregnane X receptor - and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007 Feb 1;42(3):315-25.
102. Kohlert C, Schindler G, März RW, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, et al. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *J Clin Pharmacol.* 2002 Jul;42(7):731-7.
103. Koparal AT, Zeytinoglu M. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology.* 2005;43:149-54.
104. Kostić I, Marković T, Krnjajić S. Sekretorne strukture aromatičnih biljaka sa posebnim osvrtom na strukture sa etarskim uljima, mesta sinteze ulja i njihove važnije funkcije. *Lek sir.* 2012;32:3-25.
105. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2002.
106. Kozics K, Klusova V, Srancikova A, Mucaji P, Slamenova D, Hunakova L, et al. Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. *Food Chem.* 2013;141:2198-206.
107. Kraft K, Hobbs C, editors. Pocket guide to herbal medicine. Stuttgart: Thieme; 2004.
108. Kroyer GT. Red Clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 2004;5:101-5.
109. Kulišić T, Dragović-Uzelac V, Miloš M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technol Biotechnol.* 2006;44:485-92.
110. Kulišić T, Krisko A, Dragović-Uzelac V, Miloš M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int J Food Sci Nutrition.* 2007;58:87-93.
111. Kulišić T, Radonić A, Miloš M. Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Ital J Food Sci.* 2005;17:315-24.
112. Kuntić V, Brborić J, Holclajtner-Antunović I, Uskoković-Marković S. Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin - A new literature data survey. *Vojnosanit Pregl.* 2014;71:60-5.

113. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11:525-48.
114. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597-652.
115. Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch Pharm Res.* 2007 Oct;30(10):1318-27.
116. Lee SJ, Umamo T, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 2005;91(1):131-7.
117. Lima MS, Quintans-Junior LJ, Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira Soares MB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 15;699(1-3):112-7.
118. Liu Y, Flynn TJ, Ferguson MS, Hoagland EM, Yu LL. Effects of dietary phenolics and botanical extracts on hepatotoxicity-related endpoints in human and rat hepatoma cells and statistical models for prediction of hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:1820-7.
119. Lopez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9:31-59.
120. Lukić P. *Farmakognozija.* Beograd: Farmaceutski fakultet; 1993.
121. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25:185-209.
122. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinog.* 2000 Mar;21(3):361-70.
123. Martino M, Chiarugi A. Recent Advances in Pediatric Use of Oral Paracetamol in Fever and Pain Management. *Pain Ther.* 2015 Dec;4(2):149-68.
124. Melo FH, Rios ER, Rocha NF, Citó C, Fernandes ML, Sousa DP, et al. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Dec;64(12):1722-9.
125. Melo FH, Venâncio ET, Sousa DP, França Fonteles MM, Vasconcelos SM, Viana GS, et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010 Aug;24(4):437-43.

126. Mihailović-Stanojević N, Belščak-Cvitanović A, Grujić-Milanović J, Ivanov M, Jovović D, Bugarski D, et al. Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension. *Plant Food Hum Nutr.* 2013;68(3):235-40.
127. Mikaili P, Nezhady MAM, Shayegh J, Mohammad Hossein Asghari MH. Study of antinociceptive effect of *Thymus vulgaris* and *Foeniculum vulgare* essential oil in mouse. *Int J of Acad Res.* 2010;2:374-6.
128. Mikus G, Weiss J. Influence of CYP2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism and response. *Curr Pharmacogenomics.* 2005;3:43-52.
129. Moore N. Ibuprofen: a journey from prescription to over-the-counter use. *J R Soc Med.* 2007;100:2-6.
130. Morales R. Synopsis of the Genus *Thymus* L. In the Mediterranean Area. *Lagascalia.* 1997;19(1-2):249-62.
131. Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(12):959–68.
132. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24(3):287-97.
133. Ocana A, Reglero G. Effects of thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-macrophages. *J Obesity.* 2012.
134. Ogaard B, Larsson E, Glans R, Henriksson T, Birkhed D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomized clinical trial. *J Orofac Orthop.* 1997;58:206-13.
135. Oliveira MM, Brugnera DF, Hilsdorf R, Piccoli RH. Essential oils of thyme and Rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Braz J Microbiol.* 2013;44(4):1181-8.
136. Oscier C, Bosley N, Milner Q. Paracetamol - a Review of Three Routes of Administration. *Update in Anaesthesia.* 2007;23:112-4.
137. Oyewole OI, Owoseni AA, Faboro EO. Studies on medicinal and toxicological properties of *Cajanus cajan*, *Ricinus communis* and *Thymus vulgaris* leaf extracts. *J Med Plants Res.* 2010;4:2004-8.

138. Ozkol H, Tuluce Y, Dilsiz N, Koyuncu I. Therapeutic potential of some plant extracts used in Turkish traditional medicine on streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *J Membr Biol.* 2013;246(1):47-55.
139. Pan SY, Pan S, Yu ZL. New perspectives on innovative drug discovery: an overview. *J Pharm Pharm Sci.* 2010;13(3):450-71.
140. Passet J. *Thymus vulgaris L. chemotaxonomie et biogenese monotерpenique.* Montpellier. 1971.
141. *PDR for Herbal Medicines.* 4<sup>th</sup> ed. Montvale: Thomson Healthcare; 2007.
142. Peana AT, Rubattu P, Piga GG, Fumagalli S, Boatto G, Pippia P, et al. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. *Life Sci.* 2006; 78:2471-4.
143. Peter KV. *Handbook of Herbs and Spices.* 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Woodhead Publishing; 2012.
144. Petrović S, Kukić-Marković J, Pavlović-Drobac M. Biljni lekoviti proizvodi: uslovi za bezbednu primenu. *Arh. farm.* 2012;62:119-36.
145. Popović M, Kaurinović B, Jakovljević V, Rašković A. Effect of dandelion flower extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in rats treated with CCl<sub>4</sub>. *Fresen Environ Bull.* 2008;17:74-8.
146. Posadzki P, Watson L, Ernst E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):603-18.
147. PubChem. 2014. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/citations.html>. Accessed 11.11.2014.
148. Qureshi S, Shah AH, Al-Yahya MA, Ageel AM. Toxicity of *Achillea fragrantissima* and *Thymus vulgaris* in mice. *Fitoterapia.* 1991;62:319–23.
149. Ramadori G, Saile B. Hepatocytes. *Signaling Pathways in Liver Diseases.* 2<sup>nd</sup> Edition. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. 3-16 p.
150. Ramchoun M, Harnafi H, Alem C, Benlyss M, Elrhaffari L, Amrani S. Study on antioxidant and hypolipidemic effects of polyphenol rich extract from *Thymus vulgaris* and *Lavandula multifida*. *Pharmacognosy Res.* 2009;1:106-12.
151. Rana P, Soni G. Antioxidant potential of thyme extract: alleviation of N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2008;27(3):215-21.
152. Rang PH, Dale MM, Ritter JM, Moore KP. *Farmakologija.* Beograd: Data Status; 2005.

153. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:225.
154. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000;387:111-8.
155. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20:933-56.
156. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind Crops Prod.* 2013;43:827-31.
157. Rubio L, Serra A, Chen CY, Macia A, Romero MP, Covas MI, et al. Effect of the co-occurring components from olive oil and thyme extracts on the antioxidant status and its bioavailability in an acute ingestion in rats. *Food Funct.* 2014;5:740-7.
158. Salmalian H, Saghebi R, Moghadamnia AA, Bijani A, Faramarzi M, Amiri FN, et al. Comparative effect of thymus vulgaris and ibuprofen on primary dysmenorrhea: A triple-blind clinical study. *Caspian J Intern Med.* 2014;5(2):82-8.
159. Sarahroodi S, Jafari-Najafi R, Nasri S, Rahampur K, Maleki-Jamshid A, Esmaili S. Effects of *Nepeta menthoides* aqueous extract on retention and retrieval of memory in mice. *Pak J Biol Sci.* 2012;15(22):1085-9.
160. Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Piecková E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett Appl Microbiol.* 2007 Jan;44(1):36-42.
161. Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013.
162. Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmacol Res.* 2010;27:962-78.
163. Silva FA, Borges F, Guimaraes C, Lima JL, Matos C, Reis S. Phenolic acids and derivatives studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem.* 2000;48:2122-6.



164. Silva M, Santos M, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radic. Res.* 2002;36:1219-27.
165. Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics B. Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem.* 1974;166:389-93.
166. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JL, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-a structure-activity relationship study. *Free Radic. Res.* 2006;40:433-42.
167. Smet P. Herbal medicine in Europe: Relaxing regulatory standards. *New Engl J Med.* 2005;352(12):1176-8.
168. Soković M, Glamoclija J, Cirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008 Dec;34(12):1388-93.
169. Soliman KM, Badea BI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:1669-75.
170. Solomun LJ, Ibrić S, Pejanović V. Stabilnost lekova – industrijski aspekt. *Arh.farm.* 2011;5:449-63.
171. Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules.* 2011 Mar 7;16(3):2233-52.
172. Sousa JP, Torres RDA, Azeredo GA, Figueiredo RC, Vasconcelos MA, Souza EL. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *Int J Food Microbiol.* 2012;158(1):9-13.
173. Stahl-Biskup E, Francisco Saez .Thyme: The Genus *Thymus* (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles). London: Taylor & Francis; 2002.
174. Stanković N, Čomić Lj, Kocić B, Nikolić D, Mihajilov-Krstev T, Ilić B, et al. Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem.Ind.* 2011;65(5):583-9.
175. Stepanović B, Radanović D. Tehnologija gajenja lekovitog i aromatičnog bilja u Srbiji. Beograd: Ton Plus; 2011.

176. Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *J Sci Food Agric*. 2013 Oct;93(13):3205-8.
177. Szabo MR, Radu D, Gavrilas S, Chambre D, Idoiou C. Antioxidant and antimicrobial properties of selected spice extracts. *Int J Food Prop*. 2010;13:535-45.
178. Szentandrassy N, Szentesi P, Magyar J, Nánási PP, Csernoch L. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacol*. 2003;3:9.
179. Taherian AA, Babaei M, Vafaei AA, Jarrahi M, Jadidi M, Sadeghi H. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Thymus Vulgaris*. *Pak J Pharm Sci*. 2009;22:83-9.
180. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J Chem Ecol*. 2003;29(4):859-80.
181. Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 2010 Feb;17(2):142-5.
182. Tripathi YB, Tiwari OP, Nagwani S, Mishra B. Pharmacokinetic-interaction of *Vitex negundo* Linn. & paracetamol. *Indian J Med Res*. 2009 Oct;130(4):479-83.
183. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: I.P.Rad; 1997.
184. Tullio V, Mandras N, Allizond V, Nostro A, Roana J, Merlino C, et al. Positive interaction of thyme (red) essential oil with human polymorphonuclear granulocytes in eradicating intracellular *Candida albicans*. *Planta Med*. 2012 Oct;78(15):1633-5.
185. Twetman S, Hallgren A, Petersson LG. Effect of antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque form enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries Res*. 1995;29:188-91.
186. Ugwah-Oguejiofor CJ, Abubakar K, Ugwah MO, Njan AA. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Caralluma dalzielii*. *J. Ethnopharmacol*. 2013;150:967-72.
187. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Apr;68(4):1561-8.
188. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *The Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

189. Vallverdu-Queralt A, Regueiro J, Martinez-Huelamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* 2014;154:299-307.
190. Vila R. *Thyme: The Genus Thymus: Flavonoids and further polyphenols in the genus Thymus.* London: Taylor & Francis; 2002.
191. Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol.* 2009 Apr;48(4):440-6.
192. Walsh A, Edwards H, Fraser J. Over-the-counter medication use for childhood fever: a cross-sectional study of Australian parents. *J Paediatr Child Health.* 2007;43:601-6.
193. WHO. *The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges.* 3rd Edition. Geneva. Switzerland. World Health Organization.
194. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 2003;64:3-19.
195. Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(3):174-9.
196. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999;64(1):59-66.
197. Youdim KA, Deans SG. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech Ageing Dev.* 1999 Sep;109(3):163-75.
198. Zaidi MA, Crow SA. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:331-4.